

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

# МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

март-апрель

**2021, том 23**

**№ 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 сероэпидемиологии, Санкт-Петербург, Россия

## Редакционная коллегия

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

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

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

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

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

**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

*Ответственный секретарь:*

Ракитянская Н.В.

E-mail: medimmun@spbraaci.ru

*Редактор перевода:*

д.м.н. Чухловин А.Б.

*Редактор электронной версии:*

Ерофеева В.С.

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

**Адрес для корреспонденции:**

197101, Санкт-Петербург, а/я 130.

**Электронная версия:** www.mimmun.ru; www.elibrary.ru

© Медицинская иммунология

Журнал зарегистрирован Северо-Западным региональным управлением Государственного комитета РФ по печати 26 марта 1999 г.

Свидетельство о регистрации № П 3612.

Министерством РФ по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций 30 июня 2003 г.

Свидетельство о регистрации ПИ № 77-15892.

Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ №ФС77-60436 30 декабря 2014 г.

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 12.04.2021 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 26,75. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 132

Напечатано в ООО «АРТЕМИДА».

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

Тел.: (812) 950-10-99.

**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 Флуминенсе, Лаборатория биологии распознавания, Рио-де-Жанейро, Бразилия

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

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

**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

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

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

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

---

(SPb RAACI)

**MEDICAL  
IMMUNOLOGY/  
MEDITSINSKAYA  
IMMUNOLOGIYA**

March-April

**2021, volume 23**

**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

### Managing Editor:

Natalia Rakitianskaia  
E-mail: medimmun@spbraaci.ru

### Translation editor:

Alexey B. Chukhlovin, PhD, MD

### Online version editorial manager:

Erofeeva V.S.

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

### Address for correspondence:

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

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

© Medical Immunology

The Journal is registered at the North Western Regional Administration for the Press Affairs of the Russian Federation, March 26, 1999.

Certificate of registration PI № 77-15892

by the Ministry of Press, Television,

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

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

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

Chelovek Publishing House

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

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Passed for printing 12.04.2021. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 26,75. Circulation 2000 copies. (1<sup>st</sup> edition – 1000 copies.)

Print in LLC «ARTEMIDA»

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

Phone: (812) 950-10-99

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

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

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

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

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

**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

## СОДЕРЖАНИЕ

### Обзоры

Юрова К.А., Мелашенко Е.С., Хазиахматова О.Г., Мелашенко В.В., Мелашенко О.Б., Шунькин Е.О., Норкин И.К., Хлусов И.А., Литвинова Л.С.  
**МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ: КРАТКИЙ ОБЗОР КЛАССИЧЕСКИХ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ И НОВЫХ ФАКТОРОВ  
ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ**..... 207

Жигарев Д.И., Хорева М.В., Ганковская Л.В.  
**ИЗМЕНЕНИЕ ФЕНОТИПА И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НК-КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ  
И ОСТРЫМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ ПОД ВЛИЯНИЕМ ГИПОМЕТИЛИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ** ..... 223

Белоглазов В.А., Яцков И.А., Усеинова Р.Х.  
**ЭКСПРЕССИЯ И ПОЛИМОРФИЗМ РЕЦЕПТОРОВ TLR4 В ПАТОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ:  
СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД**..... 231

Дрождина М.Б., Суслова Е.В.  
**ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРИ АТОПИЧЕСКОМ ДЕРМАТИТЕ. ОСНОВНЫЕ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ И КОРРЕЛЯЦИИ  
СТАДИЙНОСТИ В ВОЗРАСТНОМ АСПЕКТЕ. ВЗАИМОСВЯЗЬ С СИСТЕМНЫМИ ПРОЦЕССАМИ ДЕРМАТОЛОГИЧЕСКОГО  
И НЕДЕРМАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ** ..... 237

### Оригинальные статьи

Снегирева Н.А., [Сидорова Е.В.], Дьяков И.Н., Гаврилова М.В., Чернышова И.Н., Пашков Е.П., Светич О.А.  
**IgM- и IgA-ОТВЕТ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ В1-КЛЕТОК НА Т-НЕЗАВИСИМЫЙ АНТИГЕН ВТОРОГО РОДА В ПРИСУТСТВИИ  
γδТ-КЛЕТОК IN VITRO**..... 245

Кирикович С.С., Левитес Е.В., Долгова Е.В., Проскураина А.С., Риттер Г.С., Рузанова В.С., Леплина О.Ю., Шевела Е.Я., Останин А.А.,  
Рябичева Т.Г., Рыжикова С.Л., Дружинина Ю.Г., Вараксин Н.А., Черных Е.Р., Богачев С.С.  
**ВЛИЯНИЕ GcMAF-RF НА EX VIVO ПОЛЯРИЗАЦИЮ МАКРОФАГОВ, АКТИВАЦИЮ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК И ПРОДУКЦИЮ  
ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА**..... 257

Коренецкий А.В., Милютина Ю.П., Березкина М.Э., Александрова Е.П., Балабас О.А., Маркова К.Л., Сельков С.А., Соколов Д.И.  
**ПРОТЕОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ МОНОЦИТОПОДОБНЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ THP-1 И ПРОДУЦИРУЕМЫХ ИМИ  
МИКРОВЕЗИКУЛ С ПОМОЩЬЮ MALDI-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ** ..... 275

Андросова Л.В., Симонов А.Н., Пономарева Н.В., Ключник Т.П.  
**КЛАСТЕРНЫЙ АНАЛИЗ МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ СЫВОРОТКИ КРОВИ УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ** ..... 293

Агарков Н.М., Коломиец В.И., Корнеева С.И., Москалева Е.О., Макконен К.Ф.  
**ИНФОРМАТИВНОСТЬ СЫВОРОТОЧНЫХ ЦИТОКИНОВ И ИХ ЗНАЧЕНИЕ В ФОРМИРОВАНИИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО  
СИНДРОМА С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ В ПОЖИЛОМ ВОЗРАСТЕ** ..... 303

Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Бацунов О.К., Коробова З.Р., Станевич О.В., Лебедева А.А., Воробьев Е.А., Воробьева С.В.,  
Куликов А.Н., Лизонов Д.А., Шарапова М.А., Певцов Д.Э., Тоголян Арег А.  
**ЦИТОКИНЫ В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ COVID-19 В ОСТРОЙ ФАЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ И ФАЗЕ ПОЛНОГО ВЫЗДОРОВЛЕНИЯ**..... 311

Моренкова А.Ю., Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Баторов Е.В., Сизиков А.Э., Чумасова О.А., Сулутьян А.Э., Останин А.А., Черных Е.Р.  
**ЭКСПАНСИЯ МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С АНКИЛОЗИРУЮЩИМ  
СПОНДИЛИТОМ** ..... 327

Абакумова Т.В., Генинг Т.П., Генинг С.О., Антонеева И.И.  
**АНГИОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ НЕЙТРОФИЛОВ ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ КРОВИ ПРИ РАКЕ ЭНДОМЕТРИЯ** ..... 339

Базарный В.В., Мандра Ю.В., Полушина Л.Г., Максимова А.Ю., Светлакова Е.Н.  
**КЛИНИЧЕСКАЯ ИНФОРМАТИВНОСТЬ ХЕМОКИНОВ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПАРОДОНТИТЕ** ..... 345

Карзакова Л.М., Мучукова О.М., Луткова Т.С., Кудряшов С.И., Журавлева Н.В., Ухтерова Н.Д., Гаврилова Э.С., Сидоров И.А., Одинцова А.В.  
**РЕСПУБЛИКАНСКИЙ РЕГИСТР ПЕРВИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТОВ В ЧУВАШСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ И ОПИСАНИЕ НАРУШЕНИЯ  
ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У БЕРЕМЕННОЙ ПАЦИЕНТКИ С ОБЩЕЙ ВАРИАБЕЛЬНОЙ ИММУННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ**..... 353

Гордеева Л.А., Воронина Е.Н., Поленок Е.Г., Мун С.А., Нерсесян С.Л., Оленникова Р.В., Филипенко М.Л., Глушков А.Н.  
**ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА HLA-G, ВНУТРИМАТОЧНОЙ ИНФЕКЦИИ И НЕВЫНАШИВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ У ЖЕНЩИН** ..... 369

Гельм Ю.В., Абакушина Е.В., Пасова И.А., Гривцова Л.Ю.  
**РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К КЛЕТОЧНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ**..... 381

### Краткие сообщения

Осиков М.В., [Симоныя Е.В.], Агеева А.А., Агеев Ю.И.  
**МЕЛАТОНИН В СОСТАВЕ ДЕРМАЛЬНОЙ ПЛЕНКИ ОГРАНИЧИВАЕТ ГИБЕЛЬ ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ  
ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ**..... 389

Бодиенкова Г.М., Боклаженко Е.В.  
**ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ИНФОРМАТИВНОСТЬ IL-17 ПРИ НЕЙРОИНТОКСИКАЦИИ ПАРАМИ РТУТИ** ..... 395

### Иммунологические методы

Паевлов О.В., Чепанов С.В., Селютин А.В., Зайнуллина М.С., Еремеева Д.Р., Сельков С.А.  
**ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ИМУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ ТРОМБОЦИТАРНО-МОНОЦИТАРНЫХ КОМПЛЕКСОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ  
КРОВИ С ПОМОЩЬЮ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРОМЕТРИИ** ..... 401

**Правила для авторов** ..... 411

**Авторский указатель**..... 414

**Предметный указатель**..... 414

## CONTENTS

### Reviews

Yurova K.A., Melashchenko E.S., Khasiakhmatova O.G., Malashchenko V.V., Melashchenko O.B., Shunkin E.O., Norkin I.K., Khlusov I.A., Litvinova L.S. <b>MESENCHYMAL STEM CELLS: A BRIEF REVIEW OF CLASSIC CONCEPTS AND NEW FACTORS OF OSTEOGENIC DIFFERENTIATION</b> .....	207
Zhigarev D.I., Khoreva M.V., Gankovskaya L.V. <b>PHENOTYPIC AND FUNCTIONAL CHANGES OF NK CELLS IN PATIENTS WITH MYELODYSPLASTIC SYNDROME AND ACUTE MYELOID LEUKEMIA TREATED WITH HYPOMETHYLATING DRUGS</b> .....	223
Beloglazov V.A., Yatskov I.A., Useinova R.Kh. <b>EXPRESSION AND POLYMORPHISM OF TLR4 RECEPTORS IN PATHOGENESIS OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE: A MODERN VIEW</b> .....	231
Drozhdina M.B., Suslova E.V. <b>IMMUNE RESPONSE IN ATOPIC DERMATITIS: MAIN PATHOGENETIC MECHANISMS AND STAGE-DEPENDENT CORRELATIONS WITH AGE IN REGARD TO DERMATOLOGICAL AND NON-DERMATOLOGICAL SYSTEMIC PROCESSES</b> .....	237

### Original articles

Snegireva N.A., [Sidorova E.V.], Dyakov I.N., Gavrilova M.V., Chernishova I.N., Pashkov E.P., Svitich O.A. <b>IgM- AND IgA-RESPONSE OF PERITONEAL B1 CELLS TO THE TI-2 ANTIGEN WITH <i>IN VITRO</i> PRESENCE OF <math>\gamma\delta</math>T CELLS</b> .....	245
Kirikovich S.S., Levites E.V., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Ritter G.S., Ruzanova V.S., Leplina O.Yu., Shevela E.Ya., Ostanin A.A., Ryabicheva T.G., Ryzhikova S.L., Druzhinina Yu.G., Varaksin N.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. <b>EFFECT OF MACROPHAGE-ACTIVATING FACTOR (GcMAF-RF) UPON EX VIVO POLARIZATION OF MACROPHAGES, ACTIVATION OF DENDRITIC CELLS AND PRODUCTION OF CYTOKINES BY HUMAN WHOLE BLOOD CELLS</b> .....	257
Korenevsky A.V., Milyutina Yu.P., Berezkina M.E., Alexandrova E.P., Balabas O.A., Markova K.L., Selkov S.A., Sokolov D.I. <b>MALDI-TOF MASS SPECTROMETRIC PROTEIN PROFILING OF THP-1 CELLS AND THEIR MICROVESICLES</b> .....	275
Androsova L.V., Simonov A.N., Ponomareva N.V., Klyushnik T.P. <b>CLUSTER ANALYSIS OF BLOOD SERUM INFLAMMATION MARKERS OF CONDITIONALLY HEALTHY PEOPLE</b> .....	293
Agarkov N.M., Kolomiets V.I., Korneeva S.I., Moskaleva E.O., Makkonen K.F. <b>INFORMATIVE SIGNIFICANCE OF SERUM CYTOKINES AND THEIR IMPORTANCE FOR DEVELOPMENT OF METABOLIC SYNDROME WITH ARTERIAL HYPERTENSION IN ELDERLY PERSONS</b> .....	303
Arsentieva N.A., Liubimova N.E., Batsunov O.K., Korobova Z.R., Stanevich O.V., Lebedeva A.A., Vorobyov E.A., Vorobyova S.V., Kulikov A.N., Lioznov D.A., Sharapova M.A., Pevtsov D.E., Totolian Areg A. <b>PLASMA CYTOKINES IN PATIENTS WITH COVID-19 DURING ACUTE PHASE OF THE DISEASE AND FOLLOWING COMPLETE RECOVERY</b> .....	311
Morenkova A.Yu., Tikhonova M.A., Tyrinova T.V., Batorov E.V., Sizikov A.E., Chumasova O.A., Sulutyan A.E., Ostanin A.A., Chernykh E.R. <b>EXPANSION OF MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS IN THE PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS</b> .....	327
Abakumova T.V., Gening T.P., Gening S.O., Antoneeva I.I. <b>ANGIOGENIC POTENTIAL OF CIRCULATING BLOOD NEUTROPHILS IN ENDOMETRIAL CANCER</b> .....	339
Bazarny V.V., Mandra Yu.V., Polushina L.G., Maksimova A.Yu., Svetlakova E.N. <b>CLINICAL VALUE OF ORAL FLUID CHEMOKINES IN CHRONIC PERIODONTITIS</b> .....	345
Karzakova L.M., Muchukova O.M., Lutkova T.S., Kudryashov S.I., Zhuravleva N.V., Ukhterova N.D., Gavrilova E.S., Sidorov I.A., Odintsova A.V. <b>REPUBLICAN REGISTRY OF PRIMARY IMMUNE DEFICIENCIES IN THE CHUVASH REPUBLIC AND DESCRIPTION OF POSTVACCINAL IMMUNITY DISORDERS IN A PREGNANT PATIENT WITH COMMON VARIABLE IMMUNE DEFICIENCY</b> .....	353
Gordeeva L.A., Voronina E.N., Polenok E.G., Mun S.A., Sokolova E.A., Nersesyan S.L., Olenkova R.V., Filipenko M.L., Glushkov A.N. <b>STUDY OF RELATIONSHIPS BETWEEN HLA-G GENE POLYMORPHISM, INTRAUTERINE INFECTION AND RECURRENT MISCARRIAGE IN WOMEN</b> .....	369
Gelm Yu.V., Abakushina E.V., Pasova I.A., Grivtsova L.Yu. <b>DEVELOPMENT OF APPROACHES FOR CELLULAR IMMUNOTHERAPY OF CANCER PATIENTS</b> .....	381

### Short communications

Osikov M.V., [Simonyan E.V.], Ageeva A.A., Ageev Yu.I. <b>MELATONIN IN THE DERMAL FILM LIMITS THE BLOOD LYMPHOCYTE DEATH IN EXPERIMENTAL THERMAL TRAUMA</b> .....	389
Bodienkova G.M., Boklazhenko E.V. <b>DIAGNOSTIC VALUE OF IL-17 IN NEUROINTOXICATION WITH MERCURY</b> .....	395

### Immunological methods

Pavlov O.V., Chepanov S.V., Selutin A.V., Zainulina M.S., Ereemeeva D.R., Selkov S.A. <b>FLOW CYTOFLUORIMETRIC DETECTION AND IMMUNOPHENOTYPING OF PLATELET-MONOCYTE COMPLEXES IN PERIPHERAL BLOOD</b> .....	401
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

<b>Instructions to Authors</b> .....	411
--------------------------------------	-----

<b>Author index</b> .....	414
---------------------------	-----

<b>Subject index</b> .....	414
----------------------------	-----

## МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ: КРАТКИЙ ОБЗОР КЛАССИЧЕСКИХ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ И НОВЫХ ФАКТОРОВ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Юрова К.А.<sup>1</sup>, Мелащенко Е.С.<sup>1</sup>, Хазиахматова О.Г.<sup>1</sup>,  
Малащенко В.В.<sup>1</sup>, Мелащенко О.Б.<sup>1</sup>, Шунькин Е.О.<sup>1</sup>, Норкин И.К.<sup>1</sup>,  
Хлусов И.А.<sup>1,2,3</sup>, Литвинова Л.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,  
г. Томск, Россия

<sup>3</sup> ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», г. Томск, Россия

**Резюме.** Молекулярно-генетические механизмы, сигнальные пути, условия, факторы и маркеры остеогенной дифференцировки мезенхимных стволовых клеток (МСК) активно изучаются, несмотря на то, что считаются одними из наиболее исследованных направлений в области клеточных технологий. Во многом это обусловлено накопившимися противоречиями в, казалось бы, классических знаниях, а также постоянным обновлением результатов в анализируемой области. В связи с этим мы сосредоточили внимание на основных классических представлениях и некоторых новых факторах и механизмах, оказывающих заметное регуляторное влияние на дифференцировочный потенциал постнатальных МСК. В обзоре рассматривается значение источника получения МСК для реализации их дифференцировочного потенциала, роль клеточного микроокружения. Освещаются вопросы классификации, терминологии и функциональной активности МСК из различных источников. Описаны молекулярно-генетические факторы и сигнальные пути дифференцировки МСК; рассмотрены как классические участники остеогенеза с описанием их новых функциональных свойств, так и новые молекулы, способные участвовать в процессах костеобразования. Отмечено, что данные об основных генах, задействованных в процессе остеогенеза, крайне противоречивы. Проанализирован паракринный потенциал МСК в механизмах регенерации тканей; отмечено важнейшее значение воспаления в остеогенезе, в частности присутствие в очаге повреждения воспалительных цитокинов и хемокинов, продуцируемых не только клетками микроокружения, но и клетками крови, в том числе мононуклеарными лейкоцитами, мигрирующими в очаг повреждения. Важная роль в настоящем обзоре отведена рассмотрению биомеханических сигналов и особенностей влияния конформационных изменений клеточного цитоскелета (формы клетки) на дифференцировку МСК, так как морфологические особенности клеток и структура цитоскелета модулируется взаимодействием клеточной поверхности с факторами окружающей среды, включая гидростатическое давление, поток жидкости, нагрузка на сжатие/растяжение. Представлены данные о том, что эластичность экстрацеллюлярного матрикса является одним из определяющих факторов клеточной дифференцировки. Сделано заклю-

### Адрес для переписки:

Литвинова Лариса Сергеевна  
ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет  
имени И. Канта»  
236000, Россия, г. Калининград, ул. Гайдара, 6 (каб. 302).  
Тел.: 8 (4012) 59-55-95 (доб. 6631).  
E-mail: larisalitvinova@yandex.ru

### Address for correspondence:

Litvinova Larisa S.  
I. Kant Baltic Federal University  
236000, Russian Federation, Kaliningrad,  
Gaydar str., 6 (room 302).  
Phone: 7 (4012) 59-55-95 (add. 6631).  
E-mail: larisalitvinova@yandex.ru

### Образец цитирования:

К.А. Юрова, Е.С. Мелащенко, О.Г. Хазиахматова,  
В.В. Малащенко, О.Б. Мелащенко, Е.О. Шунькин,  
И.К. Норкин, И.А. Хлусов, Л.С. Литвинова  
«Мезенхимные стволовые клетки: краткий обзор  
классических представлений и новых факторов  
остеогенной дифференцировки» // Медицинская  
иммунология, 2021. Т. 23, № 2. С. 207-222.  
doi: 10.15789/1563-0625-MSC-2128

© Юрова К.А. и соавт., 2021

### For citation:

K.A. Yurova, E.S. Melashchenko, O.G. Khasiakhmatova,  
V.V. Malashchenko, O.B. Melashchenko, E.O. Shunkin,  
I.K. Norkin, I.A. Khlusov, L.S. Litvinova "Mesenchymal stem  
cells: a brief review of classic concepts and new factors  
of osteogenic differentiation", Medical Immunology  
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 2,  
pp. 207-222.  
doi: 10.15789/1563-0625-MSC-2128

DOI: 10.15789/1563-0625-MSC-2128

чение о необходимости перехода от точечного изучения эффектов отдельных генов к множественным измерениям генно-регуляторного профиля и биомолекул, ответственных за реализацию многочисленных, полностью не изученных остеогенных факторов эндогенного и экзогенного происхождения. Одним из краеугольных направлений в будущих (эпи)генетических исследованиях будет решение вопроса о том, реализуются ли остеомодулирующие эффекты через специфические сигнальные пути и/или имеется перекрестный сигналинг с известными генами остеогенной дифференцировки МСК.

*Ключевые слова:* источник клеток, гены, факторы транскрипции, маркеры дифференцировки, цитокины, хемокины, механотрансдукция

## MESENCHYMAL STEM CELLS: A BRIEF REVIEW OF CLASSIC CONCEPTS AND NEW FACTORS OF OSTEOGENIC DIFFERENTIATION

Yurova K.A.<sup>a</sup>, Melashchenko E.S.<sup>a</sup>, Khasiakhmatova O.G.<sup>a</sup>,  
Malashchenko V.V.<sup>a</sup>, Melashchenko O.B.<sup>a</sup>, Shunkin E.O.<sup>a</sup>, Norkin I.K.<sup>a</sup>,  
Khlusov I.A.<sup>a, b, c</sup>, Litvinova L.S.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

<sup>b</sup> Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

<sup>c</sup> National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation

**Abstract.** Molecular genetic mechanisms, signaling pathways, cultural conditions, factors, and markers of osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSC) are actively studied despite numerous works in this area of cellular technologies. This is largely due to the accumulating contradictions in seemingly classical knowledge, as well as permanent updating of the results in the field. In this regard, we focused on the main classical concepts and some new factors and mechanisms that have a noticeable regulatory effect on the differentiation potential of postnatal MSCs. The present review considers the significance of MSC sources for their differentiation capacity, as well as the role of the cellular microenvironment. The issues of classification, terminology, and functional activity of MSCs from various sources are discussed. The paracrine potential of MSCs in tissue regeneration has been considered; sufficient importance of inflammation in osteogenesis is noted, in particular, the presence of inflammatory cytokines and chemokines in the lesion focus, produced not only by microenvironmental cells but also by blood cells, including mononuclear leukocytes, migrating to the affected site. An important role in this review is given to biomechanical signals and to influence of conformational changes in cell cytoskeleton (cell shape) upon MSC differentiation, since the morphological features of cells and the structure of cytoskeleton are modulated by interactions of the cell surface with environmental factors, including hydrostatic pressure, fluid flow, compression/stretching loads. The data are presented concerning elasticity of extracellular matrix being a determining factor of cell differentiation. We conclude that one should switch from point studies of individual gene effects to multiple measurements of the gene-regulatory profile and biomolecules responsible for multiple, still poorly studied osteogenic factors of endogenous and exogenous origin. Among cornerstones in future (epi)genetic studies will be to decide if osteomodulatory effects are realized through specific signaling pathways and/or via cross-signaling with known genes controlling osteogenic differentiation of MSCs.

*Keywords:* cell source, genes, transcription factor, differentiation markers, cytokines, chemokines, mechanotransduction

Работа выполнена при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации (НШ-2495.2020.7; СП-4193.2021.4).

### Введение

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) взрослого человека являются важным клеточным ресурсом для тканевой инженерии и ре-

генеративной медицины, что объясняется их способностью к самоподдержанию популяции, пластичностью к дифференцировке в различных направлениях [8, 74]. МСК классически дифференцируются в 4 ортодоксальных направлениях: остеобласты, хондробласты, адипоциты и фибробласты [98], а также в другие типы клеток [46, 98]. МСК чаще всего выделяют из костного мозга,

жировой ткани и периферической крови [124]. Кроме того, их источником могут быть мышцы, кожа, легкие, поджелудочная железа, печень и другие ткани взрослого организма [22, 26, 74, 124]. Несмотря на то, что МСК, полученные из разных тканей, обладают общими характеристиками, их биологическая активность и некоторые маркеры различаются [62].

МСК находятся на различных стадиях испытаний в различных клинических приложениях [53, 62]. Тем не менее их биологические свойства до сих пор полностью не изучены. Одним из препятствий применения МСК в регенеративной медицине и тканевой инженерии является их способность к спонтанной дифференцировке при продолжительной экспансии *in vitro* [84].

С другой стороны, при исследовании *in vitro* дифференцировки МСК человека в четырех классических направлениях (остео-, хондро-, фибро- и адипогенном), отмечается высокая (более чем двукратная в сравнении со зрелыми клетками) экспрессия 148 генов и 9 факторов транскрипции. При этом выключение (knockdown) одного из факторов спомощью специфичных siРНК лишь частично ослабляет дифференцировку МСК [64]. Изучение ключевых аспектов молекулярной биологии МСК необходимо для развития фундаментальных и клинических исследований [62].

Молекулярно-генетические механизмы, сигнальные пути, факторы и маркеры остеогенной дифференцировки МСК являются активно изучаемыми и изученными направлениями исследований в области клеточных технологий. Щелочная фосфатаза (Alkaline phosphatase, ALP) считается классическим ранним маркером остеобластов, синтезирующих минерализованный костный матрикс [143]. Тем не менее ее экспрессия не всегда транслируется в конечные этапы остеогенной дифференцировки [59].

По-видимому, для стимуляции пролиферации и/или дифференцировки МСК и регенерации стромы требуется несколько сигналов, например, известное сочетание глюкокортикоидов, аскорбиновой кислоты и бета-глицерофосфата для остеогенной дифференцировки МСК. Такими сигналами являются, кроме того, концентрация кислорода [48], компоненты экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ), клеточное микроокружение и многие другие, мало изученные или неизвестные раздражители [58].

В связи с этим в настоящем обзоре мы сосредоточились на анализе основных классических представлений, а также некоторых новых факторах и механизмах, оказывающих регуляторное влияние на дифференцировочный потенциал постнатальных МСК.

### **Влияние источника получения МСК на реализацию их дифференцировочного потенциала**

Костный мозг является наиболее исследованным источником МСК. За последнее десятилетие многие исследования документально подтвердили возможность получения стволовых клеток/клеток-предшественниц с биологической характеристикой МСК из других тканей взрослого человека, таких как кожа [90], плацента [97], пуповинная кровь [4, 97], пуповинная ткань [87], жировая ткань [69], пульпа зуба и молочные зубы [2, 69, 138], тестикулы и мозг [18, 66] (рис. 1, см. 3-ю стр. обложки).

Имеются данные о том, что МСК, полученные из разных тканей, составляют гетерогенный пул клеток, в связи с чем возникла необходимость в разработке стандартов для характеристики МСК. Такие стандарты были предложены в 2006 году Международным обществом клеточной терапии в качестве минимальных критериев для определения МСК [5, 132]. В дальнейшем критерии распространили на МСК, выделенные из жировой ткани [12]. Тем не менее остаются многочисленные вопросы в классификации, терминологии и функциональной активности МСК из различных источников.

Дифференцировка МСК в одном из ортодоксальных направлений и функциональные свойства определяются во многом источником их получения [127], т.е. свойствами микроокружения. Например, МСК, полученные из кости (Bone marrow stromal cells, BMSCs), более склонны к дифференцировке в остеогенном направлении [43]; в культуре BMSCs отмечается более высокая (в сравнении с МСК из жировой ткани) активность ALP, экспрессия ранних и поздних генов остеогенной дифференцировки [6, 43, 112, 134]. МСК, полученные из синовиальной мембраны, дифференцируются предпочтительно в хондрогенном направлении [67, 131, 137].

В свою очередь, МСК жировой ткани (Adipose-Derived Stem Cells, ASCs) дифференцируются, в большей степени, в ангиогенном, чем в остеогенном направлении [13]. В то же время в ряде других исследований остеогенная дифференцировка ASCs *in vitro* превосходила таковую для BMSCs с точки зрения отложения кальция в ЭЦМ и экспрессии генов [13, 45, 70, 100]. Кроме того, остеогенная способность ASCs увеличивалась в динамических условиях культивирования и механической стимуляции [96], а также при добавлении фактора роста тромбоцитов [51, 96], витамина D3 и костного морфогенетического белка-2 (Bone Morphogenetic Protein 2, BMP-2) [118].

МСК имеют внутренний контроль дифференцировки, поэтому дифференциация МСК в разные клоны клеток строго регулируется различными

ми инструктивными сигналами. Изменение или нарушение этой регуляции приводит к патологическим последствиям, таким как остеопороз или фенотип с высокой костной массой [39, 118].

Согласно [101], независимо от источника МСК (костный мозг или жировая ткань), адипогенез требует более значительных транскрипционных изменений, чем остеогенез. Это соответствует гипотезе, что остеобласты являются специализированными фибробластами [28], поэтому для индукции остеогенеза требуются только энхансеры, тогда как генетическая программа, селективная в отношении адипоцитов, в основном определяется ремоделированием *de novo* и активацией энхансеров.

Тем не менее до сих пор не идентифицированными остаются ключевые факторы транскрипции для МСК, такие как плюрипотентные гены октамер-4 (octamer-binding transcription factor 4, *Oct4*), ДНК-связывающий фактор транскрипции гомеобокса (*Nanog*) и определяющая пол область Y-бокса 2 (sex determining region Y-box 2, *Sox2*) в эмбриональных стволовых клетках; лишение каждого из которых приводит к полной потере идентичности МСК [74].

#### Молекулярно-генетические факторы и сигнальные пути дифференцировки МСК

Остеобласты представляют собой костеобразующие клетки, которые синтезируют и минерализуют внеклеточный матрикс. Они дифференцируются из МСК под влиянием факторов роста, гормонов, низкомолекулярных веществ и цитокинов семейства  $\beta$ -трансформирующего фактора роста (Transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ ). Так, например, классический метод дифференциации МСК в остеобласты *in vitro* включает инкубацию конфлюэнтного монослоя МСК с аскорбиновой кислотой,  $\beta$ -глицерофосфатом и дексаметазоном в течение 2-3 недель. Совокупность этих факторов приводит к образованию агрегатов или узелков МСК и увеличивает экспрессию ими ALP, а также, с течением времени, накопление и отложение кальция в ЭЦМ [37].

Дифференциация остеобластов из МСК — сложный процесс, в котором задействованы различные факторы. Многочисленные факторы и сигнальные молекулы, участвующие в регуляции поведения МСК и функционировании остеобластных ниш для гемопоэтических стволовых клеток, представлены в наших предыдущих обзорах [37, 48]. Следует учитывать, что понимание процессов функционирования ниши для самих МСК, регулирующих направления их коммитирования, остаются до сих пор неизвестными [58, 74]. В текущем обзоре мы сфокусировали внимание как на классических молекулах остеогенеза,

значение которых активно дополняется и/или пересматривается, так и на некоторых новых кандидатах.

Особую роль играют медиаторы суперсемейства TGF- $\beta$  [103], способствующие ранней хондрогенной и остеобластной дифференцировке, за счет увеличения экспрессии мРНК связанного с Runt фактора транскрипции 2 (Runt-related transcription factor 2, *Runx2*). Правильное созревание и функция остеобластов напрямую связана с экспрессией двух ключевых факторов транскрипции остеобластогенеза: RUNX2 и транскрипционного фактора OSTERIX (Transcription factor Sp7, OSTERIX) [82]. Подробная информация о факторе OSTERIX представлена в обзоре Krishna M. Sinha и Xin Zhou [115].

Ген *Runx2* кодирует факторы транскрипции и, как многофункциональный «мастер-ген», регулирует дифференцировку остеобластов [71]. *Runx2* экспрессируется в мезенхимных клетках-предшественницах примерно за 4 дня до появления остеобластов. Два твист-родственных белка Twist 1 и Twist 2 ингибируют ген *Runx2* через специальные домены (так называемые твист-боксы) во время развития скелета, через связывание ДНК с последовательностью RUNX2 (так называемый Runt) и, таким образом, являются антагонистами дифференцировки остеобластов. Было показано, что экспрессия типичных для остеобластов белков зависит от снижения активности гена, кодирующего основной транскрипционный фактор helix-loop-helix (*twist*) [10]. Напротив, BMP-7 и BMP-2 увеличивают экспрессию *Runx2* и способствуют дифференцировке остеобластов [10, 41].

BMPs — это гликопротеины, которые входят в семейство TGF- $\beta$ , ответственны за процессы хемотаксиса, деления и дифференцировки костных клеток *in vitro* и *in vivo* [133], считаются истинными остеоиндуктивными молекулами. Вместе с тем появляются сообщения, что длительное введение рекомбинантного BMP-2 (100-300 нг/мл) в культуру стромальных клеток костного мозга человека приводит к повышенной экспрессии соответствующих генов и фактора связывания ядра  $\alpha 1$  (core-binding factor  $\alpha 1$ , *Cbfa 1*), увеличению активности ALP, но не результируется в выраженную минерализацию ЭЦМ [48]. Авторы делают вывод, что одного BMP-2 недостаточно для реализации конечных этапов остеогенеза, связанных с формированием тканевой структуры.

RUNX2, ALP и остеокальцин (bone Gla protein, BGP) являются типичными маркерами остеобластов и играют важную роль в остеогенезе. На ранней стадии избыточная экспрессия RUNX2 способна усилить дифференцировку

МСК в направлении остеодифференцировки. Кроме того, RUNX2 является основной мишенью BMP-зависимого пути и деградирует путем убиквитинирования. В отличие от RUNX2 и ALP, остеокальцин является реальным маркером остеобластной дифференцировки на поздних стадиях остеогенеза [133]. Тем не менее экспрессия ALP на ранних этапах является недостаточным условием терминальной дифференцировки МСК в остеобласты. При этом в культуре МСК человека остеокальцин не всегда продуцируется в ответ на дексаметазон или BMP-2 [59]. Соответственно, авторы делают вывод о пока неизвестных факторах и условиях, необходимых, помимо ALP и остеокальцина, для минерализации ЭЦМ.

RUNX2 физически взаимодействует с семейством структурно подобных белков (Similar to Mothers Against Decapentaplegic, Smad), в результате чего эффект зависит как от изоформа Smad, так и от типа клеток. Белки Smad высвобождаются путем связывания рецептор-лиганд TGF- $\beta$  на клеточной мембране и реализуют свою функцию в качестве факторов транскрипции за счет внутриклеточной передачи сигнала в ядро клетки непосредственно на ДНК. В мезенхимных клетках Smad3 оказывает ингибирующее действие на RUNX2, тогда как в эпителиальных клетках Smad3 активирует RUNX2 [3]. Smad4, с другой стороны, опосредует сигналы как от TGF- $\beta$ , так и от BMP [61].

Другой группой белков, которые регулируют дифференцировку МСК в остеобласты, являются трансмембранные белки – нейрогенные белки-гомологи (Neurogenic locus notch homolog protein, Notch). Опосредованное лигандом высвобождение внеклеточных и внутриклеточных субъединиц этих гетеродимерных рецепторных белков играет важную роль в упорядоченной дифференцировке клеток в контексте органогенеза. Кортикостероиды, используемые в культуре клеток для дифференцировки остеобластов, увеличивают экспрессию Notch1 и Notch2 [3, 61].

Несмотря на открытие ключевого RUNX2, а также дополнительных – SOX9, активирующего транскрипционного фактора 4 (ATF4), активирующего белка (AP1), факторов транскрипции и сигнальных путей (Hedgehog, Notch, WNT, BMP, FGF), регулирующих развитие остеобластов [76], остается много вопросов в отношении регуляции дифференцировки МСК. Несмотря на то, что роли основных сигналов развития описаны [76], до сих пор недостаточно данных для полного понимания, какие сигналы выполняют специфическую для остеобластов программу дифференцировки. Например, пока нет полного понимания

сети регуляции генов (gene regulatory network, GRN), которая определяет ход дифференцировки клетки в остеобласт. Результаты исследований показывают, что фенотип зрелого остеобласта может быть связан с переменными профилями экспрессии генов, что подчеркивает сложность идентификации ядра GRN в остеобластах [73]. Тем не менее возможно, что технология высокопроизводительного секвенирования, применяемая к множеству образцов популяций остеобластов или отдельных клеток, может помочь идентифицировать основную молекулярную сигнатуру, общую для всех остеобластов. Такие исследования важно объединить с функциональным анализом для получения представления об иерархии GRN.

Далее соответствующие гены, транскрипционные мишени (кодирующие белок или не кодирующие белок) для большинства сигналов, неизвестны. Более того, одни и те же сигналы могут также запускать события, которые изначально не зависят от регуляции транскрипции (в частности изменение клеточного метаболизма) и могут влиять на дифференцировку остеобластов; однако эти возможности еще предстоит изучить [76].

Биоинформационные исследования последних лет показали, что остеогенез в культуре МСК сопровождается усилением экспрессии генов, задействованных в организации внеклеточного матрикса, оксификации, отрицательной регуляции пролиферации клеток, развитии сосудистой сети, положительной регуляции гибели клеток и метаболизма тирозина. В то же время регистрируется подавление экспрессии генов, относящихся к клеточному делению, веретену деления, среднему телу, метафазным пластинкам, микротрубочкам, клеточному циклу и репликации ДНК [73, 76].

С другой стороны, данные об основных генах, задействованных в процессе остеогенеза, крайне противоречивы. Так, сообщается [32], что взаимодействия между образованием кости и генами-концентраторами, обнаруженными исследователями (Kinesin Family Member 11 (*KIF11*), polo-like kinase 1 (*PLK1*), Cell division cycle associated 8 (*CDC48*), protein kinase (*TTK*), cell division cycle protein 20 (*CDC20*) и Non-SMC Condensin I Complex Subunit G (*NCAPG*)), не установлены. Изученные авторами гены участвуют в обширной пространственной, временной и динамической регуляции микротрубочек [32, 65, 146].

В литературе появляются сообщения о новых, не подтвержденных генах-кандидатах, предположительно участвующих в остеогенезе. Например, роль гена топоизомеразы ДНК 2 $\alpha$  (DNA Topoisomerase 2 $\alpha$ , *TOP2A*) в остеогенезе не опре-

делена [32]. Некоторые исследователи предполагают, что *TOP2A* экспрессируется в остеобластах и что паратиреоидный гормон может подавлять пролиферацию остеобластов, частично регулируя экспрессию *TOP2A* [33]. Таким образом, вероятно, *TOP2A* играет роль в формировании остеокластов [139]. Однако ранее Feister и соавт. (1997) сообщили, что *TOP2A* не экспрессируется в зрелых остеобластах на поверхности трабекул [34].

Выявлена неожиданная связь между остеогенезом и геном кристаллином-В (*CRYAB*), обнаруженным Kulterer В. и соавт. (2007) [65]. Его формы представляют собой небольшие белки теплового шока и состоят из двух генных продуктов:  $\alpha$ -А и  $\alpha$ -В.  $\alpha$ -А преимущественно ограничивается хрусталиком глаза позвоночных, где он поддерживает прозрачность и показатель преломления хрусталика, тогда как  $\alpha$ -В широко экспрессируется во многих тканях и органах [63]. Кроме того, в статье Furushima и соавт. (2002) [78] описано исследование роли генов-кандидатов для генетических детерминант, связанных с окостенением задней продольной связки позвоночника (OPLL), преобладающей миелопатией среди популяции японцев. Гены-кандидаты для исследования были получены с помощью кДНК-анализа микрочипов профилей экспрессии генов во время остеобластической дифференцировки МСК. Среди 24 генов, идентифицированных в анализе микрочипов кДНК, которые могут быть связаны с метаболизмом кости, *CRYAB* был единственным геном, который показал существенные признаки сцепления. Далее Lambrecht и соавт. (2009) сообщили о снижении экспрессии *CRYAB* в дедифференцированных хондроцитах, что указывает на то, что *CRYAB*, возможно, играет роль в процессе хондрогенной дифференцировки [68]. Исследования данного гена-кандидата [38] позволили также выявить связь *CRYAB* с остеогенезом. И только в 2019 году, в статье [145] авторы определили место *CRYAB* в сигнальном пути Wnt в процессе остеогенеза. Согласно данным литературы, хондрогенез и остеогенез имеют общие пути и регуляцию, в связи с чем могут возникать трудности идентификации генов кандидатов.

Новые исследования помогают найти новые мишени для регуляции дифференцировочного потенциала МСК. Так, *Id4* (*Inhibitor of DNA Binding 4*), найденный как кандидат в маркеры позднего остеогенеза, по предположению исследователей, должен подавляться для продолжения процесса остеодифференцировки [65]. Однако следующие исследования показали обратную картину, в которой недостаток *Id4* резко снижал

дифференцировку остеобластов и стимулировал дифференцировку в сторону адипоцитов [79]. С другой стороны, нокдаун *Id4* в адипоген-индуцированных клетках ST2 увеличивал экспрессию гена рецепторов активатора пролиферации пероксисом, главного регулятора дифференцировки адипоцитов (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ 2, *Ppar $\gamma$ 2*). Аналогичные результаты наблюдались в клетках костного мозга бедра и голени у мышей с дефицитом *Id4* белка [65]. Механизм *Id4*, способствующий дифференцировке остеобластов, связан с *Id4*-опосредованным высвобождением фактора транскрипции *Hes1* (*hairly and enhancer of split-1*) из комплексов *Hes1-Hey2*. *Hes1* повышает стабильность и транскрипционную активность *Runx2*, ключевой молекулы дифференцировки остеобластов, что приводит к повышенной экспрессии генов, специфичных для остеобластов [79].

Таким образом, молекулярно-генетические механизмы дифференцировки МСК в остеобласты сложны и являются предметом текущих фундаментальных исследований. Несмотря на некоторые трудности в дальнейшей идентификации генов, исследования в масштабе генома с использованием секвенаторов следующего поколения позволят по-новому взглянуть на генные регуляции, сместив интерес от локальных генных регуляций к множественным измерениям генно-регуляторного ландшафта, который объединяет первичные действия регуляторов транскрипции, энхансерного ландшафта и трехмерную архитектуру хроматина. Раскрытие этого ландшафта даст новое понимание поведения МСК и развития организма в целом [47].

#### **Роль воспалительных цитокинов и хемокинов в остеогенезе**

МСК секретируют большое количество цитокинов, которые регулируют воспалительный процесс. Однако в литературе все еще недостаточно информации относительно полного секретомы МСК: довольно редко одновременно анализируется более пяти цитокинов/факторов роста. Данные, приведенные в литературе, часто противоречат друг другу [86]. Еще менее систематизированы факты потенциального остеогенного эффекта воспалительных цитокинов/хемокинов на МСК по ауто- и паракринному механизму регуляции.

Жизнеспособность и функционирование МСК, как и любых других клеток, зависят от условий микросреды: повреждение, воспаление, гипоксия, опухолевые образования, в том числе посредством изменения цитокинового профиля

биологических жидкостей и клеток микроокружения, изменяют биологию МСК [101].

Оценка паракринного потенциала МСК из разных тканевых источников очень важна, так как это является одним из определяющих условий (наряду с межклеточными контактами) для выявления их способности взаимодействовать с соседними клетками. МСК являются источником разнообразных цитокинов и трофических факторов (в частности IL-6, IL-8, MCP-1, VEGF, OPG и TIMP-2), однако тип и уровень секреции цитокинов варьируется в зависимости от тканевого источника [94]. Этот факт свидетельствует в пользу того, что специфическое тканевое микроокружение (ниша) МСК контролирует их секреторную активность.

Вариабельности секретома МСК посвящено значительное количество публикаций. На запрос «mesenchymal stem cell secretome» Национальная библиотека медицины Национального института здоровья США выдала 719 результатов. Постепенно сложилось понимание, что после травмы костей, для их эффективной репарации, необходимо воспаление, оптимальное по амплитуде и продолжительности [75]. Так, в исследовании мышей с двойным нокаутом гена TNF $\alpha$  (p55<sup>-/-</sup>/p75<sup>-/-</sup>) Gerstenfeld и соавт. [35] показали, что для правильного восстановления кости необходимы провоспалительные сигналы, так как животные не могли инициировать формирование кости и имели заметно сниженную экспрессию мРНК коллагена 1-го типа и *BGP*. Xing и соавт. [136] на мышцах CCR2<sup>-/-</sup> показали, что воспаление имеет решающее значение для заживления костей; при нарушении связи хемокинового рецептора CCR2 с MCP-1 воспаление и заживление костей нарушались [36]. Постоянно дискутируется значение про- и противовоспалительных и иммуномодуляторных биомолекул для остеодифференцировки МСК и закладки ниш стволовых клеток [36, 136], для реализации разных этапов остеогенеза/остеолизиса и ремоделирования кости [36, 44, 47].

В русле относительно нового формирующегося направления «остеоиммунология» [78, 108], на основе собственного опыта, мы сформировали таблицу 1, в которой представлены 22 фактора — воспалительные цитокины и хемокины с остеомодулирующими эффектами, описанными в научной литературе.

Таким образом, цитокиновая/хемокиновая сеть, формируемая не только МСК, но и клетками тканевого микроокружения и мононуклеарными лейкоцитами и другими клетками крови (гранулоциты, тромбоциты), мигрирующими

в зону воспаления/повреждения [75], способна оказывать значительное влияние на остеогенные свойства МСК. В то же время пока непонятен, но представляет большой интерес вопрос о том, реализуется ее остеомодулирующий эффект через собственные сигнальные пути и/или имеет перекрестные молекулярно-генетические связи с известными генами остеодифференцировки МСК.

#### **Биомеханические сигналы к дифференцировке МСК**

Понимание того, как МСК, полученные из взрослых тканей, реагируют на (био)механические сигналы, является важной областью исследований и имеет значение для тканевой инженерии и регенеративной медицины. По-видимому, обширное направление «механотрансдукция» [1, 7, 40] во многом сложилось и активно развивается в тесной связи с изучением реакции клеток и тканей на разнообразные механические свойства и рельеф материалов для медицины [31].

Многочисленные исследования подтверждают, что механические силы, даже без дополнительных биохимических стимулов, достаточны для того, чтобы способствовать дифференцировке и созреванию постнатальных МСК [81]. Например, механическая нагрузка в виде циклического напряжения или колебательного потока жидкости [111], сдвигают баланс процессов коммитирования от адипогенеза к остеогенезу и способствуют формированию костных и мышечных тканей *in vivo* и *in vitro* [80, 144].

Достижения в понимании генетических и молекулярных механизмов регуляции физиологии остеобластов и остеокластов [92] показали, что одним из факторов, определяющих клеточную дифференцировку, является эластичность ЭЦМ [30].

Клетки существуют в тканях, имеющих ЭЦМ разной степени жесткости, от мягкой мозговой ткани до твердой кортикальной кости. *In vitro* было показано, что жесткость матрикса или субстрата играет важную роль в регуляции дифференцировки МСК [54, 126]. При культивировании клеток на 2D-субстратах, которые имитировали жесткость физиологической нейророгенной, миогенной и остеогенной среды, МСК принимали фенотип, соответствующий жесткости ткани, что продемонстрировано клеточной морфологией, маркерами транскрипции и продукцией белка [30]. В аналогичном эксперименте МСК, высеянные на мягкие субстраты, обладали большим адипогенным и хондрогенным потенциалом [95]. В таких 2D-культуральных системах жесткость субстрата обычно влияет на морфологию клеток, тогда как в некоторых 3D-гидрогелях МСК сохраняют сферическую морфологию не-

**ТАБЛИЦА 1. ЦИТОКИНЫ, ФАКТОРЫ РОСТА И ХЕМОКИНЫ С ОСТЕОМОДУЛИРУЮЩИМ ПОТЕНЦИАЛОМ**

TABLE 1. CYTOKINES, GROWTH FACTORS AND CHEMOKINES WITH OSTEOMODULATORY POTENTIAL

Биомолекулы** Biomolecules**	Влияние на сеть МСК, остеобластов и остеокластов; костное ремоделирование Influence on the network of MSCs, osteoblasts and osteoclasts; bone remodeling	Ссылка Reference
IL-1	+/-*	[7, 86]
IL-1ra	+	[105]
IL-2	+	[141]
IL-4	+	[144]
IL-5	?*	[80]
IL-6	+/-	[75]
IL-9	?	[15]
IL-10	+	[75]
IL-12	+	[141]
IL-13	+	[25, 86]
IL-17	+/-	[75]
TNF $\alpha$	+/-	[7, 86]
IFN $\gamma$	-	[126]
G-CSF	+	[54]
GM-CSF	+	[106]
bFGF	+	[129]
VEGF	+	[129]
PDGF-BB	+	[24]
Eotaxin (CCL11)	+	[117]

Примечание. \* – (+/-) эффект противоречивый; (?) эффект не установлен согласно цитируемой ссылке.  
\*\* – антагонист рецептора интерлейкина 1 (IL-1ra); фактор некроза опухоли альфа (TNF $\alpha$ ), интерферон-гамма (IFN $\gamma$ ), колониестимулирующий фактор гранулоцитов (G-CSF) и гранулоцитов/моноцитов (GM-CSF), фактор роста фибробластов (FGF), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста из тромбоцитов (PDGF-BB).

Note. \*, (+/-) contradictory effect; (?) the effect is not set according to the cited reference. \*\*, interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra); tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), interferon-gamma (IFN $\gamma$ ), colony-stimulating factor of granulocytes (G-CSF) and granulocyte/monocytes (GM-CSF), fibroblast growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF-BB).

зависимо от жесткости гидрогеля [106, 129]. Несмотря на это, судьба инкапсулированных МСК обычно зависит от жесткости гидрогеля, причем более жесткие гели поддерживают остеогенез, а более мягкие – адипогенез [24, 106].

Несмотря на значительный прогресс в понимании того, что механические сигналы воспринимаются и преобразуются в МСК, оказывая влияние на их поведение (в том числе на процессы пролиферации и дифференцировки), многие механизмы остаются до конца не выясненными [122].

Еще в 1964 году Curtis и Varde предположили [21], а в конце XX века доказали значение подобных сигналов в контроле клеточного поведения [20]. Морфология МСК и их форма модулируется взаимодействием поверхности клетки с окружающей средой. Недифференцированные прилипшие МСК обычно имеют фибробластоподобную форму и хорошо распределяются на адгезивной подложке, в то время как любые дифференцировочные перестройки взаимосвязаны с глубокими преобразованиями клеточной формы [82, 91]. Прикрепление клеток и их пролиферация зависят от топографии поверхности, при этом цитоскелет проявляет более высокое напряжение на более грубых [23] или, наоборот, наноструктурированных поверхностях [116].

Mitchison и соавт. было показано, что распознавание механических раздражителей происходит через уникальный механизм, называемый механотрансдукцией [107]. Компоненты цитоскелета являются основными механосенсорами и механотрансмиттерами (актин/миозиновый комплекс, микротрубочки) этой системы [81, 111].

Spiegelman и Farmer (1982) первыми показали, что дифференцировка МСК связана с перестройкой их цитоскелета [120]. Тогда как McBeath и соавт. (2004) убедительно доказали, что форма клетки является ключевым регулятором дифференцировки МСК и определяется как внутренней конфигурацией цитоскелета, так и внешними взаимодействиями с внеклеточным матриксом и соседними клетками [115]. На небольших островках искусственной поверхности, где МСК принимали округлую морфологию, преобладал адипогенез, в то время как на более крупных участках, где МСК распластывались, отмечалась дифференцировка в остеогенном направлении [71]. Более подробно подобные исследования, относящиеся к поиску количественных параметров ниш для МСК, представлены в обзоре [17].

Исследование McBeath и соавт. (2004) также продемонстрировало, что форма клетки регулирует активность трансформирующего проте-

ина RhoA (Ras homolog family member A, RhoA) и Rho-ассоциированной протеинкиназы (Rho-associated protein kinase, ROCK). RhoA является ключевым регулятором сократимости, а ROCK — эффектором Rho, участвующим в сокращении миозина. Ингибирование ROCK способствует переключению клонов клеток с остеогенного на адипогенный фенотип, в то время как активация RhoA в клетках, подвергшихся воздействию адипогенной среды, способствует формированию остеогенного фенотипа, указывая на то, что клеточная сократимость контролирует дифференцировку клонов МСК по остеогенному или адипогенному направлению [103, 122].

Prowse P.D. (2013) подтвердили, что топография искусственного матрикса способна регулировать остеогенную дифференцировку МСК, посредством изменения цитоскелета [99]. Было высказано предположение, что распределение актинового цитоскелета, в частности нитевидного актина (F-актина), изменяется на шероховатых поверхностях [77]. Актиновый цитоскелет играет важную роль в остеогенной дифференцировке МСК [81], модифицируясь и изменяясь по мере того, как МСК дифференцируются в остеобласты: вместо большого количества тонких параллельных микрофиламентных пучков, распространяющихся по всей цитоплазме в недифференцированных МСК, появляется несколько толстых пучков актиновых нитей, расположенных на периферии дифференцированных клеток [81]. По данным McCafferty M.M. и соавт. (2014), жесткость, топография и химия поверхности могут вызывать ремоделирование цитоскелета и формирование фокальной адгезии, которые происходят до этапа дифференцировки МСК, через опосредованные интегрином сигнальные пути [83].

Изменение цитоскелета может влиять на организацию и распределение органелл и ДНК, что регулирует функционирование и жизнедеятельность клеток [128]. Shafrir Y. и соавт. (2002) установили, что микрофиламенты пересекают ядерные поры и соединяются с ядерной мембраной, тем самым обеспечивая путь для прямого прохождения сигналов от механических стимулов к хромосомному аппарату [113]. Изменение структуры цитоскелета приводит к передаче сигналов в ядро и ассоциируется с активацией ядерных транскрипционных факторов Yes-связанных белков (Yes-associated protein, YAP)/PDZ-связывающими мотивами (PDZ-binding motif, TAZ), регулируемых актиновым цитоскелетом, что объясняет участие механических стимулов в остеогенной дифференцировке МСК [29, 49]. Транскрипционные факторы YAP/TAZ участвуют

в дифференцировке МСК посредством индукции ко-активатора RUNX2 — остеобласт-специфического транскрипционного фактора, влияющего на экспрессию генов остеодифференцировки [19, 123]. Yang W. и соавт. (2016) убедительно продемонстрировали, что различная топография поверхности по-разному влияет на активацию транскрипционных факторов YAP/TAZ, что приводит к изменению уровня относительной экспрессии генов остеодифференцировки [140].

Важно отметить, что МСК реагируют не только на (био)механические свойства окружающего ЭЦМ, но и на внешние механические сигналы, такие как поток жидкости, гидростатическое давление, нагрузка на сжатие, растяжение и скручивание [57]. Было показано, что тип, частота, величина и продолжительность таких сигналов влияют на дифференцировку МСК [122]. Более того, продемонстрировано, что воздействие 10% циклической растягивающей деформации не только увеличивает остеогенный потенциал МСК, но также увеличивает экспрессию ангиогенных факторов [16, 17, 125], что предполагает влияние механической нагрузки как на ангиогенез, так и на остеогенез.

Ангиогенез является важным этапом процессов костеобразования в связи с тем, что эндотелиальные клетки (ЭК) играют ключевую роль в развитии костей, создавая оптимальное напряжение кислорода и концентрацию биомолекул, необходимые для остеогенеза во время эндохондральной оссификации. Совместное культивирование человеческих ЭК и МСК увеличивает активность щелочной фосфатазы (ранний остеогенный маркер) и минерализацию, когда два типа клеток находятся в прямом контакте [121].

Таким образом, механизмы дифференцировки МСК в остеобласты сложны и являются предметом текущих и будущих фундаментальных и клинических исследований. Несмотря на трудности в идентификации и интерпретации результатов изучения генов и сигнальных путей реализации (эпи)генетических эффектов, технологическое развитие позволит, по-видимому, сместить акцент от точечного изучения эффектов локальных генов к множественным измерениям генно-регуляторного профиля и биомолекул, ответственных за реализацию многочисленных, полностью не изученных остеогенных факторов эндогенного и экзогенного происхождения. Представляет интерес вопрос о том, реализуются ли многочисленные остеомодулирующие эффекты через специфические сигнальные пути и/или имеются перекрестные связи с известными генами остеогенной дифференцировки МСК.

## Список литературы / References

1. Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Норкин И.К., Иванов П.А., Хлусов И.А., Шунькин Е.О., Тодосенко Н.М., Мелащенко Е.С., Литвинова Л.С. Клеточно-молекулярные аспекты воспаления, ангиогенеза и остеогенеза. Краткий обзор // Цитология, 2020. № 62. С. 305-315. [Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Malashchenko V.V., Norkin I.K., Ivanov P.A., Khlusov I.A., Shunkin E.O., Todosenko N.M., Melashchenko E.S., Litvinova L.S. Cellular and molecular aspects of inflammation, angiogenesis and osteogenesis. A brief overview. *Tsitologiya = Cytology*, 2020, Vol. 62, pp. 305-315. (In Russ.)]
2. Alge D.L., Zhou D., Adams L.L., Wyss B.K., Shadday M.D., Woods E.J. Donor-matched comparison of dental pulp stem cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rat model. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 2010, Vol. 4, no. 1, pp. 73-81.
3. Alliston T., Choy L., Ducey P., Karsenty G., Derynck R. TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO J.*, 2001, Vol. 20, no. 9, pp. 2254-2272.
4. Amati E., Sella S., Perbellini O., Alghisi A., Bernardi M., Chieragato K. Generation of mesenchymal stromal cells from cord blood: evaluation of *in vitro* quality parameters prior to clinical use. *Stem Cell Res. Ther.*, 2017, Vol. 8, 14. doi: 10.1186/s13287-016-0465-2.
5. Appaix F., Nissou M.-F., van der Sanden B., Dreyfus M., Berger F., Issartel J.-P. Brain mesenchymal stem cells: the other stem cells of the brain? *World J. Stem Cells.*, 2014, Vol. 6, no. 2, pp. 134-143.
6. Ardeshiryajimi A., Mossahebi-Mohammadi M., Vakilian S., Langroudi L., Seyedjafari E., Atashi A. Comparison of osteogenic differentiation potential of human adult stem cells loaded on bioceramic-coated electrospun poly (L-lactide) nanofibres. *Cell Prolif.*, 2015, Vol. 48, no. 1, pp. 47-58.
7. Arron J.R., Choi Y. Bone versus immune system. *Nature*, 2000, Vol. 408, no. 6812, pp. 535-536.
8. Baker N., Sohn J., Tuan R.S. Promotion of human mesenchymal stem cell osteogenesis by PI3-kinase/Akt signaling, and the influence of caveolin-1/cholesterol homeostasis. *Stem Cell Res. Ther.*, 2015, Vol. 6, 238. doi: 10.1186/s13287-015-0225-8.
9. Bershadsky A.D., Balaban N.Q., Geiger B. Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2003, Vol. 19, pp. 677-695.
10. Bialek P., Kern B., Yang X., Schrock M., Susic D., Hong N. A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. *Dev. Cell*, 2004, Vol. 6, no. 3, pp. 423-435.
11. Bieback K., Netsch P. Isolation, Culture, and characterization of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells. *Methods Mol. Biol. Clifton N.J.*, 2016, Vol. 1416, pp. 245-258.
12. Bourin P., Bunnell B.A., Casteilla L., Dominici M., Katz A.J., March K.L. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, 2013, Vol. 15, no. 6, pp. 641-648.
13. Brennan M.A., Renaud A., Guilloton F., Mebarki M., Trichet V., Sensebé L. Inferior *In vivo* osteogenesis and superior angiogenesis of human adipose-derived stem cells compared with bone marrow-derived stem cells cultured in xeno-free conditions. *Stem Cells Transl. Med.*, 2017, Vol. 6, no. 12, pp. 2160-2172.
14. Brouhard G.J., Rice L.M. Microtubule dynamics: an interplay of biochemistry and mechanics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2018, Vol. 19, no. 7, pp. 451-463.
15. Bryington M., Mendonça G., Nares S., Cooper L.F. Osteoblastic and cytokine gene expression of implant-adherent cells in humans. *Clin. Oral Implants Res.*, 2014, Vol. 25, no. 1, pp. 52-58.
16. Charoanpanich A., Wall M.E., Tucker C.J., Andrews D.M.K., Lalush D.S., Dirschl D.R. Cyclic tensile strain enhances osteogenesis and angiogenesis in mesenchymal stem cells from osteoporotic donors. *Tissue Eng. Part A*, 2014, Vol. 20, no. 1-2, pp. 67-78.
17. Charoanpanich A., Wall M.E., Tucker C.J., Andrews D.M.K., Lalush D.S., Lobo E.G. Microarray analysis of human adipose-derived stem cells in three-dimensional collagen culture: osteogenesis inhibits bone morphogenic protein and Wnt signaling pathways, and cyclic tensile strain causes upregulation of proinflammatory cytokine regulators and angiogenic factors. *Tissue Eng. Part A*, 2011, Vol. 17, no. 21-22, pp. 2615-2627.
18. Choi W.Y., Jeon H.G., Chung Y., Lim J.J., Shin D.H., Kim J.M. Isolation and characterization of novel, highly proliferative human CD34/CD73-double-positive testis-derived stem cells for cell therapy. *Stem Cells Dev.*, 2013, Vol. 22, no. 15, pp. 2158-2173.
19. Cui C.B., Cooper L.F., Yang X., Karsenty G., Aukhil I. Transcriptional coactivation of bone-specific transcription factor Cbfa1 by TAZ. *Mol. Cell. Biol.*, 2003, Vol. 23, no. 3, pp. 1004-1013.
20. Curtis A., Wilkinson C. Topographical control of cells. *Biomaterials*, 1997, Vol. 18, no. 24, pp. 1573-1583.
21. Curtis A.S., Varde M. Control of cell behavior: topological factors. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1964, Vol. 33, pp. 15-26.
22. da Silva Meirelles L., Chagastelles P.C., Nardi N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.*, 2006, Vol. 119, no. 11, pp. 2204-2213.

23. Dalby M.J., Riehle M.O., Sutherland D.S., Agheli H., Curtis A.S.G. Morphological and microarray analysis of human fibroblasts cultured on nanocolumns produced by colloidal lithography. *Eur. Cell Mater.*, 2005, Vol. 9, pp. 1-8.
24. de la Riva B., Sánchez E., Hernández A., Reyes R., Tamimi F., López-Cabarcos E. Local controlled release of VEGF and PDGF from a combined brushite-chitosan system enhances bone regeneration. *J. Control. Release*, 2010, Vol. 143, no. 1, pp. 45-52.
25. Ding J., Ghali O., Lencel P., Broux O., Chauveau C., Devedjian J.C. TNF-alpha and IL-1beta inhibit RUNX2 and collagen expression but increase alkaline phosphatase activity and mineralization in human mesenchymal stem cells. *Life Sci.*, 2009, Vol. 84, no. 15-16, pp. 499-504.
26. Dodson M.V., Hausman G.J., Guan L., Du M., Rasmussen T.P., Poulos S.P. Skeletal muscle stem cells from animals I. Basic cell biology. *Int. J. Biol. Sci.*, 2010, Vol. 6, no. 1, pp. 465-744.
27. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006, Vol. 8, no. 4, pp. 315-317.
28. Ducey P., Schinke T., Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*, 2000, Vol. 289, no. 5484, pp. 1501-1504.
29. Dupont S., Morsut L., Aragona M., Enzo E., Giulitti S., Cordenonsi M. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, 2011, Vol. 474, no. 7350, pp. 179-183.
30. Engler A.J., Sen S., Sweeney H.L., Discher D.E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 2006, Vol. 126, no. 4, pp. 677-689.
31. Ermis M., Antmen E., Hasirci V. Micro and nanofabrication methods to control cell-substrate interactions and cell behavior: a review from the tissue engineering perspective. *Bioact. Mater.*, 2018, Vol. 3, no. 3, pp. 355-369.
32. Fan T., Qu R., Yu Q., Sun B., Jiang X., Yang Y. Bioinformatics analysis of the biological changes involved in the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J. Cell. Mol. Med.*, 2020, Vol. 24, no. 14, pp. 7968-7978.
33. Feister H.A., Onyia J.E., Miles R.R., Yang X., Galvin R., Hock J.M. The expression of the nuclear matrix proteins NuMA, topoisomerase II-alpha, and -beta in bone and osseous cell culture: regulation by parathyroid hormone. *Bone*, 2000, Vol. 26, pp. 227-234.
34. Feister H.A., Swartz D., Odgren P.R., Holden J., Hock J.M., Onyia J. Topoisomerase II expression in osseous tissue. *J. Cell. Biochem.*, 1997, Vol. 67, no. 4, pp. 451-465.
35. Gerstenfeld L.C., Cho T.J., Kon T., Aizawa T., Cruceta J., Graves B.D. Impaired intramembranous bone formation during bone repair in the absence of tumor necrosis factor-alpha signaling. *Cells Tissues Organs*, 2001, Vol. 169, no. 3, pp. 285-294.
36. Gibon E., Lu L., Goodman S.B. Aging, inflammation, stem cells, and bone healing. *Stem Cell Res. Ther.*, 2016, Vol. 7, 44. doi: 10.1186/s13287-016-0300-9.
37. Gneocchi M. Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols. 2<sup>nd</sup> edition. Humana Press, 2016.
38. Granéli C., Thorfve A., Ruetschi U., Brisby H., Thomsen P., Lindahl A. Novel markers of osteogenic and adipogenic differentiation of human bone marrow stromal cells identified using a quantitative proteomics approach. *Stem Cell Res.*, 2014, Vol. 12, no. 1, pp. 153-165.
39. Grassel S., Ahmed N. Influence of cellular microenvironment and paracrine signals on chondrogenic differentiation. *Front. Biosci.*, 2007, Vol. 12, pp. 4946-4956.
40. Greenblatt M.B., Shim J.-H. Osteoimmunology: a brief introduction. *Immune Netw.*, 2013, Vol. 13, no. 4, pp. 111-115.
41. Gu K., Zhang L., Jin T., Rutherford R.B. Identification of potential modifiers of Runx2/Cbfa1 activity in C2C12 cells in response to bone morphogenetic protein-7. *Cells Tissues Organs*, 2004, Vol. 176, no. 1-3, pp. 28-40.
42. Gurkan U.A., Akkus O. The mechanical environment of bone marrow: a review. *Ann. Biomed. Eng.*, 2008, Vol. 36, no. 12, pp. 1978-1991.
43. Hart D.A. Why mesenchymal stem/progenitor cell heterogeneity in specific environments? Implications for tissue engineering applications following injury or degeneration of connective tissues. *J. Biomed. Sci. Eng.*, 2014, Vol. 7, 526. doi: 10.4236/jbise.2014.78054.
44. He N., Zhang L., Cui J., Li Z. Bone marrow vascular niche: home for hematopoietic stem cells. *Bone Marrow Res.*, 2014, 128436. doi: 10.1155/2014/128436.
45. Heo J.S., Choi Y., Kim H.-S., Kim H.O. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *Int. J. Mol. Med.*, 2016, Vol. 37, no. 1, pp. 115-125.
46. Herzog E.L., Chai L., Krause D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*, 2003, Vol. 102, no. 10, pp. 3483-3493.
47. Hojo H., Chung U.-I., Ohba S. Identification of the gene-regulatory landscape in skeletal development and potential links to skeletal regeneration. *Regen. Ther.*, 2017, Vol. 6, pp. 100-107.

48. Holzwarth C., Vaegler M., Gieseke F., Pfister S.M., Handgretinger R., Kerst G. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *BMC Cell Biol.*, 2010, Vol. 11, 11. DOI: 10.1186/1471-2121-11-11.
49. Hong J.-H., Hwang E.S., McManus M.T., Amsterdam A., Tian Y., Kalmukova R. TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science*, 2005, Vol. 309, no. 5737, pp. 1074-1078.
50. Huebsch N., Arany P.R., Mao A.S., Shvartsman D., Ali O.A., Bencherif S.A. Harnessing traction-mediated manipulation of the cell/matrix interface to control stem-cell fate. *Nat. Mater.*, 2010, Vol. 9, no. 6, pp. 518-526.
51. Hung B.P., Hutton D.L., Kozielski K.L., Bishop C.J., Naved B., Green J.J. Platelet-derived growth factor bb enhances osteogenesis of adipose-derived but not bone marrow-derived mesenchymal stromal/stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio*, 2015, Vol. 33, no. 9, pp. 2773-2784.
52. Hutton D.L., Moore E.M., Gimble J.M., Grayson W.L. Platelet-derived growth factor and spatiotemporal cues induce development of vascularized bone tissue by adipose-derived stem cells. *Tissue Eng. Part A*, 2013, Vol. 19, no. 17-18, pp. 2076-2086.
53. Introna M., Lucchini G., Dander E., Galimberti S., Rovelli A., Balduzzi A. Treatment of graft versus host disease with mesenchymal stromal cells: a phase I study on 40 adult and pediatric patients. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2014, Vol. 20, no. 3, pp. 375-381.
54. Ishida K., Matsumoto T., Sasaki K., Mifune Y., Tei K., Kubo S. Bone regeneration properties of granulocyte colony-stimulating factor via neovascularization and osteogenesis. *Tissue Eng. Part A*, 2010, Vol. 16, no. 10, pp. 3271-3284.
55. Jäger M., Sager M., Knipper A., Degistirici O., Fischer J., Kögler G. *In vivo* and *in vitro* bone regeneration from cord blood derived mesenchymal stem cells. *Orthopade*, 2004, Vol. 33, no. 12, pp. 1361-1372.
56. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002, Vol. 418, no. 6893, pp. 41-49.
57. Kelly D.J., Jacobs C.R. The role of mechanical signals in regulating chondrogenesis and osteogenesis of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.*, 2010, Vol. 90, no. 1, pp. 75-85.
58. Khlusov I.A., Litvinova L.S., Khlusova M.Y., Yurova K.A. Concept of hematopoietic and stromal niches for cell-based diagnostics and regenerative medicine (a review). *Curr. Pharm. Des.*, 2018, Vol. 24, no. 26, pp. 3034-3054.
59. Kim I.S., Song Y.M., Cho T.H., Park Y.D., Lee K.B., Noh I. *In vitro* response of primary human bone marrow stromal cells to recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the early and late stages of osteoblast differentiation. *Dev. Growth Differ.*, 2008, Vol. 50, no. 7, pp. 553-564.
60. Ko K.S., McCulloch C.A. Intercellular mechanotransduction: cellular circuits that coordinate tissue responses to mechanical loading. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, Vol. 285, no. 5, pp. 1077-1083.
61. Kowanz M., Valcourt U., Bergström R., Heldin C.-H., Moustakas A. Id2 and Id3 define the potency of cell proliferation and differentiation responses to transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein. *Mol. Cell. Biol.*, 2004, Vol. 24, no. 10, pp. 4241-4254.
62. Kozłowska U., Krawczyński A., Futoma K., Jurek T., Rorat M., Patrzalek D. Similarities and differences between mesenchymal stem/progenitor cells derived from various human tissues. *World J. Stem Cells*, 2019, Vol. 11, no. 6, pp. 347-374.
63. Kramps J.A., de Man B.M., de Jong W.W. The primary structure of the B2 chain of human alpha-crystallin. *FEBS Lett.*, 1977, Vol. 74, no. 1, pp. 82-84.
64. Kubo H., Shimizu M., Taya Y., Kawamoto T., Michida M., Kaneko E. Identification of mesenchymal stem cell (MSC)-transcription factors by microarray and knockdown analyses, and signature molecule-marked MSC in bone marrow by immunohistochemistry. *Genes Cells*, 2009, Vol. 14, no. 3, pp. 407-424.
65. Kulterer B., Friedl G., Jandrositz A., Sanchez-Cabo F., Prokesch A., Paar C. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics*, 2007, Vol. 8, 70. doi: 10.1186/1471-2164-8-70.
66. Kunitatsu R., Nakajima K., Awada T., Tsuka Y., Abe T., Ando K. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2018, Vol. 501, no. 1, pp. 193-198.
67. Kwon A., Kim Y., Kim M., Kim J., Choi H., Jekarl D.W. Tissue-specific differentiation potency of mesenchymal stromal cells from perinatal tissues. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, 23544. doi: 10.1038/srep23544.
68. Lambrecht S., Verbruggen G., Elewaut D., Deforce D. Differential expression of alphaB-crystallin and evidence of its role as a mediator of matrix gene expression in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, 2009, Vol. 60, no. 1, pp. 179-188.
69. Li C., Wu X., Tong J., Yang X., Zhao J., Zheng Q. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Res. Ther.*, 2015, Vol. 6, 55. doi: 10.1186/s13287-015-0066-5.

70. Li X., Bai J., Ji X., Li R., Xuan Y., Wang Y. Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation. *Int. J. Mol. Med.*, 2014, Vol. 34, no. 3, pp. 695-704.
71. Lian J.B., Javed A., Zaidi S.K., Lengner C., Montecino M., van Wijnen A.J. Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: role of Runx/Cbfa/AML factors. *Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr.*, 2004, Vol. 14, no. 1-2, pp. 1-41.
72. Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Todosenko N.M., Malashchenko V.V. Secretion of hematopoietic niche signal molecules under conditions of osteogenic differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells induced by relief calcium phosphate coating. *Biochem. Mosc. Suppl. Ser. B Biomed. Chem.*, 2019, Vol. 13, pp. 341-348.
73. Liu F., Malaval L., Aubin J.E. The mature osteoblast phenotype is characterized by extensive plasticity. *Exp. Cell Res.*, 1997, Vol. 232, no. 1, pp. 97-105.
74. Liu T.M. Stemness of mesenchymal stem cells. *J Stem Cell Ther. Transplant.*, 2017, Vol. 1, pp. 71-73.
75. Loi F., Córdova L.A., Pajarinen J., Lin T., Yao Z., Goodman S.B. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone*, 2016, Vol. 86, pp. 119-130.
76. Long F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2011, Vol. 13, no. 1, pp. 27-38.
77. Lüthen F., Lange R., Becker P., Rychly J., Beck U., Nebe J.G.B. The influence of surface roughness of titanium on beta1- and beta3-integrin adhesion and the organization of fibronectin in human osteoblastic cells. *Biomaterials*, 2005, Vol. 26, no. 15, pp. 2423-2440.
78. Maeda S., Nobukuni T., Shimo-Onoda K., Hayashi K., Yone K., Komiya S. Sortilin is upregulated during osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells and promotes extracellular matrix mineralization. *J. Cell. Physiol.*, 2002, Vol. 193, no. 1, pp. 73-79.
79. Maeda Y., Tsuji K., Nifuji A., Noda M. Inhibitory helix-loop-helix transcription factors Id1/Id3 promote bone formation *in vivo*. *J. Cell. Biochem.*, 2004, Vol. 93, no. 2, pp. 337-344.
80. Magnusson L.U., Hagberg Thulin M., Plas P., Olsson A., Damber J.-E., Welén K. Tasquinimod inhibits prostate cancer growth in bone through alterations in the bone microenvironment. *Prostate*, 2016, Vol. 76, no. 4, pp. 383-393.
81. Mathieu P.S., Lobo E.G. Cytoskeletal and focal adhesion influences on mesenchymal stem cell shape, mechanical properties, and differentiation down osteogenic, adipogenic, and chondrogenic pathways. *Tissue Eng. Part B Rev.*, 2012, Vol. 18, no. 6, pp. 436-444.
82. McBeath R., Pirone D.M., Nelson C.M., Bhadriraju K., Chen C.S. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev. Cell*, 2004, Vol. 6, no. 4, pp. 483-495.
83. McCafferty M.M., Burke G.A., Meenan B.J. Mesenchymal stem cell response to conformal sputter deposited calcium phosphate thin films on nanostructured titanium surfaces. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2014, Vol. 102, no. 10, pp. 3585-3597.
84. Medhat D., Rodríguez C.I., Infante A. Immunomodulatory effects of MSCs in bone healing. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 21, 5467. doi: 10.3390/ijms20215467.
85. Menuki K., Mori T., Sakai A., Sakuma M., Okimoto N., Shimizu Y. Climbing exercise enhances osteoblast differentiation and inhibits adipogenic differentiation with high expression of PTH/PTHrP receptor in bone marrow cells. *Bone*, 2008, Vol. 43, no. 3, pp. 613-620.
86. Mussano F., Genova T., Petrillo S., Roato I., Ferracini R., Munaron L. Osteogenic differentiation modulates the cytokine, chemokine, and growth factor profile of ASCs and SHED. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, Vol. 19, no. 5, 1454. doi: 10.3390/ijms19051454.
87. Nagamura-Inoue T., He H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: their advantages and potential clinical utility. *World J. Stem Cells*, 2014, Vol. 6, no. 2, pp. 195-202.
88. Niemeyer P., Kornacker M., Mehlhorn A., Seckinger A., Vohrer J., Schmal H. Comparison of immunological properties of bone marrow stromal cells and adipose tissue-derived stem cells before and after osteogenic differentiation *in vitro*. *Tissue Eng.*, 2007, Vol. 13, no. 1, pp. 111-121.
89. Ohashi K., Fujiwara S., Mizuno K. Roles of the cytoskeleton, cell adhesion and rho signalling in mechanosensing and mechanotransduction. *J. Biochem. (Tokyo)*, 2017, Vol. 161, no. 3, pp. 245-254.
90. Orciani M., Di Primio R. Skin-derived mesenchymal stem cells: isolation, culture, and characterization. *Methods Mol. Biol. Clifton N.J.*, 2013, Vol. 989, pp. 275-283.
91. Orr A.W., Helmke B.P., Blackman B.R., Schwartz M.A. Mechanisms of mechanotransduction. *Dev. Cell*, 2006, Vol. 10, no. 1, pp. 11-20.
92. Ozdemir T., Bowers D.T., Zhan X., Ghosh D., Brown J.L. Identification of key signaling pathways orchestrating substrate topography directed osteogenic differentiation through high-throughput siRNA Screening. *Sci. Rep.*, 2019, Vol. 9, 1001. doi: 10.1038/s41598-018-37554-y.

93. Parekh S.H., Chatterjee K., Lin-Gibson S., Moore N.M., Cicerone M.T., Young M.F. Modulus-driven differentiation of marrow stromal cells in 3D scaffolds that is independent of myosin-based cytoskeletal tension. *Biomaterials*, 2011, Vol. 32, pp. 2256-2264.
94. Park C.W., Kim K.-S., Bae S., Son H.K., Myung P.-K., Hong H.J. Cytokine secretion profiling of human mesenchymal stem cells by antibody array. *Int. J. Stem Cells*, 2009, Vol. 2, no. 1, pp. 59-68.
95. Park J.S., Chu J.S., Tsou A.D., Diop R., Tang Z., Wang A. The effect of matrix stiffness on the differentiation of mesenchymal stem cells in response to TGF- $\beta$ . *Biomaterials*, 2011, Vol. 32, no. 16, pp. 3921-3930.
96. Park S.-H., Sim W.Y., Min B.-H., Yang S.S., Khademhosseini A., Kaplan D.L. Chip-based comparison of the osteogenesis of human bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells under mechanical stimulation. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, e46689. DOI: 10.1371/journal.pone.0046689.
97. Pelekanos R.A., Sardesai V.S., Futrega K., Lott W.B., Kuhn M., Doran M.R. Isolation and expansion of mesenchymal stem/stromal cells derived from human placenta tissue. *J. Vis. Exp.*, 2016, Vol. 112, 54204. doi: 10.3791/54204.
98. Prockop D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 1997, Vol. 276, no. 5309, pp. 71-74.
99. Prowse P.D.H., Elliott C.G., Hutter J., Hamilton D.W. Inhibition of Rac and ROCK signalling influence osteoblast adhesion, differentiation and mineralization on titanium topographies. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, e58898. doi: 10.1371/journal.pone.0058898.
100. Rath S.N., Noeaid P., Arkudas A., Beier J.P., Strobel L.A., Brandl A. Adipose- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells display different osteogenic differentiation patterns in 3D bioactive glass-based scaffolds. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 2016, Vol. 10, no. 10, pp. E497-E509.
101. Rauch A., Haakonsson A.K., Madsen J.G.S., Larsen M., Forss I., Madsen M.R. Osteogenesis depends on commissioning of a network of stem cell transcription factors that act as repressors of adipogenesis. *Nat. Genet.*, 2019, Vol. 51, no. 4, pp. 716-727.
102. Rawadi G., Vayssière B., Dunn F., Baron R., Roman-Roman S. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J. Bone Miner. Res.*, 2003, Vol. 18, no. 10, pp. 1842-1853.
103. Roelen B.A.J., ten Dijke P. Controlling mesenchymal stem cell differentiation by TGF $\beta$  family members. *J. Orthop. Sci.*, 2003, Vol. 8, no. 5, pp. 740-748.
104. Roostalu J., Surrey T. Microtubule nucleation: beyond the template. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2017, Vol. 18, no. 11, pp. 702-710.
105. Rowland C.R., Glass K.A., Etyreddy A.R., Gloss C.C., Matthews J.R.L., Huynh N.P.T. Regulation of decellularized tissue remodeling via scaffold-mediated lentiviral delivery in anatomically-shaped osteochondral constructs. *Biomaterials*, 2018, Vol. 177, pp. 161-175.
106. Ruef N., Dolder S., Aeberli D., Seitz M., Balani D., Hofstetter W. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent CD11c-positive cells differentiate into active osteoclasts. *Bone*, 2017, Vol. 97, pp. 267-277.
107. Saidova A.A., Vorobjev I.A. Lineage commitment, signaling pathways, and the cytoskeleton systems in mesenchymal stem cells. *Tissue Eng. Part B Rev.*, 2020, Vol. 26, no. 1, pp. 13-25.
108. Schmidt-Bleek K., Kwee B.J., Mooney D.J., Duda G.N. Boon and bane of inflammation in bone tissue regeneration and its link with angiogenesis. *Tissue Eng. Part B Rev.*, 2015, Vol. 21, no. 4, pp. 354-364.
109. Schwarz U.S., Erdmann T., Bischofs I.B. Focal adhesions as mechanosensors: the two-spring model. *Biosystems*, 2006, Vol. 83, no. 2-3, pp. 225-232.
110. Sciaudone M., Gazzero E., Priest L., Delany A.M., Canalis E. Notch 1 impairs osteoblastic cell differentiation. *Endocrinology*, 2003, Vol. 144, no. 12, pp. 5631-5639.
111. Sen B., Xie Z., Case N., Thompson W.R., Uzer G., Styner M. mTORC2 regulates mechanically induced cytoskeletal reorganization and lineage selection in marrow-derived mesenchymal stem cells. *J. Bone Miner. Res.*, 2014, Vol. 29, no. 1, pp. 78-89.
112. Shafiee A., Seyedjafari E., Soleimani M., Ahmadbeigi N., Dinarvand P., Ghaemi N. A comparison between osteogenic differentiation of human unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Biotechnol. Lett.*, 2011, Vol. 33, no. 6, pp. 1257-1264.
113. Shafir Y., Forgacs G. Mechanotransduction through the cytoskeleton. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2002, Vol. 282, no. 3, pp. 479-486.
114. Shi M., Liu Z., Wang Y., Xu R., Sun Y., Zhang M. A pilot study of mesenchymal stem cell therapy for acute liver allograft rejection. *Stem Cells Transl. Med.*, 2017, Vol. 6, no. 12, pp. 2053-2061.
115. Sinha K. M., Zhou X. Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation. *J. Cell. Biochem.*, 2013, Vol. 114, no. 5, pp. 975-984.
116. Sniadecki N.J., Desai R.A., Ruiz S.A., Chen C.S. Nanotechnology for cell-substrate interactions. *Ann. Biomed. Eng.*, 2006, Vol. 34, no. 1, pp. 59-74.
117. Sohn D.H., Jeong H., Roh J.S., Lee H.-N., Kim E., Koh J.H. Serum CCL11 level is associated with radiographic spinal damage in patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol. Int.*, 2018, Vol. 38, no. 8, pp. 1455-1464.

118. Song I., Kim B.-S., Kim C.-S., Im G.-I. Effects of BMP-2 and vitamin D3 on the osteogenic differentiation of adipose stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2011, Vol. 408, no. 1, pp. 126-131.
119. Sonowal H., Kumar A., Bhattacharyya J., Gogoi P.K., Jaganathan B.G. Inhibition of actin polymerization decreases osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through p38 MAPK pathway. *J. Biomed. Sci.*, 2013, Vol. 20, 71. doi: 10.1186/1423-0127-20-71.
120. Spiegelman B.M., Farmer S.R. Decreases in tubulin and actin gene expression prior to morphological differentiation of 3T3 adipocytes. *Cell*, 1982, Vol. 29, no. 1, pp. 53-60.
121. Steward A.J., Cole J.H., Ligler F.S., Lobo E.G. Mechanical and vascular cues synergistically enhance osteogenesis in human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng. Part A*, 2016, Vol. 22, no. 15-16, pp. 997-1005.
122. Steward A.J., Kelly D.J. Mechanical regulation of mesenchymal stem cell differentiation. *J. Anat.*, 2015, Vol. 227, no. 6, pp. 717-731.
123. Stiehler M., Bunger C., Baatrup A., Lind M., Kassem M., Mygind T. Effect of dynamic 3-D culture on proliferation, distribution, and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2009, Vol. 89, no. 1, pp. 96-107.
124. Stocchero I.N., Stocchero G.F. Isolation of stem cells from human adipose tissue: technique, problems, and pearls. *Adipose Stem Cells and Regenerative Medicine*, 2011, pp. 13-18.
125. Sumanasinghe R.D., Bernacki S.H., Lobo E.G. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen matrices: effect of uniaxial cyclic tensile strain on bone morphogenetic protein (BMP-2) mRNA expression. *Tissue Eng.*, 2006, Vol. 12, no. 12, pp. 3459-3465.
126. Takayanagi H., Ogasawara K., Hida S., Chiba T., Murata S., Sato K. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature*, 2000, Vol. 408, no. 6812, pp. 600-605.
127. Thiagarajan L., Abu-Awwad H.A.-D.M., Dixon J.E. Osteogenic Programming of Human Mesenchymal Stem Cells with Highly Efficient Intracellular Delivery of RUNX2. *Stem Cells Transl. Med.*, 2017, Vol. 6, no. 12, pp. 2146-2159.
128. Thomas C.H., Collier J.H., Sfeir C.S., Healy K.E. Engineering gene expression and protein synthesis by modulation of nuclear shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, Vol. 99, no. 4, pp. 1972-1977.
129. Tong X., Chen X., Zhang S., Huang M., Shen X., Xu J. The effect of exercise on the prevention of osteoporosis and bone angiogenesis. *BioMed. Res. Int.*, 2019, Vol. 2019, 8171897. doi: 10.1155/2019/8171897.
130. Urist M.R., Strates B.S. Bone morphogenetic protein. *J. Dent. Res.*, 1971, Vol. 50, no. 6, pp. 1392-1406.
131. Wechsler M.E., Hermann B.P., Bizios R. Adult human mesenchymal stem cell differentiation at the cell population and single-cell levels under alternating electric current. *Tissue Eng. Part C Methods*, 2016, Vol. 22, no. 2, pp. 155-164.
132. Woo D.-H., Hwang H.S., Shim J.H. Comparison of adult stem cells derived from multiple stem cell niches. *Biotechnol. Lett.*, 2016, Vol. 38, no. 5, pp. 751-759.
133. Wu S., Xiao Z., Song J., Li M., Li W. Evaluation of BMP-2 enhances the osteoblast differentiation of human amnion mesenchymal stem cells seeded on nano-hydroxyapatite/collagen/poly(L-Lactide). *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, Vol. 19, no. 8, 2171. doi: 10.3390/ijms19082171.
134. Wu W., Le A.V., Mendez J.J., Chang J., Niklason L.E., Steinbacher D.M. Osteogenic performance of donor-matched human adipose and bone marrow mesenchymal cells under dynamic culture. *Tissue Eng. Part A*, 2015, Vol. 21, no. 9-10, pp. 1621-1632.
135. Wu X., Wang W., Meng C., Yang S., Duan D., Xu W. Regulation of differentiation in trabecular bone-derived mesenchymal stem cells by T cell activation and inflammation. *Oncol. Rep.*, 2013, Vol. 30, no. 5, pp. 2211-2219.
136. Xing Z., Lu C., Hu D., Yu Y., Wang X., Colnot C. Multiple roles for CCR2 during fracture healing. *Dis. Model Mech.*, 2010, Vol. 3, no. 7-8, pp. 451-458.
137. Xu L., Liu Y., Sun Y., Wang B., Xiong Y., Lin W. Tissue source determines the differentiation potentials of mesenchymal stem cells: a comparative study of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Stem Cell Res. Ther.*, 2017, Vol. 8, no. 1, 275. doi: 10.1186/s13287-017-0716-x.
138. Yamada Y., Nakamura S., Ito K., Sugito T., Yoshimi R., Nagasaka T. A feasibility of useful cell-based therapy by bone regeneration with deciduous tooth stem cells, dental pulp stem cells, or bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for clinical study using tissue engineering technology. *Tissue Eng. Part A*, 2010, Vol. 16, no. 6, pp. 1891-900.
139. Yamagishi T., Otsuka E., Hagiwara H. Reciprocal control of expression of mRNAs for osteoclast differentiation factor and OPG in osteogenic stromal cells by genistein: evidence for the involvement of topoisomerase II in osteoclastogenesis. *Endocrinology*, 2001, Vol. 142, no. 8, pp. 3632-3637.
140. Yang W., Han W., He W., Li J., Wang J., Feng H. Surface topography of hydroxyapatite promotes osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, 2016, Vol. 60, pp. 45-53.
141. Yuan Y., Chen X., Zhang L., Wu J., Guo J., Zou D. The roles of exercise in bone remodeling and in prevention and treatment of osteoporosis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 2016, Vol. 122, no. 2, pp. 122-130.

142. Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Melashchenko E.S., Malashchenko V.V., Shunkin E.O., Shupletsova V.V. Cellular and Molecular Basis of Osteoblastic and Vascular Niches in the Processes of Hematopoiesis and Bone Remodeling (A Short Review of Modern Views). *Curr. Pharm. Des.*, 2019, Vol. 25, no. 6, pp. 663-669.

143. Zernik J., Twarog K., Upholt W.B. Regulation of alkaline phosphatase and alpha 2(I) procollagen synthesis during early intramembranous bone formation in the rat mandible. *Differ. Res. Biol. Divers.*, 1990, Vol. 44, no. 3, pp. 207-215.

144. Zheng Z.-W., Chen Y.-H., Wu D.-Y., Wang J.-B., Lv M.-M., Wang X.-S. Development of an accurate and proactive immunomodulatory strategy to improve bone substitute material-mediated osteogenesis and angiogenesis. *Theranostics*, 2018, Vol. 8, no. 19, pp. 5482-5500.

145. Zhu B., Xue F., Li G., Zhang C. CRYAB promotes osteogenic differentiation of human bone marrow stem cells via stabilizing  $\beta$ -catenin and promoting the Wnt signalling. *Cell Prolif.*, 2020, Vol. 53, e12709. doi: 10.1111/cpr.12709.

146. Zwetsloot A.J., Tut G., Straube A. Measuring microtubule dynamics. *Essays Biochem.*, 2018, Vol. 62, no. 6, pp. 725-735.

---

**Авторы:**

**Юрова К.А.** — к.м.н., научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

**Мелашченко Е.С.** — младший научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

**Хазиахматова О.Г.** — к.б.н., научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

**Мелашченко В.В.** — научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

**Мелашченко О.Б.** — научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

**Шункин Е.О.** — младший научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

**Норкин И.К.** — аспирант медицинского института ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

**Хлусов И.А.** — д.м.н., главный научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград; профессор кафедры морфологии и общей патологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; профессор Исследовательской школы химических и биомедицинских технологий ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», г. Томск, Россия

**Литвинова Л.С.** — д.м.н., директор Центра иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

**Authors:**

**Yurova K.A.**, PhD (Medicine), Research Associate, Center of Immunology and Cellular Biotechnologies, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

**Melashchenko E.S.**, Junior Research Associate, Center of Immunology and Cellular Biotechnologies, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

**Khasiakhmatova O.G.**, PhD (Biology), Research Associate, Center of Immunology and Cellular Biotechnologies, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

**Malashchenko V.V.**, Research Associate, Center of Immunology and Cellular Biotechnologies, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

**Melashchenko O.B.**, Research Associate, Center of Immunology and Cellular Biotechnologies, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

**Shunkin E.O.**, Junior Research Associate, Center of Immunology and Cellular Biotechnologies, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

**Norkin I.K.**, Postgraduate Student, Medical Institute, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

**Khlyusov I.A.**, PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Center of Immunology and Cellular Biotechnologies, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad; Professor, Department of Morphology and General Pathology, Siberian State Medical University; Professor, Research School of Chemical and Biomedical Technologies, National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation

**Litvinova L.S.**, PhD, MD (Medicine), Director, Center of Immunology and Cellular Biotechnologies, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

# ИЗМЕНЕНИЕ ФЕНОТИПА И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НК-КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ И ОСТРЫМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ ПОД ВЛИЯНИЕМ ГИПОМЕТИЛИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ

Жигарев Д.И., Хорева М.В., Ганковская Л.В.

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

**Резюме.** Естественные киллеры (НК-клетки, англ. natural killers) – лимфоциты, относящиеся к клеткам врожденного иммунитета, они играют ключевую роль в поддержании иммунологического надзора. С момента обнаружения НК-клеток в 1973 году механизмы их функционирования были детально изучены, и сейчас не остается сомнения в том, что они играют особую роль в процессах распознавания и уничтожения трансформированных и малигнизированных клеток. Понимание роли НК-клеток в противоопухолевом иммунитете с одной стороны ведет к появлению новых иммунотерапевтических стратегий, а с другой – позволяет переосмыслить существующие схемы лечения онкологических заболеваний в соответствии с принципом *primum non nocere*. Оптимизация протоколов терапии опухолей, выполненная с целью уберечь иммунные клетки от гибели и функционального ослабления, – важная проблема, которая не может быть успешно решена без регулярного обобщения результатов разрозненных исследований и критического анализа накопленных данных.

Задачей настоящего обзора является анализ изменений фенотипа и функциональной активности НК-клеток у больных миелодиспластическим синдромом (МДС) и острым миелоидным лейкозом (ОМЛ). Для лечения этих заболеваний в настоящее время применяются препараты из группы гипометилирующих агентов, механизм действия которых, в отличие от классических цитостатических средств, основан на модуляции экспрессии генов опухолевых клеток. Поскольку эти препараты действуют неспецифично, воздействию подвергаются все клетки организма, в том числе и НК-клетки. Такое взаимодействие приводит к гипометилированию НК-клеточной ДНК и изменению экспрессии функциональных рецепторов, которые, в свою очередь, обеспечивают развитие противоопухолевого ответа НК-клеток.

Сам по себе факт изменения генной экспрессии тех или иных клеток не позволяет в полной мере судить о воздействии препарата на состояние иммунной системы, важен характер этого изменения и его роль в контексте патогенеза исследуемого заболевания. В конечном счете, простое описание явления увеличения или уменьшения экспрессии отдельно взятого рецептора не является наглядно-показательным, поскольку может приводить к неоднозначным последствиям. По этой причине в настоящем обзоре, помимо описания существующих данных об изменении экспрессии рецепторов

## Адрес для переписки:

Жигарев Дмитрий Игоревич  
ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский  
медицинский университет имени Н.И. Пирогова»  
Министерства здравоохранения РФ  
117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, 1.  
Тел.: 8 (901) 738-97-63.  
E-mail: zhigarev.di@gmail.com

## Address for correspondence:

Zhigarev Dmitry I.  
N. Pirogov Russian National Research Medical University  
117997, Russian Federation, Moscow, Ostrovityanov str., 1.  
Phone: 7 (901) 738-97-63.  
E-mail: zhigarev.di@gmail.com

## Образец цитирования:

Д.И. Жигарев, М.В. Хорева, Л.В. Ганковская  
«Изменение фенотипа и функциональной активности  
НК-клеток у больных миелодиспластическим  
синдромом и острым миелоидным лейкозом под  
влиянием гипометилирующих препаратов» //  
Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 2. С. 223–230.  
doi: 10.15789/1563-0625-PAF-2145

© Жигарев Д.И. и соавт., 2021

## For citation:

D.I. Zhigarev, M.V. Khoreva, L.V. Gankovskaya  
“Phenotypic and functional changes of NK cells in patients  
with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia  
treated with hypomethylating drugs”, *Medical Immunology  
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2021, Vol. 23, no. 2,  
pp. 223–230.  
doi: 10.15789/1563-0625-PAF-2145

DOI: 10.15789/1563-0625-PAF-2145

НК-клеток под воздействием гипометилирующих препаратов, особое внимание уделяется критическому анализу функциональных характеристик НК-клеток, среди которых наиболее важной для течения описываемых заболеваний является цитотоксическая активность, направленная на малигнизированные бластные клетки.

*Ключевые слова:* НК-клетки, противоопухолевый иммунитет, острый миелоидный лейкоз, миелодиспластический синдром, KIR-рецепторы, гипометилирующие препараты

## PHENOTYPIC AND FUNCTIONAL CHANGES OF NK CELLS IN PATIENTS WITH MYELODYSPLASTIC SYNDROME AND ACUTE MYELOID LEUKEMIA TREATED WITH HYPOMETHYLATING DRUGS

Zhigarev D.I., Khoreva M.V., Gankovskaya L.V.

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

**Abstract.** Natural killer cells (NK cells) are cytotoxic lymphocytes that play a pivotal role in maintaining immunological surveillance and in developing an innate immune response. Since the discovery of NK cells in 1973, the mechanisms of their functioning have been studied in details, and there is currently no doubt that they play a special role in the process of recognition and destruction of transformed and malignant cells. Understanding the role of NK cells in antitumor immunity, on the one hand, leads to emergence of new immunotherapeutic strategies and, on the other hand, allows to adjust the existing treatment regimens for tumor diseases, in accordance with the principle of *primum non nocere*. Optimization of cancer therapy protocols executed in order to protect immune cells from death and functional impairment is an important problem that cannot be successfully resolved without regular aggregation of the results from disparate studies and critical analysis of the all accumulated data.

The objective of this review is to create a relevant and holistic picture of changes in the phenotypic and functional characteristics of NK cells in patients with two related hematological diseases – myelodysplastic syndrome (MDS) and acute myeloid leukemia (AML). For the treatment of both illnesses, drugs from the group of hypomethylating agents are used, the acting mechanism of which, unlike classical cytostatic agents, is based on modulation of the tumor cell genes expression. All the cells of the body are being affected, including NK cells, since these drugs act nonspecifically. Such an interaction leads to a hypomethylation of NK cell DNA and changes the expression of functional receptors, which, in turn, provide the development of antitumor NK cell immune response.

Of course, just the fact of changing gene expression in certain cells does not allow us to fully judge the drug's impact on the state of immune system. Meanwhile, the origin of this change and its role are important in the context of the disease pathogenesis. Ultimately, a simple description of an increase or decrease in a single receptor expression is not illustrative, since it can lead to uncertain consequences. For this reason, the current review, in addition to describing the existing data on the changes of NK cell receptors expression under the influence of hypomethylating drugs, gives a special attention to critical analysis of functional characteristics of NK cells, including their cytotoxic activity aimed at malignant blast cells, being a determinant of clinical course in the described diseases.

*Keywords:* NK cells, antitumor immunity, acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, KIR receptors, hypomethylating drugs

### Введение

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) — это гетерогенная группа злокачественных опухолей костного мозга, характеризующаяся массивной и неконтролируемой пролиферацией предшественников миелоидных клеток [24]. ОМЛ характеризуется самой высокой летальностью среди других форм лейкозов, при этом чаще всего ОМЛ страдают лица пожилого возраста [9]. Для пациентов старше 60 лет, как правило, прогноз

неблагоприятный, в то же время частота ремиссий для больных ОМЛ младше 60 лет чуть более впечатляющая — от 35 до 40% поддаются своевременному лечению [8, 39]. Такое различие в эффективности терапии во многом обусловлено возрастом больного и более вероятным наличием сопутствующих заболеваний, что может являться противопоказанием для наиболее радикального метода лечения ОМЛ — трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) [1].

Миелодиспластический синдром (МДС) – это группа синдромов нарушения количественного и качественного состава клеток костного мозга, характеризующаяся цитопенией и высоким риском трансформации в ОМЛ [20]. Чаще всего заболевание манифестирует в пожилом возрасте, особенно у лиц, имеющих в анамнезе курс химиотерапии [27]. Так, в США в год обнаруживают около 75 новых случаев МДС на 100 000 человек старше 65 лет, 20-30% из них прогрессируют до ОМЛ [6]. Часто МДС определяют как предлейкозное состояние, терапевтические схемы, применяемые при лечении МДС, практически идентичны схемам терапии ОМЛ [22].

В настоящее время для лечения МДС и ОМЛ применяется несколько терапевтических стратегий. Их можно разделить на две большие группы: схемы лечения, включающие в себя цитостатические препараты, и схемы, использующие гипометилирующие антиметаболические лекарственные средства [7].

Все быстроделющиеся клетки организма, включая здоровые лимфоциты, крайне чувствительны к воздействию препаратов первой группы. В результате воздействия этих лекарственных средств резко уменьшается абсолютное число опухолевых blastов и, как побочное нежелательное явление, количество здоровых лимфоцитов. Этот эффект элиминации клеток иммунной системы по значимости перевешивает любые изменения их функциональной активности, поэтому в этой обзорной статье будут рассмотрены эффекты только гипометилирующих препаратов на клетки иммунной системы пациентов.

Гипометилирующие препараты оказывают менее выраженное противоопухолевое действие, чем классические цитостатические препараты, но в то же время обладают меньшим спектром побочных явлений; они показаны к применению при МДС и в тех случаях ОМЛ, когда пациенту не назначается стандартная цитостатическая химиотерапия, – в основном, лицам пожилого возраста и больным, переживающим рецидив после трансплантации костного мозга [10, 17].

К группе гипометилирующих препаратов, в настоящее время широко используемых в клинической практике, относятся два лекарственных средства: 5-азациитидин и децитабин [6, 13]. Эти препараты ингибируют ДНК-метилтрансферазу, что вызывает снижение уровня метилирования ДНК и увеличение экспрессии сайлентных генов, в том числе проапоптотических (рис. 1, см. 3-ю стр. обложки) [31]. Непосредственным механизмом цитотоксического действия препаратов данной группы является индукция апоптоза бластных клеток [4]. Поскольку угнетение метилирования происходит по всему геному, с некоторой вероятностью эти препараты увеличивают экспрессию генов здоровых клеток организма [25].

Было показано, что в больших дозах гипометилирующие препараты также обладают прямым

цитостатическим действием на опухолевые клетки – молекула децитабина или 5-азациитидина, будучи структурным аналогом цитидина, может встроиться в ДНК и нарушить процесс клеточного деления. Однако в терапевтических дозах действие препаратов обусловлено лишь ингибированием ДНК-метилтрансферазы [23].

НК-клетки представляют собой популяцию лимфоцитов врожденного иммунитета. Несмотря на то, что по своей природе НК-клетки принадлежат к лимфоидному ростку кровеносной системы, они относятся к клеткам врожденного иммунитета, поскольку осуществляют первую линию защиты организма, действуют уже в первые часы и не имеют специфических антигенраспознающих рецепторов, как Т- и В-лимфоциты. Можно сказать, что активность НК-клеток определяется в основном уровнем экспрессии их поверхностных рецепторов, который, в свою очередь, во многом зависит от степени метилирования генома [21].

НК-клетки обладают цитотоксической активностью по отношению к трансформированным клеткам (в том числе опухолевым), способны продуцировать цитокины, играющие важную роль в регуляции иммунного ответа. Важнейшую роль в процессе распознавания «своего» и «чужого» играют активирующие и ингибирующие рецепторы НК-клеток [2, 15]. Так, ингибирующие рецепторы (KIR2DL1/L2/L3 и др.) распознают молекулы, подтверждающие принадлежность отдельно взятой клетки организма к «своему» [28]. Со стороны потенциальной клетки-мишени особую роль в этом распознавании играет молекула главного комплекса гистосовместимости первого класса (HLA I), экспрессируемая всеми ядро-содержащими клетками организма. В том случае, если здоровая клетка прошла «проверку» со стороны НК-клетки, в последней активируются ингибирующие сигнальные пути. Таким образом, здоровые клетки организма предохраняются от цитотоксического действия НК-клеток [21]. С другой стороны, разнообразие активирующих рецепторов (KIR2DS1/S2/S3/S4/S5 и т.д.) позволяет отслеживать стрессорные молекулы, экспрессирующиеся на измененных клетках. В случае, если уровень активирующих сигналов превышает ингибирующие, в НК-клетке запускаются механизмы контактного цитолиза, увеличивается выработка IFN $\gamma$ , происходит деградация цитотоксических везикул [14]. Все эти события в итоге приводят к разрушению клетки-мишени.

Эксперименты, проведенные как *in vitro*, так и *in vivo*, показывают, что гипометилирующие препараты, помимо деструктивного влияния на опухолевые клетки, воздействуют на профиль экспрессии здоровых клеток иммунной системы пациента, в том числе НК-клеток [26, 33]. Было показано, что CpG-островки некоторых генов, не активированных НК-клеток, метилированы зна-

чительно сильнее, чем те же участки генома активированных форм, а значит, метилирование ДНК значительно обуславливает функциональную активность НК-клеток [40]. Учитывая распространенность терапевтических схем, включающих гипометилирующие препараты и важнейшую роль НК-клеток в развитии онкогематологических заболеваний, важно проанализировать и обобщить накопившиеся знания, касающиеся влияния этих препаратов на фенотип и функциональную активность НК-клеток человека.

#### **Влияние гипометилирующих препаратов на экспрессию KIR-рецепторов НК-клеток**

Как было сказано выше, механизм действия 5-азациитидина и децитабина по своей природе неспецифичен, ингибирование ДНК-метилтрансферазы происходит во всех клетках организма, в результате, помимо желаемого воздействия на опухоль, изменяется профиль экспрессии генов здоровых клеток [33].

Нормальное функционирование НК-клеток зависит от репертуара и соотношения экспрессирующихся на их поверхности активирующих и ингибирующих рецепторов. Изменения уровня метилирования генома способны оказывать влияние на экспрессию этих рецепторов. Одно из важнейших семейств таких рецепторов — это KIR-рецепторы (англ. killer immunoglobulin-like receptors). По мнению некоторых авторов, модуляция экспрессии KIR-рецепторов может быть основным механизмом изменения активности НК-клеток под действием гипометилирующих препаратов [40].

KIR-рецепторы НК-клеток представляют собой семейство иммуноглобулиноподобных рецепторов, представленных на поверхности НК-клеток. Разные KIR-рецепторы распознают разные молекулы МНС I. Так, к примеру, KIR2DL1 обладает специфической аффинностью к HLA-C2, KIR3DL1 — к HLA-Bw4, а KIR3DL2 способен связываться одновременно с HLA-A3 и HLA-A11 [21]. Среди KIR-рецепторов выделяют как активирующие (имеющие во внутриклеточном домене мотив ITAM) и ингибирующие (соответственно, обладающие мотивом ITIM) рецепторы. Взаимодействие KIR-рецепторов с МНС I обуславливает цитолитическую активность НК-клетки по отношению к клетке-мишени.

Репертуар KIR-рецепторов, представленный на поверхности НК-клеток каждого человека, специфичен и относительно постоянен [21]. С помощью масс-спектрометрии по рецепторам НК-клеток (значительная часть среди них — KIR-рецепторы) было обнаружено 6000–30 000 разных «клонов» НК-клеток у отдельно взятого индивидуума, при этом было показано, что у новорожденных спектр таких «клонов» НК-клеток значительно менее разнообразен [16, 35].

В двух исследованиях Verheyden и соавт. показали, что на НК-клетках пациентов с лейкозом

экспрессируется больше ингибирующих KIR-рецепторов по сравнению со здоровыми донорами [37, 38]. Мы не обнаружили в литературе сведений о других исследованиях на эту тему, однако в фокусе внимания исследователей оказалось влияние гипометилирующих препаратов на экспрессию репертуара KIR-рецепторов.

*In vitro* было показано, что 5-азациитидин значительно увеличивает экспрессию как активирующих, так и ингибирующих KIR-рецепторов [34]. В том же исследовании было выявлено, что подобный феномен особенно ярко выражен среди незрелой субпопуляции НК-клеток, для которой в общем случае характерен относительно низкий уровень экспрессии KIR-рецепторов и слабое участие в процессах цитолиза [18]. Незрелые НК-клетки пролиферируют активнее, чем зрелые, при этом активность пролиферирующих НК-клеток значительно повышается под влиянием 5-азациитидина [34].

Интересен характер зависимости экспрессии KIR-рецепторов от концентрации гипометилирующего препарата. *In vitro* было показано, что экспрессия KIR-рецепторов на НК-клетках зависит от концентрации децитабина линейно, прямая имеет возрастающий характер и при изменении концентрации препарата от 0 до 20  $\mu\text{M}$  экспрессия KIR-рецепторов увеличивается почти в 2 раза [23].

Похожие результаты были получены в экспериментах *in vivo* на выборке из одиннадцати пациентов с МДС, проходящих курс терапии 5-азациитидином: эффект был особенно выражен на активно пролиферирующих клетках (в качестве маркера пролиферации авторы использовали внутриклеточный белок Ki67) [34]. Подобная корреляция кажется логичной, поскольку гипометилирующие препараты, как и многие другие лекарства, использующиеся в онкологической практике, воздействуют главным образом на быстро делящиеся клетки.

Тот факт, что в физиологических условиях экспрессия аллелей KIR-рецепторов и созревание НК-клеток зависит от степени метилирования, известен давно, так что результаты, представленные выше, имеют под собой теоретическое обоснование [3].

#### **Изменение цитотоксичности НК-клеток, опосредованное влиянием гипометилирующих препаратов**

Эффекты влияния гипометилирующих препаратов на функциональную активность НК-клеток были детально изучены на моделях *in vivo* и *ex vivo*. Однако полученные результаты оказались неоднозначными.

Наиболее общей и в то же время самой показательной характеристикой НК-клеток является их способность к цитолизу опухолевых клеток-мишеней. В двух независимых исследованиях (Gao и соавт., Gang и соавт.) было показано, что предварительное культивирование НК-клеток в среде

с 5-азациитидином снижает их цитотоксическую активность против опухолевой клеточной линии K562 [11, 12]. Один из авторов предполагает, что снижение функциональной активности НК-клеток объясняется повышением экспрессии ингибирующих KIR-рецепторов и уменьшением синтеза перфорина и гранзима Б в результате гипометилирования генома [12]. Интересно, что подобный эффект наблюдался авторами только в экспериментах *in vitro*, — активность НК-клеток пациентов, проходящих курс терапии 5-азациитидином, оставалась на прежнем уровне [11].

Кардинально противоположные результаты были получены в работе Sohlberg и соавт. *In vitro* было показано, что 5-азациитидин, воздействуя на НК-клетки, ведет к увеличению их активности против клеток-мишеней той же линии K562, к усилению секреции  $IFN\gamma$  и к повышению цитотоксической активности [34]. Важно заметить, что изменение функциональной активности в приведенной работе затронуло только активно пролиферирующие Kі67 НК-клетки [34].

Возможное объяснение этого противоречия в своих работах получила группа исследователей Корр и соавт. В серии экспериментов они культивировали НК-клетки в среде с другим гипометилирующим препаратом, децитабином, концентрация которого варьировалась в пределах от 0,02 до 20  $\mu\text{M}$  [23]. Затем клетки отмывали и культивировали с клетками-мишенями линии 721.221, являющимися малигнизированными В-клетками, не экспрессирующими HLA-I. Благодаря отсутствию HLA-I на поверхности клеток-мишеней, НК-клеточный цитотоксический ответ не зависел от изменения уровня экспрессии KIR-рецепторов. Результаты экспериментов показали, что влияние децитабина на цитотоксичность НК-клеток является дозозависимым, кривая имеет V-образную форму. С увеличением концентрации децитабина до 0,63  $\mu\text{M}$  цитотоксичность НК-клеток уменьшалась, повышение концентрации препарата выше 0,63  $\mu\text{M}$ , напротив, потенцировала активность НК-клеток. Подобным же образом выглядит кривая зависимости степени метилирования генома от концентрации децитабина, добавленного в культуральную среду. Косвенным следствием сопоставления этих двух фактов является подтверждение корреляции между метилированием генома НК-клеток и их цитотоксичностью к клеткам-мишеням.

Интересные результаты были получены группой Schmiedel и соавт. [32]. В эксперименте *in vitro* они обнаружили, что продукция  $IFN\gamma$  и цитотоксическая активность НК-клеток к ряду опухолевых клеточных линий увеличивалась при предварительном культивировании их в среде, содержащей 5  $\mu\text{M}$  децитабина. Затем ими же было исследовано влияние 5-азациитидина в такой же концентрации на активность НК-клеток. Как ни странно, результаты были получены пря-

мо противоположные — этот гипометилирующий препарат значительно угнетал цитотоксическую активность НК-клеток и предохранял опухолевые клетки-мишени от лизиса. Стоит обратить внимание, что числовое значение концентрации децитабина лежит в том же диапазоне, в котором было показано повышение цитотоксичности в исследовании Корр и соавт., описанном выше, а значит, данные, независимо полученные двумя исследователями, согласуются между собой. Авторы утверждают, что 5-азациитидин, в отличие от децитабина, изменяет экспрессию некоторых поверхностных маркеров НК-клеток, но по приведенным ими диаграммам флюоресценции видно, что разница экспрессии минимальная. Возможным ключом к разгадке этого феномена являются результаты описанного выше исследования, показавшего V-образный характер кривой доза-эффект. Известно, что ингибирующая активность 5-азациитидина ниже таковой для децитабина. Стандартная доза децитабина 15 мг/м, тогда как для 5-азациитидина в пять раз больше — 75 мг/м, другими словами, для достижения эффекта угнетения ДНК-метилтрансферазы 5-азациитидином требуется большая концентрация препарата [19]. Исходя из этого и из того, что механизм действия этих двух препаратов практически идентичен, можно предположить, что точка минимума на V-образной кривой для 5-азациитидина (аналогичной кривой, полученной Корр и соавт. для децитабина) находится в области более высоких концентраций. Другими словами, 5  $\mu\text{M}$  5-азациитидина — концентрация, соответствующая части кривой, отражающей слабую способность к лизису клеток-мишеней, тогда как 5  $\mu\text{M}$  децитабина, напротив, концентрация, достаточная для усиления НК-клеточной активности.

В исследовании *in vitro*, посвященном изучению потенциально эффективной для лечения ОМЛ комбинации децитабина и анти-CD33 моноклональных антител, было показано, что НК-клетки пациентов, получающих децитабин, проявляют увеличенную антитело-зависимую клеточную цитотоксичность по отношению к CD33<sup>+</sup> клеткам-мишеням [36]. Известно, что антитело-зависимая клеточная цитотоксичность НК-клеток опосредуется рецептором к Fc-фрагменту IgG (CD16). К сожалению, авторы не исследовали экспрессию CD16 на НК-клетках, инкубированных в среде, содержащей децитабин, да и в целом, на настоящий момент нет ни одного исследования, достоверно показывающего изменение экспрессии CD16 под действием гипометилирующих препаратов.

**Изменение поверхностного фенотипа опухолевых клеток под действием гипометилирующих препаратов, ведущее к увеличению НК-клеточной цитотоксичности**

В работе Vasu и соавт. было исследовано влияние децитабина на бластные опухолевые клетки

костного мозга. На 28-й день инкубации бластов в среде, содержащей децитабин, авторы обнаружили значительное повышение концентрации внутриклеточной РНК лигандов к рецептору NKG2D (активирующему NK-клеточному рецептору): MICA, MICB, ULPB-1, ULPB-2 и ULPB-3 [36]. Более того, группа исследователей Raneros и соавт. изучила влияние децитабина на металлопротеиназу ADAM17, которая в большинстве опухолевых клеток «срезает» молекулы класса MIC и ULBP и переводит их в растворимую форму [29, 30]. Такие «свободные» лиганды взаимодействуют с NKG2D на поверхности NK-клетки и блокируют этот активирующий рецептор, препятствуя нормальной активации NK-клетки. Децитабин увеличивает экспрессию внутриклеточного фактора TIMP3, который ингибирует металлопротеиназу ADAM17 и предотвращает уход опухолевых клеток от иммунологического надзора описанным способом [29]. Таким образом, децитабин повышает NK-клеточную цитотоксичность к опухолевым клеткам как минимум двумя упомянутыми способами.

Известно, что, помимо белков классов MIC и ULBP, металлопротеаза ADAM17 «срезает» целый ряд других мембранных молекул, в том числе играющих важную роль в развитии противоопухолевого ответа: PD-L1, LAG-3, CD16, Nectin-4 [43]. Действительно, в одной из работ было показано, что под воздействием гипометилирующих препаратов значительно увеличивается экспрессия PD-1, PD-L1, PD-L2 и CTLA-4 на опухолевых клетках пациентов с МДС и ОМЛ [41]. Результаты, полученные в этом исследовании, показали возможность использования в терапевтических целях комбинаций децитабина и моноклональных антител. Так, в одной из недавних работ было продемонстрировано значительное увеличение эффективности комбинации малых доз децитабина и анти-PD-1 блокирующих антител, а в данный момент проводятся несколько клинических испытаний подобных терапевтических комбинаций [42].

## Заключение

Таким образом, гипометилирующие препараты значительно влияют на профиль экспрессии рецепторов на поверхности NK-клеток и, как следствие, на их цитотоксическую активность. Однако характер этих воздействий не вполне однозначен. Противоречие обнаруживается главным образом в результатах экспериментов по оценке цитотоксичности NK-клеток, предварительно инкубированных в среде с препаратом гипометилирующего ряда. Две группы исследователей показали, что 5-азациитидин подавляет активность NK-клеток, тогда как другая группа получила прямо противоположные результаты. Объяснение этому может быть получено в по-

казанной для децитабина, но пока не обнаруженной для 5-азациитидина, V-образной кривой зависимости NK-клеточной цитотоксичности от концентрации экспонируемого 5-азациитидина. Другое возможное объяснение упомянутого парадокса может заключаться в том, что децитабин, будучи производным дезоксирибонуклеиновой кислоты, может инкорпорироваться только в ДНК, тогда как 5-азациитидин – производное рибонуклеиновой кислоты, способен встраиваться и в ДНК, и в РНК. Таким образом, при экспозиции 5-азациитидина теоретически возможно угнетение белковой экспрессии из-за нарушения синтеза мРНК. Никаких конкретных исследований для разрешения данного противоречия проведено не было.

В ряде работ показано, что воздействие гипометилирующих препаратов на NK-клетки приводит к изменению их поверхностного фенотипа. Так, значительно повышается экспрессия KIR-рецепторов, одних из главных функциональных поверхностных молекул NK-клеток. Увеличение экспрессии затрагивает как активирующие, так и ингибирующие KIR-рецепторы, так что однозначного ответа на вопрос о том, благоприятно ли сказывается это изменение на противоопухолевой активности NK-клеток, нет, однако сам факт увеличения репертуара распознающих NK-клеточных рецепторов может быть интерпретирован как признак увеличения их чувствительности по отношению к опухолевым клеткам.

Наконец, повышение экспрессии поверхностных лигандов к рецепторам NK-клеток под влиянием децитабина на опухолевых клетках хоть и косвенно, все же влияет на активность NK-клеток и может быть важным механизмом противоопухолевой активности гипометилирующих препаратов.

Необходимо отметить, что большинство исследований о влиянии гипометилирующих препаратов на фенотип и функциональную активность NK-клеток проведено на моделях *in vitro*. На сегодняшний день мало работ, в которых изучали бы аналогичные фенотипические и функциональные изменения NK-клеток на пациентах, проходящих курс лечения децитабином или 5-азациитидином. Конечно, результаты подобных экспериментов могут отличаться от описанных выше, ведь значительная часть фармакологического эффекта обусловлена фармакокинетическими особенностями препарата, которые не могут быть в полной мере учтены в условиях *in vitro*. Однако такие данные позволяют строить гипотезы и правильно планировать эксперимент, исходя из предположений, основанных на моделях *ex vivo*.

## Список литературы / References

1. Almeida A.M., Ramos F. Acute myeloid leukemia in the older adults. *Leuk. Res. Rep.*, 2016, Vol. 6, pp. 1-7.
2. Carrillo-Bustamante P., Kesmir C., de Boer R.J. The evolution of natural killer cell receptors. *Immunogenetics*, 2016, Vol. 68, no. 1, pp 3-18.
3. Chan H.W., Kurago Z.B., Stewart C.A. et al. DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells. *J. Exp. Med.*, 2003, Vol. 197, no. 2, pp. 245-255.
4. Christman J.K. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*, 2002, Vol. 21, no. 35, pp. 5483-5495.
5. Cogle C.R. Incidence and burden of the myelodysplastic syndromes. *Curr. Hematol. Malig. Rep.*, 2015, Vol. 10, no. 3, pp. 272-281.
6. Dan H., Zhang S., Zhou Y., Guan Q. DNA Methyltransferase inhibitors: catalysts for antitumour immune responses. *Onco Targets Ther.*, 2019, Vol. 12, pp. 10903-10916.
7. Daneshbod Y., Kohan L., Taghadosi V., Weinberg O.K., Arber D.A. Prognostic significance of complex karyotypes in acute myeloid leukemia. *Curr. Treat. Options Oncol.*, 2019, Vol. 20, no. 2, 15. doi: 10.1007/s11864-019-0612-y.
8. Döhner H., Weisdorf D.J., Bloomfield C.D. Acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 2015, Vol. 373, no. 12, pp. 1136-1152.
9. Estey E.H. Acute myeloid leukemia: 2019 update on risk-stratification and management. *Am. J. Hematol.*, 2018, Vol. 93, no. 10, pp. 1267-1291.
10. Fenaux P., Mufti G.J., Hellström-Lindberg E. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.*, 2010, Vol. 28, no. 4, pp. 562-569.
11. Gang A.O., Frosig T.M., Brimnes M.K. 5-Azacytidine treatment sensitizes tumor cells to T-cell mediated cytotoxicity and modulates NK cells in patients with myeloid malignancies. *Blood Cancer J.*, 2014, Vol. 4, no. 3, e197. doi: 10.1038/bcj.2014.14.
12. Gao X.N., Lin J., Wang L.L., Yu L. Demethylating treatment suppresses natural killer cell cytolytic activity. *Mol Immunol.*, 2009, Vol. 46, no. 10, pp. 2064-2070.
13. Gardin C., Dombret H. Hypomethylating agents as a therapy for AML. *Curr. Hematol. Malig. Rep.*, 2017, Vol. 12, no. 1, pp. 1-10.
14. Gardiner C.M. NK cell metabolism. *J. Leukoc. Biol.*, 2019, Vol. 105, no. 6, pp. 1235-1242.
15. Hoglund P., Brodin P. Current perspectives of natural killer cell education by MHC class I molecules. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, Vol. 10, no. 10, pp. 724-734.
16. Horowitz A., Strauss-Albee D.M., Leipold M., Kubo J., Nemat-Gorgani N., Dogan O.C., Dekker C.L., Mackey S., Maecker H., Swan G.E., Davis M.M., Norman P.J., Guethlein L.A., Desai M., Parham P., Blish C.A. Genetic and environmental determinants of human NK cell diversity revealed by mass cytometry. *Sci. Transl. Med.*, 2013, Vol. 5, no. 208, 208ra145. doi: 10.1126/scitranslmed.3006702.
17. Hourigan C.S., Karp J.E. Development of therapeutic agents for older patients with acute myelogenous leukemia. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 2010, Vol. 11, no. 6, pp. 669-677.
18. Jacobs B., Tognarelli S., Poller K., Bader P., Mackensen A., Ullrich E. NK Cell subgroups, phenotype, and functions after autologous stem cell transplantation. *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 6, p. 583. doi: 10.3389/fimmu.2015.00583.
19. Kantarjian H.M., Issa J.P. Decitabine dosing schedules. *Semin. Hematol.*, 2005, Vol. 42, no. 3, Suppl. 2, pp. S17-S22.
20. Kennedy J.A., Ebert B.L. Clinical implications of genetic mutations in myelodysplastic syndrome. *J. Clin. Oncol.*, 2017, Vol. 35, no. 9, pp. 968-974.
21. Campbell K.S., Hasegawa J. Natural killer cell biology: an update and future directions. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013 Vol. 132, Iss. 3, pp. 536-544.
22. Koeffler H.P., Leong G. Preleukemia: one name, many meanings. *Leukemia*, 2017, Vol. 31, no. 3, pp. 534-542.
23. Kopp L.M., Ray A., Denman C.J., Senyukov V.S., Somanchi S.S., Zhu S., Lee D.A. Decitabine has a biphasic effect on natural killer cell viability, phenotype, and function under proliferative conditions. *Mol. Immunol.*, 2013, Vol. 54, no. 3-4, pp. 296-301.
24. Kuykendall A., Duployez N., Boissel N., Lancet J.E., Welch J.S. Acute myeloid leukemia: the good, the bad, and the ugly. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book*, 2018, Vol. 38 pp. 555-573.
25. Lindblad K.E., Goswami M., Hourigan C.S., Oetjen K.A. Immunological effects of hypomethylating agents. *Expert Rev. Hematol.*, 2017, Vol. 10, no. 8, pp. 745-752.
26. Ma Y.Y., Zhao M., Liu Y. et al. Use of decitabine for patients with refractory or relapsed acute myeloid leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Hematology*, 2019, Vol. 24, no. 1, pp. 507-515.
27. Montalban-Bravo G., Garcia-Manero G. Myelodysplastic syndromes: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am. J. Hematol.*, 2018, Vol. 93, no. 1, pp. 129-147.

28. Muntasell A., Ochoa M.C., Cordeiro L. et al. Targeting NK-cell checkpoints for cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.*, 2017, Vol. 45 pp. 73-81.
29. Raneros A.B., Minguela A., Rodriguez R.M., Colado E., Bernal T., Anguita E., Mogorron A.V., Gil A.C., Vidal-Castiñeira J.R., Márquez-Kisinousky L., Bulnes P.D., Marin A.M., Garay M.C.G., Suarez-Alvarez B., Lopez-Larrea C. Increasing TIMP3 expression by hypomethylating agents diminishes soluble MICA, MICB and ULBP2 shedding in acute myeloid leukemia, facilitating NK cell-mediated immune recognition. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 19, pp. 31959-31976.
30. Rohner A., Langenkamp U., Siegler U., Kalberer C.P., Wodnar-Filipowicz A. Differentiation-promoting drugs up-regulate NKG2D ligand expression and enhance the susceptibility of acute myeloid leukemia cells to natural killer cell-mediated lysis. *Leuk. Res.*, 2007, Vol. 31, no. 10, pp. 1393-1402.
31. Sato T., Issa J.J., Kropf P. DNA hypomethylating drugs in cancer therapy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2017, Vol. 7, no. 5, a026948. doi: 10.1101/cshperspect.a026948.
32. Schmiedel B.J., Arelin V., Gruenebach F., Krusch M., Schmidt S.M., Salih H.R. Azacytidine impairs NK cell reactivity while decitabine augments NK cell responsiveness toward stimulation. *Int. J. Cancer*, 2011, Vol. 128, no. 12, pp. 2911-2922.
33. Seelan R.S., Mukhopadhyay P., Pisano M.M., Greene R.M. Effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) on gene expression. *Drug Metab. Rev.*, 2018, Vol. 50, no. 2, pp. 193-207.
34. Sohlberg E., Pfeifferle A., Andersson S., Baumann B.C., Hellstrom-Lindberg E., Malmberg K.J. Imprint of 5-azacytidine on the natural killer cell repertoire during systemic treatment for high-risk myelodysplastic syndrome. *Oncotarget*, 2015, Vol. 6, no. 33, pp. 34178-34190.
35. Strauss-Albee D.M., Fukuyama J., Liang E.C. et al. Human NK cell repertoire diversity reflects immune experience and correlates with viral susceptibility. *Sci. Transl. Med.*, 2015, Vol. 7, 297, 297ra115. doi: 10.1126/scitranslmed.aac5722.
36. Vasu S., He S., Cheney C. Decitabine enhances anti-CD33 monoclonal antibody BI 836858-mediated natural killer ADCC against AML blasts. *Blood*, 2016, Vol. 127, no. 23, pp. 2879-2889.
37. Verheyden S., Bernier M., Demanet C. Identification of natural killer cell receptor phenotypes associated with leukemia. *Leukemia*, 2004, Vol. 18, no. 12, pp. 2002-2007.
38. Verheyden S., Demanet C. Susceptibility to myeloid and lymphoid leukemia is mediated by distinct inhibitory KIR-HLA ligand interactions. *Leukemia*, 2006, Vol. 20, no. 8, pp. 1437-1438.
39. Wang E.S. Treating acute myeloid leukemia in older adults. *Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, 2014, Vol. 1, pp. 14-20.
40. Wiencke J.K., Butler R., Hsuang G. et al. The DNA methylation profile of activated human natural killer cells. *Epigenetics*, Vol. 11, no. 5, pp. 363-380.
41. Yang H., Bueso-Ramos C., DiNardo C., Estecio M.R., Davanlou M., Geng Q.R., Fang Z., Nguyen M., Pierce S., Wei Y., Parmar S., Cortes J., Kantarjian H., Garcia-Manero G. Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents. *Leukemia*, 2014, Vol. 28, no. 6, pp. 1280-1288.
42. Yu G., Wu Y., Wang W., Xu J., Lv X., Cao X., Wan T. Low-dose decitabine enhances the effect of PD-1 blockade in colorectal cancer with microsatellite stability by re-modulating the tumor microenvironment. *Cell. Mol. Immunol.*, 2019, Vol. 16, no. 4, pp. 401-409.
43. Zunke F., Rose-John S. The shedding protease ADAM17: physiology and pathophysiology. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.*, 2017, Vol. 1864, no. 11, Pt B, pp. 2059-2070.

**Авторы:**

**Жигарев Д.И.** — аспирант кафедры иммунологии МБФ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

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

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

**Authors:**

**Zhgarev D.I.**, Postgraduate Student, Department of Immunology, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

**Khoreva M.V.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Immunology, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

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

Поступила 20.10.2020  
Принята к печати 09.01.2021

Received 20.10.2020  
Accepted 09.01.2021

## ЭКСПРЕССИЯ И ПОЛИМОРФИЗМ РЕЦЕПТОРОВ TLR4 В ПАТОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ: СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД

Белоглазов В.А., Яцков И.А., Усеинова Р.Х.

Медицинская академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», г. Симферополь, Республика Крым, Россия

**Резюме.** Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) – прогрессирующее заболевание, характеризующееся необратимой или частично обратимой обструкцией бронхиального дерева. В настоящее время существует множество научно подтвержденных звеньев этиопатогенеза ХОБЛ, среди которых основополагающая роль отводится значению гиперергической воспалительной реакции в ответ на вдыхание различных вредных веществ (табачный дым, промышленные поллютанты и др.). В легких больных ХОБЛ увеличивается количество макрофагов, нейтрофилов, лимфоцитов, причем эти клетки выделяют достаточно широкий спектр медиаторов воспаления. Одной из ключевых особенностей этиопатогенеза ХОБЛ является бактериальная колонизация дыхательных путей, приводящая к персистирующей или хронической стимуляции иммунных клеток через Toll-подобные рецепторы (TLR), которые воспринимают патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs).

В данной статье приведен литературный обзор современных представлений о роли экспрессии и полиморфизма Toll-подобных рецепторов, в частности TLR4, в патогенезе ХОБЛ. TLR4 является членом семейства Toll-подобных рецепторов, которые играют фундаментальную роль в идентификации патогенов и активации врожденного иммунитета. Распознавая патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs), которые экспрессируются на инфекционных агентах, TLR опосредуют выработку цитокинов, необходимых для развития эффективного иммунитета. Различные TLR демонстрируют различные паттерны экспрессии. Этот рецептор наиболее обильно экспрессируется в плаценте и в миеломоноцитарной субпопуляции лейкоцитов. В исследовании Di Stefano A. и соавт. (2017) иммуногистохимически были определены уровни экспрессии TLR2, TLR4, TLR9, NOD1, NOD2, CD14, Toll-интерлейкин-1-рецепторного домена, содержащего адапторный белок (TIRAP) и интерлейкин-1-рецептор-ассоциированных фосфокиназ (IRAK1 и IRAK4) в слизистой оболочке бронхов пациентов со стабильным течением ХОБЛ различной степени тяжести. Стало известно, что экспрессия TLR4 бронхиального эпителия положительно коррелировала со степенью обструкции и содержанием CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток. Стимуляция TLR4 усиливает выработку цитокинов, что может быть релевантным механизмом, с помощью которого бактерии вызывают чрезмерное воспаление у пациентов с ХОБЛ. Вопрос степени вовлеченности TLR4 в патогенез ХОБЛ требует дальнейшего более подробного изучения с целью определения основных механизмов формирования воспали-

### Адрес для переписки:

Яцков Игорь Анатольевич  
Медицинская академия имени С.И. Георгиевского  
ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени  
В.И. Вернадского»  
295491, Россия, Республика Крым, г. Симферополь,  
пгт Аэрофлотский, ул. Мальченко, 7, кв. 28.  
Тел.: 8 (978) 709-40-15.  
E-mail: egermd@yandex.ru

### Address for correspondence:

Yatskov Igor A.,  
S. Georgievsky Medical Academy, V. Vernadsky Crimea  
Federal University  
295491, Russian Federation, Republic of Crimea, Simferopol,  
Aeroflotsky District, Malchenko str., 7, apt 28.  
Phone: 7 (978) 709-40-15.  
E-mail: egermd@yandex.ru

### Образец цитирования:

В.А. Белоглазов, И.А. Яцков, Р.Х. Усеинова «Экспрессия  
и полиморфизм рецепторов TLR4 в патогенезе  
хронической обструктивной болезни легких:  
современный взгляд» // Медицинская иммунология,  
2021. Т. 23, № 2. С. 231-236.  
doi: 10.15789/1563-0625-EAP-2147  
© Белоглазов В.А. и соавт., 2021

### For citation:

V.A. Beloglazov, I.A. Yatskov, R.Kh. Useinova "Expression  
and polymorphism of TLR4 receptors in pathogenesis of chronic  
obstructive pulmonary disease: a modern view", *Medical  
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2021,  
Vol. 23, no. 2, pp. 231-236.  
doi: 10.15789/1563-0625-EAP-2147  
DOI: 10.15789/1563-0625-EAP-2147

тельного ответа в дыхательных путях. Данная обзорная статья является частью грантового проекта по изучению провоспалительного ответа на эндотоксин грамотрицательной флоры в патогенезе ХОБЛ (Номер государственного учета НИОКТР – АААА-А19-119122390040-2).

*Ключевые слова:* TLR4, LPS, ХОБЛ, полиморфизм, экспрессия, воспаление

## EXPRESSION AND POLYMORPHISM OF TLR4 RECEPTORS IN PATHOGENESIS OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE: A MODERN VIEW

Beloglazov V.A., Yatskov I.A., Useinova R.Kh.

*S. Georgievsky Medical Academy, V. Vernadsky Crimea Federal University, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation*

**Abstract.** Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a progressive disease characterized by irreversible or partially reversible obstruction of the bronchial tree. Currently, there are many proven links in the COPD etiopathogenesis, among which a pivotal role is assigned to the value of the hyperergic inflammatory reaction in response to inhalation of various harmful substances (tobacco smoke, industrial pollutants, etc.). The number of macrophages, neutrophils, lymphocytes increases in the lungs of COPD patients, and these cells secrete a fairly wide range of inflammatory mediators. Bacterial colonization of the airways is one of the key features in COPD pathogenesis leading to persistent or chronic stimulation of immune cells through Toll-like receptors (TLR), which perceive the pathogen-associated molecular patterns (PAMPs).

This article provides a review of literature concerning modern concepts of the role of Toll-like receptors expression and polymorphism, in particular, TLR4, in pathogenesis of COPD. TLR4 is a member of the Toll-like receptor family that plays a fundamental role in pathogen identification and innate immune activation. By recognizing the pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) expressed on infectious agents, TLRs mediate the production of cytokines necessary for the development of effective immunity. Different TLRs exhibit distinct expression patterns. This receptor is most abundantly expressed in placenta and in the myelomonocytic leukocyte subpopulations. E.g., Di Stefano A. et al. (2017), determined immunohistochemically the expression levels of TLR2, TLR4, TLR9, NOD1, NOD2, CD14, Toll-interleukin-1-receptor domain containing adapter protein (TIRAP) and interleukin-1-receptor-associated phosphokinases (IRAK1 and IRAK4) in bronchial mucosa of patients with stable COPD of varying severity. It was found that TLR4 expression of the bronchial epithelium positively correlated with degree of obstruction and CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>T cell contents. Stimulation of TLR4 increases cytokine production, which may be a relevant mechanism by which bacteria cause excessive inflammation in COPD patients. The degree of TLR4 involvement into COPD pathogenesis requires more detailed study in future, in order to determine the main mechanisms for emerging inflammatory response in the airways. This review article is part of a research grant project to study pro-inflammatory response to endotoxin of Gram-negative flora in COPD pathogenesis (State registration number – АААА-А19-119122390040-2).

*Keywords:* TLR4, LPS, COPD, polymorphism, expression, inflammation

Хроническая обструктивная болезнь легких – это иммуноопосредованное заболевание, характеризующееся прогрессирующей и плохо обратимой обструкцией воздушного потока и представляющее собой одну из ведущих причин смертности в мире [26]. ХОБЛ – это гетерогенное заболевание, характеризующееся аномальной воспалительной реакцией легких на ингаляционные вредные частицы [13]. Считается, что основным фактором риска является длительный

стаж как активного, так и пассивного курения, однако примечательно, что только у 20% курильщиков развивается ХОБЛ [15]. Факторы риска, имеющиеся у конкретного пациента, главным образом, генетическая предрасположенность, эпигенетические изменения и окислительный стресс, способствуют гиперергической воспалительной реакции, влияя на развитие и прогрессирование заболевания [2].

### Роль врожденной иммунной системы в патогенезе ХОБЛ

В недавних исследованиях Apostolou A. и соавт. (2016), была выявлена симбиотическая связь между микробиотой и врожденным адаптивным иммунным ответом человека (хозяина). Иммунные реакции хозяина на активность микробиоты сбалансированы таким образом, чтобы поддерживать ее разнообразие, необходимое для индукции защитных реакций на патогены. Врожденные иммунные клетки имеют специфические рецепторы, которые связывают молекулярные паттерны патогенов (PAMPs) и стрессовые или умирающие клетки (поврежденные молекулярные паттерны, DAMPs). Эти рецепторы известны как рецепторы распознавания образов (PRRs), включая трансмембранные Toll-подобные рецепторы (TLR), цитозольные NOD-подобные рецепторы (NLRs) и RIG-I-подобные рецепторы (RLRs) [12, 17, 22]. Существует все больше доказательств того, что табакокурение индуцирует ХОБЛ через начальную активацию врожденных иммунных клеток путем запуска PRRs, что приводит к последующей активации провоспалительных каскадов. Последующее восстановление и удержание нейтрофилов, макрофагов, Т-хелперов (Th1 и Th17), Т-цитотоксических клеток в легких приводит к хроническому воспалению легочной ткани и повреждению паренхимы [3]. При естественном течении заболевания вирусные и бактериальные инфекции приводят к острым обострениям, но также усиливают хроническое воспаление с помощью PAMP. В конечном итоге в периферической крови пораженных больных возникает иммунная дисрегуляция, способствующая патогенезу внелегочных проявлений заболевания [21, 25, 27, 29].

#### Гиперэкспрессия TLR в патогенезе ХОБЛ

Toll-подобные рецепторы (TLR) и нуклеотид-связывающий домен олигомеризации (NOD)-подобные рецепторы (NLR) являются двумя основными формами врожденных иммунных сенсоров. TLR2 распознает липотейхоевую кислоту (LTA) грамположительных бактерий и некоторые нетипичные липополисахариды (LPS) грамотрицательных бактерий [23]; TLR4 распознает липополисахариды и некоторые эндогенные лиганды, а TLR9 участвует в распознавании вирусной А/Д – и бактериальной В/К-ДНК CpG типа [10]. CD14 действует как корецептор (наряду с TLR4) для обнаружения LPS, но может связывать LPS только в присутствии LPS-связывающего белка. Хотя LPS считается его основным лигандом, CD14 также распознает другие PAMPs, такие как LTA [19].

NOD1 и NOD2 распознают внутриклеточные бактерии через идентификацию компонентов

пептидогликанов, таких как мурамилдипептид, обнаруженный почти у всех бактерий, или через  $\gamma$ -D-глутамил-мезо-диаминопимелиновую кислоту, обнаруженную у грамотрицательных бактерий [7]. Как миелоидный дифференцировочный первичный ответный ген 88 (MyD88)-зависимый, так и независимый (с участием CD14) сигнальные пути активируются после активации TLR [5, 14]. Toll-интерлейкин-1 рецепторный доменсодержащий адапторный белок (TIRAP) необходим для MyD88-зависимого сигнального пути через активацию TLR2 и TLR4 [8, 10, 20, 24].

Аномалии в любом из этих врожденных сенсорно-опосредованных процессов могут привести к чрезмерному воспалению вследствие либо гиперактивной врожденной иммунной сигнализации, либо устойчивой компенсаторной адаптивной иммунной активации [6, 28]. Как показали исследования Di Stefano A. и соавт., этими проявлениями характеризовались нижние дыхательные пути пациентов со стабильной ХОБЛ [4].

Отдельным аспектом патогенеза ХОБЛ, требующим рассмотрения, на наш взгляд, является способность врожденных иммунных сенсорных механизмов влиять на экспрессию гипоксией индуцируемых факторов (HIF). Гипоксия является не только признаком прогрессирующей ХОБЛ, но и ключевым игроком во многих дезадаптивных процессах и системных сопутствующих заболеваниях, связанных с ХОБЛ [30]. Интегративный анализ данных метилирования ДНК и экспрессии генов идентифицирует эндотелиальный домен PAS, содержащий белок 1 (EPAS1) как ключевой регулятор при ХОБЛ [32]. EPAS1 находится в хромосоме 2, которая кодируется геном EPAS1 у всех видов млекопитающих, и представляет собой белок-фактор транскрипции, участвующий в индукции генов, регулируемых кислородом (также называемый индуцируемым гипоксией фактором-2 альфа (HIF-2 $\alpha$ )) [31]. Это транскрипционный фактор, индуцируемый гипоксией и участвующий в реакции организма на уровень кислорода, т.е. ключевым моментом является стимуляция данного фактора в условиях гипоксии. Кодируемый белок содержит домен «спираль-петля-спираль» («helix-loop-helix»), домен димеризации, а также домен сигнальной трансдукции, обнаруженный в белках, реагирующих на уровень кислорода. HIF2 $\alpha$  – фактор транскрипции, который индуцирует экспрессию гена эритропоэтина в культивируемых клетках в ответ на гипоксию. Подобно HIF1 $\alpha$  HIF2 $\alpha$  связывает и активирует транскрипцию HIF1A чувствительного элемента из 3'-фланкирующей области гена эритропоэтина. Активация транскрипции гена эритропоэтина как белком HIF1 $\alpha$ , так и HIF2 $\alpha$  стимулируется в условиях гипоксии. Экспрессия

гена *EPAS1* снижается при многих заболеваниях [16, 18]. Согласно данным Li H. и соавт. (2016), в ходе исследования 55 образцов бронхоальвеолярной лаважной жидкости больных ХОБЛ было отмечено, что гиперэкспрессия TLR4 ингибирует экспрессию эндотелиального EPAS1-домена в нижних отделах дыхательных путей [9]. В данное исследование были включены 55 пациентов с ХОБЛ в возрасте 50-55 лет и контрольная группа, состоящая из 25 совершенно здоровых, некурящих и не принимающих никаких медикаментов человек. В ходе работы исследователи получили 55 образцов бронхоальвеолярной лаважной жидкости (BALF) пациентов с ХОБЛ. Основными патогенами, распознаваемыми TLR4 и TLR5, были *P. aeruginosa* и *A. baumannii*, поэтому авторы наблюдали экспрессию TLR4 и TLR5 на клетках BALF. Результаты ПЦР в реальном времени показали, что экспрессия TLR4 значительно увеличилась у всех пациентов с ХОБЛ по сравнению с контрольной группой. Авторы продемонстрировали значимость и перспективность дальнейшего изучения механизма влияния гиперэкспрессии TLR4 на метилирование промотора эндотелиального PAS-домена, содержащего белок-1 (EPAS1) и синтез его мРНК, что коррелирует с прогрессированием ХОБЛ.

#### Ассоциация между генетическим полиморфизмом TLR4, риском развития ХОБЛ и ее фенотипом

Каждая стадия иммунного ответа человека генетически опосредована, т.е. находится под генетическим контролем, включая начальные реакции макрофагов, эпителиальных и дендритных клеток легких, индукцию Т-клеточного ответа и активированное уничтожение макрофа-

гов в гранулемах [1]. По мнению исследователей Yao Yao D. и соавт. (2018), оценка генетического полиморфизма TLR4 представляет значительный интерес для исследования ХОБЛ. Авторы провели генотипирование 152 пациентов с ХОБЛ и 201 пациента контрольной группы, в ходе работы были отобраны SNPs (однонуклеотидные полиморфизмы), расположенные в промоторной области или экзонах генов *IL17A*, *P2RX7* и *TLR4*. Полиморфизмы rs2275913 и rs763780 гена *IL17A*, rs10759932 и rs2737190 гена *TLR4* и rs1718119 гена *P2RX7* оставались достоверно связанными с измененным риском развития ХОБЛ. Авторы отмечают, что пациенты, носящие аллель rs2275913, имели сниженный риск ХОБЛ, а те, кто носил аллель rs763780 с, имели повышенный риск. Аллель rs10759932 С снижал риск развития ХОБЛ так же, как и аллель rs2737190 G. Таким образом, *IL17A*, *TLR4*, *P2RX7* являются важными регуляторными генами воспаления и имеют значение для патогенеза ХОБЛ.

В исследовании Apostolou A. и соавт. (2016) авторы проанализировали влияние на течение ХОБЛ общих функциональных SNPs генов *TLR2* и *TLR4* наряду с генотипическим дефицитом MBL (маннозосвязывающий лектин) в когорте амбулаторных больных. Интересно, что наличие SNPs TLR4 ассоциировано с более ранней стадией ХОБЛ, в то время как отсутствие каких-либо анализируемых SNP, включая MBL2 наряду с генотипическим дефицитом MBL, коррелировало с более выраженным фенотипом заболевания, характеризующимся более частыми обострениями.

Результаты исследования подтверждают концепцию о том, что наличие врожденных иммунных SNPs, с точки зрения функциональных полиморфизмов TLR наряду с дефицитом MBL, может оказывать защитное воздействие на фенотип и прогноз ХОБЛ, аналогичное результатам других иммуноопосредованных заболеваний. Уточнение таких специфических молекулярных маркеров прогноза ХОБЛ может быть полезно при определении критериев отбора пациентов, имеющих право на новую противовоспалительную терапию, направленную на ослабление врожденного иммунного ответа [9].

## Заключение

Хроническая обструктивная болезнь легких характеризуется длительно протекающей воспалительной реакцией, механизмы которой частично поддерживаются врожденной иммунной системой защиты. Врожденный иммунный ответ в дыхательных путях включает обнаружение патогена или связанных с повреждением молекулярных паттернов с помощью рецепторов распознавания, таких как Toll-подобные рецепторы (TLR)

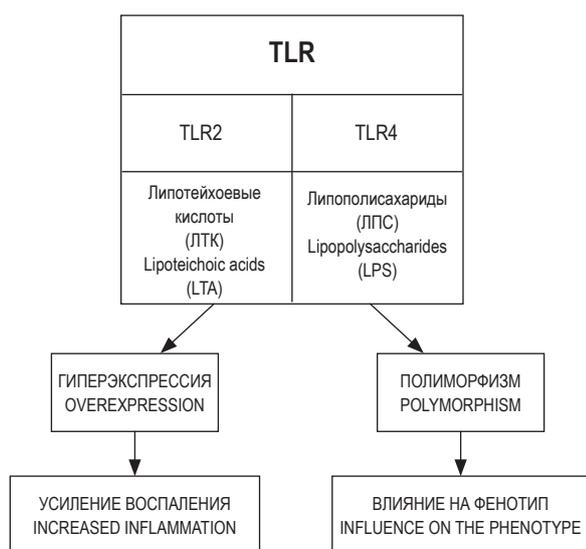


Рисунок 1. TLR в патогенезе ХОБЛ

Figure 1. TLR in the pathogenesis of COPD

на поверхности клеток. Активация данных рецепторов ведет к усилению провоспалительного ответа, а также влияет на фенотипическое проявление заболевания (рис. 1). Механизм патогенеза иммуноопосредованного возникновения и течения ХОБЛ, влияние экспрессии Toll-подобных

рецепторов на гиперергические воспалительные процессы в дыхательных путях и роль генетического полиморфизма врожденных иммунных сенсоров является достаточно малоизученным и перспективным направлением для дальнейших научных исследований.

## Список литературы / References

1. Britton W.J., Fernando S.L., Saunders B.M., Sluyter R., Wiley J.S. The genetic control of susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis*. Decoding the genomic control of immune reactions. Novartis Foundation Symposium, 2007, Vol. 281, pp. 79-92.
2. Brusselle G.G., Joos G.F., Bracke K.R. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*, 2011, Vol. 378, pp. 1015-1026.
3. Dai Y., Zhang Z., Xu L., Shang Y., Lu R., Chen J. Genetic polymorphisms of IL17A, TLR4 and P2RX7 and associations with the risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Mutat. Res. Gen. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 2018, Vol. 829-830, pp. 1-5.
4. Di Stefano A., Ricciardolo F.L.M., Caramori G. Bronchial inflammation and bacterial load in stable COPD is associated with TLR4 overexpression. *Eur. Respir. J.*, 2017, Vol. 49, no. 5, 1602006. doi: 10.1183/13993003.02006-2016.
5. Freeman C.M., Martinez F.J., Han M.K. Lung CD8<sup>+</sup> T cells in COPD have increased expression of bacterial TLRs. *Respir. Res.*, 2013, Vol. 14, no. 1, 13. doi: 10.1186/1465-9921-14-13.
6. Fukata M., Vamadevan A.S., Abreu M.T. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. *Semin Immunol.*, 2009, Vol. 21, pp. 242-253.
7. Girardin S.E., Boneca I.G., Viala J., Chamaillard M., Labigne A., Thomas G., Philpott D.J., Sansonetti P.J. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.*, 2003, Vol. 278: pp. 8869-8872.
8. Häcker H., Vabulas R. M., Takeuchi O., Hoshino K., Akira S., Wagner H. Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 192, no. 4, pp. 595-600.
9. Ito M., Hanaoka M., Droma Y., Kobayashi N., Yasuo M., Kitaguchi Y., Horiuchi T., Ikegawa K., Katsuyama Y., Kubo K., Ota M. The association of Toll-like receptor 4 gene polymorphisms with the development of emphysema in Japanese subjects: a case control study. *BMC Res. Notes*, 2012, Vol. 5, 36. doi: 10.1186/1756-0500-5-36.
10. Kawai T., Adachi O., Ogawa T., Takeda K., Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*, 1999, Vol. 11, pp. 115-122.
11. Li H., Yang T., Li F.-Y., Ning Q., Sun Z.-M. TLR4 overexpression inhibits endothelial PAS domain-containing protein 1 expression in the lower respiratory tract of patients with chronic COPD. *Cell. Physiol. Biochem.*, 2016, Vol. 39, pp. 685-692.
12. Lund J., Sato A., Akira S., Medzhitov R., Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 2003, Vol. 198, pp. 513-520.
13. Marin L., Colombo P., Bebawy M., Young P.M., Traini D. Chronic obstructive pulmonary disease: pathophysiology, current methods of treatment and the potential for simvastatin in disease management. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2011, Vol. 8, no. 9, pp. 1205-1220.
14. Nadigel J., Préfontaine D., Bagloli C.J., Maltais F., Bourbeau J., Eidelman D.H., Hamid Q. Cigarette smoke increases TLR4 and TLR9 expression and induces cytokine production from CD8<sup>+</sup> T cells in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Res.*, 2011, Vol. 12, no. 1, 149. doi: 10.1186/1465-9921-12-149.
15. Pauwels R., Rabe K. Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Lancet*, 2004, Vol. 364, no. 9434, pp. 613-620.
16. Putra A.C., Eguchi H., Lee K.L., Yamane Y., Gustine E., Isobe T., Nishiyama M., Hiyama K., Poellinger L., Tanimoto K. The A Allele at rs13419896 of EPAS1 is associated with enhanced expression and poor prognosis for non-small cell lung cancer. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 8, e0134496. doi: 10.1371/journal.pone.0134496.
17. Ranoa D.R., Kelley S.L., Tapping R.I. Human lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and CD14 independently deliver triacylated lipoproteins to Toll-like receptor 1 (TLR1) and TLR2 and enhance formation of the ternary signaling complex. *J. Biol. Chem.*, 2013, Vol. 288, no. 14, pp. 9729-9741.
18. Rawluszko-Wieczorek A.A., Horbacka K., Krokowicz P., Misztal M., Jagodziński P.P. Prognostic potential of DNA methylation and transcript levels of HIF1A and EPAS1 in colorectal cancer. *Mol. Cancer Res.*, 2014, Vol. 12, no. 8, pp. 1112-1127.
19. Reséndiz-Hernández J.M., Falfán-Valencia R. Genetic polymorphisms and their involvement in the regulation of the inflammatory response in asthma and COPD. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2018, Vol. 27, no. 1, pp. 125-133.
20. Schnare M., Holt A.C., Takeda K., Akira S., Medzhitov R. Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88. *Curr. Biol.*, 2000, Vol. 10, no. 18, pp. 1139-1142.

21. Sinden N.J., Stockley R.A. Systemic inflammation and comorbidity in COPD: a result of “overspill” of inflammatory mediators from the lungs. Review of the evidence. *Thorax*, 2010, Vol. 65, no. 10, pp. 930-936.
22. Takeda K., Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.*, 2005, Vol. 17, no. 1, pp. 1-14.
23. Takeda N., Maemura K., Imai Y., Harada T., Kawanami D., Nojiri T., Manabe I., Nagai R. Endothelial PAS domain protein 1 gene promotes angiogenesis through the transactivation of both vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1. *Circ. Res.*, 2004, Vol. 95, no. 2, pp. 146-153.
24. Takeuchi O., Takeda K., Hoshino K., Adachi O., Ogawa T., Akira S. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int. Immunol.*, 2000, Vol. 12, no. 1, pp. 113-117.
25. Vestbo J., Hurd S.S., Agusti A.G., Jones P.W., Vogelmeier C., Anzueto A., Barnes P.J., Fabbri L.M., Martinez F.J., Nishimura M., Stockley R.A., Sin D.D., Rodriguez-Roisin R. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2013, Vol. 187, no. 4, pp. 347-365.
26. World Health Organization, the top 10 causes of death, 2014. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> (Accessed 14 February 2015).
27. Wouters E.F., Reynaert N.L., Dentener M.A., Vernooy J.H. Systemic and local inflammation in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: is there a connection? *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 2009, Vol. 6, no. 8, pp. 638-647.
28. Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Sanjo H., Uematsu S., Kaisho T., Hoshino K., Takeuchi O., Kobayashi M., Fujita T., Takeda K., Akira S. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature*, 2002, Vol. 420, no. 6913, pp. 324-329.
29. Yamasaki K., Eeden S. Lung macrophage phenotypes and functional responses: role in the pathogenesis of COPD. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, Vol. 19, no. 2, 582. doi: 10.3390/ijms19020582.
30. Yanagisawa S., Ichinose M. Definition and diagnosis of asthma-COPD overlap (ACO). *Allergol. Int.*, 2018, Vol. 67, no. 2, pp. 172-178.
31. Yoo S., Takikawa S., Geraghty P., Argmann C., Campbell J., Lin L., Huang T., Tu Z., Foronjy R.F., Spira A., Schadt E.E., Powell C.A., Zhu J. Integrative analysis of DNA methylation and gene expression data identifies EPAS1 as a key regulator of COPD. *PLoS Genet.*, 2015, Vol. 11, no. 1, e1004898. doi: 10.1371/journal.pgen.1004898.
32. Zhen Q., Liu J.F., Liu J.B., Wang R.F., Chu W.W., Zhang Y.X., Tan G. L., Zhao X.J., Lv B.L. Endothelial PAS domain-containing protein 1 confers TKI-resistance by mediating EGFR and MET pathways in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Biol. Ther.*, 2015, Vol. 16, no. 4, pp. 549-557.

---

**Авторы:**

**Белоглазов В.А.** — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой внутренней медицины № 2, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», г. Симферополь, Республика Крым, Россия

**Яцков И.А.** — ассистент кафедры внутренней медицины № 2, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», г. Симферополь, Республика Крым, Россия

**Усеинова Р.Х.** — студентка кафедры внутренней медицины № 2, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», г. Симферополь, Республика Крым, Россия

**Authors:**

**Beloglazov V.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Internal Medicine No. 2, S. Georgievsky Medical Academy, V. Vernadsky Crimea Federal University, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation

**Yatskov I.A.**, Associate Professor, Department of Internal Medicine No. 2, S. Georgievsky Medical Academy, V. Vernadsky Crimea Federal University, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation

**Useinova R.Kh.**, Student, Department of Internal Medicine No. 2, S. Georgievsky Medical Academy, V. Vernadsky Crimea Federal University, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation

---

Поступила 30.10.2020  
Принята к печати 10.01.2021

Received 30.10.2020  
Accepted 10.01.2021

# ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРИ АТОПИЧЕСКОМ ДЕРМАТИТЕ. ОСНОВНЫЕ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ И КОРРЕЛЯЦИИ СТАДИЙНОСТИ В ВОЗРАСТНОМ АСПЕКТЕ. ВЗАИМОСВЯЗЬ С СИСТЕМНЫМИ ПРОЦЕССАМИ ДЕРМАТОЛОГИЧЕСКОГО И НЕДЕРМАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ

Дрождина М.Б.<sup>1</sup>, Сулова Е.В.<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> КОГБУЗ «Детский клинический консультативно-диагностический центр», г. Киров, Россия

**Резюме.** Атопический дерматит — одно из наиболее распространенных хронических воспалительных заболеваний кожи, обусловлено как терминальными дефектами дифференцировки кератиноцитов, так и выраженными иммунными реакциями 2-го типа. Атопический дерматит — достаточно гетерогенное заболевание, в зависимости от возрастного подтипа, вызванное активацией Th22-, Th17/IL-23- и Th1-пути цитокинов. Клинические исследования с применением классической и таргетной терапии помогли выяснить вклад различных иммунных осей в фенотип заболевания.

Представлена современная теория опосредованности активации Th2-реакций за счет врожденных лимфоидных клеток 2-й группы. Описаны корреляции иммунного ответа при острых (IL-4, IL-5, IL-13, IL-31, CCL18, IL-22, белки S100A) и хронических (IFN $\gamma$ , CXCL9 и CXCL10) проявлениях атопического дерматита. Обсуждается теория взаимосвязи клинических проявлений и сверхэкспрессии ряда цитокинов (IL-4, IL-13). Показана корреляция фенотипа периферической крови при атопическом дерматите раннего детского возраста и у взрослых пациентов с выработкой отдельных сывороточных биомаркеров. В дополнение к избыточной выработке Th17, раннее начало атопического дерматита у детей коррелировало с повышенными уровнями антимикробных пептидов, что может служить сигнальным маркером, запускающим заболевание. В статье даны сведения о взаимосвязи атопического дерматита с другими системными неаллергическими процессами и заболеваниями (псориаз, атеросклероз, сердечно-сосудистые заболевания, ожирение). Несмотря на разную полярность Т-клеток при атопическом дерматите и псориазе и разные группы вырабатываемых цитокинов при данных заболеваниях (псориаз в значительной степени обусловлен Th17 и связанной с ними активацией IL-17, атопический дерматит — следствие доминирования Th2, и связанной с ними избыточной

## Адрес для переписки:

Дрождина Марианна Борисовна  
ФГБОУ ВО «Кировский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ  
610998, Россия, г. Киров, ул. К. Маркса, 112.  
Тел.: 8 (912) 827-62-52.  
E-mail: drozhdina@yandex.ru

## Address for correspondence:

Drozhdina Marianna B.  
Kirov State Medical University  
610998, Russian Federation, Kirov, K. Marx str., 112  
Phone: 7 (912) 827-62-52.  
E-mail: drozhdina@yandex.ru

## Образец цитирования:

М.Б. Дрождина, Е.В. Сулова «Иммунный ответ при атопическом дерматите. Основные патогенетические механизмы и корреляции стадийности в возрастном аспекте. Взаимосвязь с системными процессами дерматологического и недерматологического профиля» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 2. С. 237-244. doi: 10.15789/1563-0625-IRI-2138  
© Дрождина М.Б., Сулова Е.В., 2021

## For citation:

M.B. Drozhdina, E.V. Suslova "Immune response in atopic dermatitis: main pathogenetic mechanisms and stage-dependent correlations with age in regard to dermatological and non-dermatological systemic processes", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2021, Vol. 23, no. 2, pp. 237-244.  
doi: 10.15789/1563-0625-IRI-2138  
DOI: 10.15789/1563-0625-IRI-2138

продукцией IL-4 и IL-13), оба заболевания демонстрируют активацию Th1 и Th22 с повышением продукции интерферона- $\gamma$  и IL-22 соответственно. В статье также описана интересная гипотеза влияния белка TWEAK на течение atopического дерматита и псориаза. Кератиноциты и фибробласты кожи в ответ на повышенную активность TWEAK производят ряд хемоаттрактивных и провоспалительных факторов, обычно встречающихся при atopическом дерматите и псориазе, в частности IL-13 и IL-17. Изолированно TWEAK не является этиологическим фактором atopического дерматита или псориаза, но он вызывает продукцию хемокинов, которые способствуют хемотаксису патогенных воспалительных клеток в кожу. При дальнейшем изучении данного патогенетического фактора станет возможным синтезировать новый таргетный препарат для лечения atopического дерматита и псориаза.

*Ключевые слова:* atopический дерматит, цитокины, IL-4, IL-5, IL-13, IL-25, IL-31, CCL18, IL-22, S100A, IFN $\gamma$ , CXCL9, CXCL10, псориаз, белок TWEAK

## IMMUNE RESPONSE IN ATOPIC DERMATITIS: MAIN PATHOGENETIC MECHANISMS AND STAGE-DEPENDENT CORRELATIONS WITH AGE IN REGARD TO DERMATOLOGICAL AND NON-DERMATOLOGICAL SYSTEMIC PROCESSES

Drozhdina M.B.<sup>a</sup>, Suslova E.V.<sup>b</sup>

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

<sup>b</sup> Pediatric Clinical Consultative and Diagnostic Center of the Kirov Region, Kirov, Russian Federation

**Abstract.** Atopic dermatitis is one of the most common chronic inflammatory skin diseases caused by both terminal defects in keratinocyte differentiation, and pronounced type 2 immune responses. Atopic dermatitis is a fairly heterogenous disease, depending on the age subtype caused by activation of the Th22, Th17/IL-23 and Th1 cytokine pathway. Clinical studies using classical and targeted therapies have helped to determine contribution of various immune axes to the disease phenotype.

We present the modern activation theory mediated by Th2 reactions, due to congenital lymphoid cells of the 2<sup>nd</sup> group. Correlations between immune response in acute (IL-4, IL-5, IL-13, IL-31, CCL18, IL-22, S100A proteins) and chronic (IFN $\gamma$ , CXCL9, and CXCL10) manifestations of atopический дерматит are described. The theory of relationship between clinical manifestations and overexpression of some cytokines (IL-4, IL-13) is discussed. The correlation was shown between peripheral blood phenotype in atopический дерматит of early childhood and in adult patients and individual production of serum biomarkers. In addition to excess Th17 production, early onset of atopический дерматит in children correlated with elevated levels of antimicrobial peptides, which may serve as a signaling marker that triggers the disease. The article provides information about relationship between atopический дерматит and other systemic non-allergic processes and diseases (psoriasis, atherosclerosis, cardiovascular diseases, obesity). Despite different polarity of T cells in atopический дерматит and psoriasis, and different groups of cytokines produced in these diseases. Psoriasis is most of all due to Th17 associated with activation of IL-17, whereas atopический дерматит is a consequence of Th2 dominance and associated excessive production of IL-4 and IL-13. The both diseases show activation of Th1 and Th22 with increased production of interferon- $\gamma$  and IL-22, respectively. The article also concerns an interesting hypothesis on effects of the TWEAK protein upon clinical course of atopический дерматит and psoriasis. In response to increased TWEAK activity, keratinocytes and skin fibroblasts produce a number of chemoattractant and pro-inflammatory factors commonly found in atopический дерматит and psoriasis, in particular IL-13 and IL-17. TWEAK is not a single etiological factor for atopический дерматит or psoriasis, but it causes the production of chemokines that promote chemotaxis of pathogenic inflammatory cells into the skin. With further studies of this pathogenetic factor, it will be possible to synthesize a new targeted drug for the treatment of atopический дерматит and psoriasis.

*Keywords:* atopический дерматит, cytokines, IL-4, IL-5, IL-13, IL-25, IL-31, CCL18, IL-22, S100A, IFN $\gamma$ , CXCL9, CXCL10, psoriasis, TWEAK protein

## Введение

Атопический дерматит (АД) – наиболее распространенное в человеческой популяции генетически детерминированное хроническое воспалительное заболевание кожи, обусловленное иммунологическими механизмами и триггерными экспозом-факторами. Распространенность заболевания достигает 7% у взрослых и 25% у детей [14, 18, 46], что диктует необходимость дальнейшего изучения патогенетических корреляций с целью оптимизирования имеющихся терапевтических методик.

Участие системы иммунитета и изученные корреляции развития различных форм атопического дерматита в зависимости от активации различных звеньев иммунной системы.

Известно, что АД является заболеванием с Т-клеточной опосредованностью. Атопический дерматит ассоциируется с активацией различных подклассов Т-клеток [19]. При данном заболевании преимущественно активируется иммунный ответ Т-хелперов 2-го типа. Несмотря на то, что, как в пораженной, так и в интактной коже пациентов с АД, отмечается повышенная экспрессия Th2 [33], иммунный ответ посредством активации Th22, Th17/IL-23 и Th1-цитокинов, вероятно, также играет важную роль в патогенезе заболевания, особенно при некоторых разновидностях АД [47].

Острые проявления АД характеризуются выраженным повышением ответа Th2 (IL-4, IL-5, IL-13, IL-31 и CCL18) и Th22 (IL-22 и белки S100A). В ряде исследований было продемонстрировано, что эти медиаторы снижают регуляцию генов терминальной дифференцировки и продуктов плотного соединения, таких как клаудины, способствуя дефекту кожного барьера у пациентов с АД [2, 9, 11, 16, 26, 38]. Врожденные лимфоидные клетки 2-й группы также могут продуцировать Th2-цитокины. Несмотря на то, что данная разновидность иммунных клеток присутствует в очагах поражения на гораздо более низких уровнях, чем Т-клетки, тем не менее повышенный уровень врожденных лимфоидных клеток 2-й группы был выявлен в очагах АД по сравнению со здоровой кожей пациентов контрольной группы [4, 5]. Не исключено, что, возможно, врожденные лимфоидные клетки 2-й группы способствуют Th2-реакциям [5, 17].

Ответы Th2 и Th22 усиливаются и при хронических проявлениях АД, но с параллельной активацией оси Th1 (IFN $\gamma$ , CXCL9 и CXCL10) [45].

IL-22 также был идентифицирован как ключевой медиатор эпидермальной гиперплазии при хронических проявлениях АД [29]. Повышенный уровень IL-31, цитокина, непосредственно связанного с зудом, коррелирует со степенью тяжести заболевания [40].

Многочисленные исследования показали, что в патогенезе АД среди всех иммунных медиаторов Th2 IL-4 и IL-13 играют ключевую роль, именно с их полиморфизмом связана клиническая картина заболевания [20, 32, 37, 39], что было подтверждено и в исследованиях на животных, когда экземопоподобные реакции были индуцированы у трансгенных мышей со сверхэкспрессией этих цитокинов [6, 50]. Кератиноциты, дифференцированные в присутствии IL-4 и IL-13, показали значительно сниженную экспрессию гена филагрина (FLG), даже у пациентов без мутаций FLG [22]. Помимо филагрина в пораженной коже пациентов с АД под воздействием IL-4 и IL-13 подавляется выработка и других белковых субстанций, например лорикрина – главного белкового компонента клеточной оболочки терминальных кератиноцитов, а также инволюкрина – белка, защищающего плазмолемму эпидермальных кератиноцитов от воздействия гидролитических ферментов. Все эти факторы приводят к нарушению кожного барьера [26]. Скомпрометированный кожный барьер способствует проникновению бактерий и аллергенов в кожу, что приводит к вторичным инфекциям кожи и сенсибилизации аллергенами. Помимо вышеперечисленных свойств IL-4 и IL-13 активно ингибируют выработку в коже антимикробных пептидов (AMP), в результате чего формируются предрасполагающие условия для проникновения в кожу пациентов с атопическим дерматитом *Staphylococcus aureus*, усугубляется воспалительная реакция и снижаются барьерные функции кожи [27, 35].

Несмотря на то, что АД обычно начинается в раннем детстве, в большинстве исследований по атопическому дерматиту изучаются только взрослые пациенты. Тем не менее всем известны возрастные корреляции клинических проявлений АД. В младенческом периоде преобладают эксудативные явления, проявления заболевания локализуются чаще на открытых участках кожных покровов, разгибательной поверхности конечностей. В детском возрастном периоде острые воспалительные явления и эксудация менее выражены, процесс носит характер хронического воспаления. Высыпания локализуются большей частью в области сгибательной поверхности

локтевых, коленных, лучезапястных и голеностопных суставов, на задней поверхности шеи, в заушной области. У подростков и взрослых преобладают явления инфильтрации с лихенификацией, эритема застойного характера. Высыпания носят генерализованный характер, не приуроченный к конкретным зонам конечностей или других участков кожных покровов [30]. Помимо вышеперечисленных клинических различий возрастных форм заболевания, у пациентов с АД различительно отличаются сывороточные биомаркеры и микробиом кожи. Большинство исследований периферической крови у детей с АД [1, 13, 25, 28, 48] демонстрируют, что активность заболевания коррелирует с несколькими сывороточными биомаркерами: IL-31, CCL17, CCL22, CCL27, эозинофилами и IgE и ограниченным набором маркеров Th2/Th1 с использованием экспрессии мРНК [7, 36]. Фенотип периферической крови при атопическом дерматите раннего детского возраста характеризовался только экспансией Th2 без других подгрупп Т-клеток [12]. Напротив, кровь взрослых пациентов с АД демонстрирует увеличение уровня Th22, что, возможно, отражает постоянную иммунную стимуляцию на протяжении продолжительного времени [12].

Исследуя кожный иммунитет пациентов с АД, были выявлены различия между иммунными профилями кожи младенцев и взрослых [15]. Как у детей с ранним дебютом заболевания, так и у взрослых с АД наблюдается сильная активация Th2, однако при поражениях кожи у младенцев с АД усиливается врожденное и связанное с IL-17 воспаление. Эта двойная активация ответов Th2 и Th17 может быть объяснена выраженным повышением уровня IL-19 – цитокина, который может быть индуцирован как IL-17, так и IL-4/IL-13 и который, как было показано, усиливает влияние IL-17 на кератиноциты [10]. В дополнение к избыточной выработке Th17, раннее начало АД у детей коррелировало с повышенными уровнями антимикробных пептидов (AMP) [10]. Это повышение уровней AMP может служить сигнальным маркером, запускающим заболевание [23, 27]. Тем не менее на коже у здоровых детей контрольной группы также наблюдалось повышение уровня медиаторов, ассоциированных с Th17 и Th22, включая AMP [34, 43], что, возможно, связано с необходимостью кожи новорожденного бороться с инфекциями, когда иммунная система кожи еще недостаточно развита. Таким образом, патогенная роль этих иммунных

осей у детей еще должна быть оценена посредством клинических исследований.

#### **Патогенетическая взаимосвязь атопического дерматита и других системных процессов**

В последнее время появилось много сведений, что АД напрямую связан с другими системными неаллергическими процессами и заболеваниями. В первую очередь это касается метаболического синдрома [8, 42, 49] и сердечно-сосудистых заболеваний [44]. Хроническое воспаление ускоряет атеросклероз, вызванный повторяющимся повреждением сосудов при любом системном воспалительном процессе [24]. Считается, что повышенные уровни TNF $\alpha$ , IL-17 и IL-22 способствуют увеличению риска сердечно-сосудистых заболеваний у пациентов с хроническим бляшечным псориазом и еще с рядом других хронических воспалительных заболеваний кожи [31]. Эти цитокины также активируются в коже пациентов с АД, что в комплексе с усилением активности ряда циркулирующих Т-клеток может опосредованно вызывать повреждение эндотелия у этой популяции пациентов. Данные *in vitro* предполагают, что IL-17 действительно может способствовать провоспалительным изменениям в эндотелиальных клетках и ингибирование IL-17 в мышинной модели атеросклероза значительно уменьшает заболевание [21].

Говоря о взаимосвязи псориаза и атопического дерматита, необходимо отметить, что эти патологические процессы являются распространенными Т-клеточными воспалительными заболеваниями кожи. Эти заболевания сходны в том, что эпидермальные кератиноциты реагируют на цитокины, вырабатываемые Т-клетками, которые способны изменять рост и дифференцировку эпителиоцитов, составляя основную часть общего фенотипа заболевания. При изучении атопического дерматита и псориаза у пациентов в европейско-американской популяции, эти два заболевания демонстрируют разную полярность Т-клеток и разные группы вырабатываемых цитокинов. Псориаз является заболеванием, в значительной степени обусловленным Th17 и связанной с ним активацией IL-17, в то время как атопический дерматит является следствием доминирования Th2 и связанной с ним избыточной продукцией IL-4 и IL-13. В то же время оба заболевания демонстрируют активацию Th1 и Th22 с повышением продукции интерферона- $\gamma$  и IL-22 соответственно. В 70% случаев атопического дерматита наблюдается гиперпродукция IgE, сопровождающаяся аллергией или бронхиальной астмой, что, по всей

вероятности, вызвано активацией Th2, которых, как правило, не хватает при псориазе. Псориаз и atopический дерматит безусловно рассматриваются как отдельные заболевания с различными клиническими, тканевыми и молекулярными фенотипами, но эта точка зрения не учитывает различные подтипы АД, включая врожденный, азиатский и педиатрический АД, которые имеют выраженный IL-17 компонент, а также некоторые схожие паттерны гистологических особенностей тканей. Следовательно, при рассмотрении диапазона различных фенотипов АД можно сделать вывод, что псориаз и АД у некоторых групп пациентов создают перекрывающиеся иммуно-гистопатологические характеристики этих двух заболеваний. Проведенные в 2017 году исследования Института аллергии и иммунологии в Ла Джолла (La Jolla) выявили общий фактор, ведущий к воспалению в коже как при АД, так и при псориазе. У пациентов, страдавших АД, и у пациентов с псориазом было выявлено единое выраженное повышение белка из семейства фактора некроза опухоли (TNF) – TWEAK, который, как выяснилось, вызывает провоспалительные сигналы, приводящие к накоплению иммунных клеток в коже [3, 41]. Изучая молекулу TWEAK и ее рецептор Fn14, было доказано, что они участвуют в развитии нескольких заболеваний: воспалительных заболеваний кишечника, артрита и волчаночноподобного нефрита. TWEAK и его рецептор Fn14 – молекулярные регуляторы ответной реакции тканей при повреждениях. Кератиноциты и фибробласты кожи в ответ на по-

вышенную активность TWEAK производят ряд хемоаттрактивных и провоспалительных факторов, обычно встречающихся при atopическом дерматите и псориазе, в частности IL-13 и IL-17. Изолированно TWEAK не является этиологическим фактором atopического дерматита или псориаза, но он вызывает продукцию хемокинов, которые способствуют хемотаксису патогенных воспалительных клеток в коже [41]. В настоящее время ведутся исследования по синтезированию таргетного биопрепарата, подавляющего выработку TWEAK, что позволит в достаточной степени контролировать воспаление кожи, чтобы устранить симптомы и улучшить качество жизни пациентов с АД и псориазом.

## Заключение

Улучшение понимания патофизиологии АД и его взаимосвязи с другими дерматологическими и недерматологическими системными заболеваниями является актуальнейшим направлением научных исследований и позволяет найти ответы в применении таргетных препаратов, направленных на коррекцию или устранение конкретных составляющих или звеньев патогенеза. Генетическое, молекулярное и клиническое фенотипирование пациентов позволяет понять, какие патологические механизмы наиболее актуальны у конкретного пациента, что даст возможность применить персонализированную медицину для лечения пациентов с atopическим дерматитом и сопутствующими заболеваниями.

## Список литературы / References

1. Дрождина М.Б., Кошкин С.В. Atopический дерматит. Киров, 2018. 136 с. [Drozhhdina M.B., Koshkin S.V. Atopic dermatitis]. Kirov, 2018. 136 p.
2. Дрождина М.Б., Суслова Е.В. Новейшие клинико-эпидемиологические данные, влияние экспосома и патогенетических факторов на развитие atopического дерматита. Доказательные методы терапии atopического дерматита в современных условиях // Медицинский вестник Северного Кавказа, 2021. Т. 1, № 1. С. 102-112. [Drozhhdina M.B., Suslova E.V. The latest clinical and epidemiological data, the influence of exposome and pathogenetic factors on the development of atopic dermatitis. Evidence-based methods of therapy the atopic dermatitis in modern stage. *Meditinskiiy vestnik Severnogo Kavkaza = Medical Bulletin of the North Caucasus*, 2021, Vol. 1, no. 1, pp. 102-112.]
3. Кошкин С.В., Дрождина М.Б. Atopический дерматит: руководство. Москва, 2019. 112 с. [Koshkin S.V., Drozhhdina M.B. Atopic dermatitis: the manual]. Moscow, 2019. 112 p.
4. Bonefeld C.M., Geisler C. The role of innate lymphoid cells in healthy and inflamed skin. *Immunol. Lett.*, 2016, Vol. 179, pp. 25-28.
5. Bruggen M.C., Bauer W.M., Reininger B., Clim E., Captarencu C., Steiner G.E. et al. *In situ* mapping of innate lymphoid cells in human skin: evidence for remarkable differences between normal and inflamed skin. *J. Invest. Dermatol.*, 2016, Vol. 136, no. 12, pp. 2396-2405.

6. Chen L., Overbergh L., Mathieu C., Chan L.S. The development of atopic dermatitis is independent of immunoglobulin E up-regulation in the K14-IL-4 SKH1 transgenic mouse model. *Clin. Exp. Allergy*, 2008, Vol. 38, no. 8, pp. 1367-1380.
7. Czarnowicki T., Esaki H., Gonzalez J., Malajian D., Shemer A., Noda S. et al. Early pediatric atopic dermatitis shows only a cutaneous lymphocyte antigen (CLA)(+) TH2/TH1 cell imbalance, whereas adults acquire CLA(+) TH22/TC22 cell subsets. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 136, no. 4, pp. 941-951.e3.
8. Czarnowicki T., Malajian D., Shemer A., Fuentes-Duculan J., Gonzalez J., Suarez-Farinas M. et al. Skin-homing and systemic T-cell subsets show higher activation in atopic dermatitis versus psoriasis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 136, no. 1, pp. 208-211.
9. Danso M.O., van Drongelen V., Mulder, A., van Esch J., Scott H., van Smeden J. et al. TNF-alpha and Th2 cytokines induce atopic dermatitis-like features on epidermal differentiation proteins and stratum corneum lipids in human skin equivalents. *J. Invest. Dermatol.*, 2014, Vol. 134, no. 7, pp. 1941-1950.
10. Dorschner R.A., Lin K.H., Murakami M., Gallo R.L. Neonatal skin in mice and humans expresses increased levels of antimicrobial peptides: innate immunity during development of the adaptive response. *Pediatr. Res.*, 2003, Vol. 53, no. 4, pp. 566-572.
11. Egawa G., Kabashima K. Multifactorial skin barrier deficiency and atopic dermatitis: essential topics to prevent the atopic march. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 138, no. 2, pp. 350-358.e1.
12. Esaki H., Brunner P.M., Renert-Yuval Y., Czarnowicki T., Huynh T., Tran G. et al. Early onset pediatric atopic dermatitis is Th2, but also Th17 polarized in skin. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 138, no. 6, pp. 1639-1651.
13. Ezzat M.H., Hasan Z.E., Shaheen K.Y. Serum measurement of interleukin-31 (IL-31) in paediatric atopic dermatitis: elevated levels correlate with severity scoring. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2011, Vol. 25, no. 3, pp. 334-339.
14. Flohr C., Mann J. New insights into the epidemiology of childhood atopic dermatitis. *Allergy*, 2014, Vol. 69, pp. 3-16.
15. Ganguly D., Chamilos G., Lande R., Gregorio J., Meller S., Facchinetti V. et al. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J. Exp. Med.*, 2009, Vol. 206, no. 9, pp. 1983-1994.
16. Gutowska-Owsiak D., Schaupp A.L., Salimi M., Selvakumar T.A., McPherson T., Taylor S. et al. IL-17 downregulates filaggrin and affects keratinocyte expression of genes associated with cellular adhesion. *Exp. Dermatol.*, 2012, Vol. 21, no. 2, pp. 104-110.
17. Halim T.Y., Steer C.A., Matha L., Gold M.J., Martinez-Gonzalez I., McNagny K.M. et al. Group 2 innate lymphoid cells are critical for the initiation of adaptive T helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation. *Immunity*, 2014, Vol. 40, no. 3, pp. 425-435.
18. Hanifin J.M., Reed M.L., Eczema prevalence impact Working Group. A population-based survey of eczema prevalence in the United States. *Dermatitis*, 2007, Vol. 18, no. 2, pp. 82-91.
19. Harden J.L., Krueger J.G., Bowcock A.M. The immunogenetics of psoriasis: a comprehensive review. *J. Autoimmun.*, 2015, Vol. 64, pp. 66-73.
20. He J.Q., Chan-Yeung M., Becker A.B., Dimich-Ward H., Ferguson A.C., Manfreda J. et al. Genetic variants of the IL13 and IL4 genes and atopic diseases in at-risk children. *Genes Immun.*, 2003, Vol. 4, no. 5, pp. 385-389.
21. Heil P.M., Maurer D., Klein B., Hulstsch T., Stingl G. Omalizumab therapy in atopic dermatitis: depletion of IgE does not improve the clinical course – a randomized, placebo-controlled and double blind pilot study. *J. Dtsch Dermatol. Ges.*, 2010, Vol. 8, no. 12, pp. 990-998.
22. Howell M.D., Kim B.E., Gao P., Grant A.V., Boguniewicz M., Debenedetto A. et al. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2007, Vol. 120, no. 1, pp. 150-155.
23. Iram N., Mildner M., Prior M., Petzelbauer P., Fiala C., Hacker S. et al. Age-related changes in expression and function of Toll-like receptors in human skin. *Development*, 2012, Vol. 139, pp. 4210-4219.
24. Kanda N., Watanabe S. Increased serum human beta-defensin-2 levels in atopic dermatitis: relationship to IL-22 and oncostatin M. *Immunobiology*, 2012, Vol. 217, no. 4, pp. 436-445.
25. Kawamoto N., Kaneko H., Takemura M., Seishima M., Sakurai S., Fukao T. et al. Age-related changes in intracellular cytokine profiles and Th2 dominance in allergic children. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2006, Vol. 17, no. 2, pp. 125-133.
26. Kim B.E., Leung D.Y., Boguniewicz M., Howell M.D. Loricrin and involucrin expression is down-regulated by Th2 cytokines through STAT-6. *Clin. Immunol.*, 2008, Vol. 126, no. 3, pp. 332-337.

27. Kim J., Kim B.E., Lee J., Han Y., Jun H.Y., Kim H. et al. Epidermal thymic stromal lymphopoietin predicts the development of atopic dermatitis during infancy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 137, no. 4, pp. 1282-1285. e1-4.
28. La Grutta S., Richiusa P., Pizzolanti G., Mattina A., Pajno G.B., Citarrella R. et al. CD4(+) IL-13(+) cells in peripheral blood well correlates with the severity of atopic dermatitis in children. *Allergy*, 2005, Vol. 60, no. 3, pp. 391-395.
29. Lee C.H., Yu H.S. Biomarkers for itch and disease severity in atopic dermatitis. *Curr. Probl. Dermatol.*, 2011, Vol. 41, pp. 136-148.
30. Lehmann H.S., Heaton T., Mallon D., Holt P.G. Staphylococcal enterotoxin-B-mediated stimulation of interleukin-13 production as a potential aetiologic factor in eczema in infants. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2004, Vol. 135, no. 4, pp. 306-312.
31. Leonardi S., Cuppari C., Manti S., Filippelli M., Parisi G.F., Borgia F. et al. Serum interleukin 17, interleukin 23, and interleukin 10 values in children with atopic eczema/dermatitis syndrome (AEDS): association with clinical severity and phenotype. *Allergy Asthma Proc.*, 2015, Vol. 36, no. 1, pp. 74-81.
32. Lesiak A., Kuna P., Zakrzewski M., van Geel M., Bladergroen R.S., Przybylowska K. et al. Combined occurrence of filaggrin mutations and IL-10 or IL-13 polymorphisms predisposes to atopic dermatitis. *Exp. Dermatol.*, 2011, Vol. 20, no. 6, pp. 491-495.
33. Leung D.Y., Guttman-Yassky E. Deciphering the complexities of atopic dermatitis: shifting paradigms in treatment approaches. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 134, no. 4, pp. 769-779.
34. Margolis J.S., Abuabara K., Bilker W., Hoffstad O., Margolis D.J. Persistence of mild to moderate atopic dermatitis. *JAMA Dermatol.*, 2014, Vol. 150, no. 6, pp. 593-600.
35. Nakamura Y., Oscherwitz J., Cease K.B., Chan S.M., Munoz-Planillo R., Hasegawa M. et al. Staphylococcus delta-toxin induces allergic skin disease by activating mast cells. *Nature*, 2013, Vol. 503, no. 7476, pp. 397-401.
36. Nakazato J., Kishida M., Kuroiwa R., Fujiwara J., Shimoda M., Shinomiya N. Serum levels of Th2 chemokines, CCL17, CCL22, and CCL27, were the important markers of severity in infantile atopic dermatitis. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2008, Vol. 19, no. 7, pp. 605-613.
37. Namkung J.H., Lee J.E., Kim E., Kim H.J., Seo E.Y., Jang H.Y. et al. Association of polymorphisms in genes encoding IL-4, IL-13 and their receptors with atopic dermatitis in a Korean population. *Exp. Dermatol.*, 2011, Vol. 20, no. 11, pp. 915-919.
38. Nomura T., Kabashima K. Advances in atopic dermatitis in 2015. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 138, Iss. 6, pp. 1548-1555.
39. Novak N., Kruse S., Kraft S., Geiger E., Kluken H., Fimmers R. et al. Dichotomic nature of atopic dermatitis reflected by combined analysis of monocyte immunophenotyping and single nucleotide polymorphisms of the interleukin-4/interleukin-13 receptor gene: the dichotomy of extrinsic and intrinsic atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.*, 2002, Vol. 119, no. 4, pp. 870-875.
40. Oliva M., Renert-Yuval Y., Guttman-Yassky E. The 'omics' revolution: redefining the understanding and treatment of allergic skin diseases. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 16, no. 5, pp. 469-476.
41. Sidler D., Wu P., Herro R., Claus M., Wolf D., Kawakami Y. et al. TWEAK mediates inflammation in experimental atopic dermatitis and psoriasis. *Nat. Commun.*, 2017, Vol. 8, 15395. doi: 10.1038/NCOMMS15395.
42. Silverberg J.I., Simpson, E.L. Association between obesity and eczema prevalence, severity and poorer health in US adolescents. *Dermatitis*, 2014, Vol. 25, pp. 172-181.
43. Silverberg J.I. Persistence of childhood eczema into adulthood. *JAMA Dermatol.*, 2014, Vol. 150, no. 6, pp. 591-592.
44. Silverberg J.I., Becker L., Kwasny M., Menter A., Cordoro K.M., Paller A.S. Central obesity and high blood pressure in pediatric patients with atopic dermatitis. *JAMA Dermatol.*, 2015, Vol. 151, no. 2, pp. 144-152.
45. Szegedi K., Kremer A.E., Kezic S., Teunissen M.B., Bos J.D., Luiten R.M. et al. Increased frequencies of IL-31-producing T cells are found in chronic atopic dermatitis skin. *Exp. Dermatol.*, 2012, Vol. 21, no. 6, pp. 431-436.
46. Weidinger S., Novak N. Atopic dermatitis. *Lancet*, 2016, Vol. 387, no. 10023, pp. 1109-1122.
47. Werfel T., Allam J.P., Biedermann T., Eyerich K., Gilles S., Guttman-Yassky E. et al. Cellular and molecular immunologic mechanisms in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 138, no. 2, pp. 336-349.
48. Wu K.G., Li T.H., Chen C.J., Cheng H.I., Wang T.Y. Correlations of serum Interleukin-16, total IgE, eosinophil cationic protein and total eosinophil counts with disease activity in children with atopic dermatitis. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2011, Vol. 24, no. 1, pp. 15-23.

49. Zhang A., Silverberg J.I. Association of atopic dermatitis with being overweight and obese: a systematic review and metaanalysis. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2015, Vol. 72, no. 4, pp. 606-616.

50. Zheng T., Oh M.H., Oh S.Y., Schroeder J.T., Glick A.B., Zhu, Z. Transgenic expression of interleukin-13 in the skin induces a pruritic dermatitis and skin remodeling. *J. Invest. Dermatol.*, 2009, Vol. 129, no. 3, pp. 742-751.

---

**Авторы:**

*Дрождина М.Б.* — к.м.н., доцент, доцент кафедры дерматовенерологии и косметологии ФГБОУ ВО «Кировский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Киров, Россия

*Сулова Е.В.* — к.м.н., врач ультразвуковой диагностики КОГБУЗ «Детский клинический консультативно-диагностический центр», г. Киров, Россия

**Authors:**

*Drozhdina M.B.*, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Dermatovenereology and Cosmetology, Kirov State Medical University, Kirov, Russian Federation

*Suslova E.V.*, PhD (Medicine), Doctor for Ultrasound Diagnostics, Pediatric Clinical Consultative and Diagnostic Center of the Kirov Region, Kirov, Russian Federation

---

Поступила 07.10.2020  
Принята к печати 09.01.2021

Received 07.10.2020  
Accepted 09.01.2021

---

## IgM- и IgA-ОТВЕТ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ В1-КЛЕТОК НА Т-НЕЗАВИСИМЫЙ АНТИГЕН ВТОРОГО РОДА В ПРИСУТСТВИИ $\gamma\delta$ T-КЛЕТОК *IN VITRO*

Снегирева Н.А.<sup>1</sup>, Сидорова Е.В.<sup>1</sup>, Дьяков И.Н.<sup>1</sup>, Гаврилова М.В.<sup>1</sup>,  
Чернышова И.Н.<sup>1</sup>, Пашков Е.П.<sup>2</sup>, Свитич О.А.<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup> ФGAOU ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Резюме.** IgA является важным компонентом мукозальной системы организма, поскольку ограничивает поступление патогенов в кровоток. С нарушениями в синтезе IgA могут быть связаны такие воспалительные заболевания кишечника, как болезнь Крона и неспецифический язвенный колит. В кишечнике источником IgA являются как В1-клетки, так и В2-клетки. Особое внимание уделяется В1-клеткам, благодаря их способности отвечать преимущественно на Т-независимые антигены второго типа и вырабатывать естественные антитела. В1-клетками образуется около 50% всех IgA в кишечнике, в числе которых есть и специфические антитела к компонентам микроорганизмов, содержащихся на слизистых в желудочно-кишечном тракте. Механизм образования IgA Т-независимым способом исследован не достаточно полно. Имеется предположение, что помощь в переключении на синтез IgA могут оказывать  $\gamma\delta$ T-клетки. В пользу этого предположения может свидетельствовать совместная локализация с В1-лимфоцитами в слизистой оболочке кишечника и участие наравне с В1-клетками в формировании первой линии защиты от патогенов. Кроме того, обе эти субпопуляции лимфоцитов появляются в онтогенезе первыми, раньше «классических» В2- и  $\alpha\beta$ T-клеток. Исходя из этого, было сделано предположение, что  $\gamma\delta$ T-лимфоциты могут быть вовлечены в процессы индукции и/или регуляции образования IgM и IgA В1-клетками при ответе на ТН2-антигены.

В настоящей работе было проведено исследование воздействия  $\gamma\delta$ T-клеток на образование В1-лимфоцитами IgA- и IgM-продуктов *in vitro* в ответ на  $\alpha(1,3)$ -декстран. Также было проведено исследование динамики экспрессии мРНК тяжелых цепей IgM и IgA В1-клетками в культурах в разные сроки после помещения в систему *in vitro*.

В ходе исследования было получено, что при совместном культивировании В1-клеток с 20%  $\gamma\delta$ T-лимфоцитов не происходит увеличения числа специфичных к декстрану IgM-продуктов. Экспрессия мРНК тяжелой цепи IgM в совместной культуре в ответ на декстран также была сниженной, по сравнению с ответом чистой культуры В1-клеток. Вопреки ранее сделанному предположению, присутствие  $\gamma\delta$ T-лимфоцитов в культуре не увеличивало образование IgA-продуктов. Полученные данные свидетельствуют о проявлении регуляторных свойств  $\gamma\delta$ T-лимфоцитов при ответе В1-клеток на Т-независимые антигены.

**Ключевые слова:** IgM, IgA, В1-клетки,  $\gamma\delta$ T-клетки, Т-независимый антиген 2-го типа, кишечник, декстран

### Адрес для переписки:

Снегирева Надежда Анатольевна  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт имени  
И.И. Мечникова», Москва, Россия  
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а.  
Тел.: 8 (964) 590-73-53.  
E-mail: snegireva.nadezda@gmail.com

### Address for correspondence:

Snegireva Nadezda A.  
105064, Russian Federation, Moscow,  
Malyy Kazenny lane, 5a.  
I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera  
Phone: 7 (964) 590-73-53.  
E-mail: snegireva.nadezda@gmail.com

### Образец цитирования:

Н.А. Снегирева, Е.В. Сидорова, И.Н. Дьяков,  
М.В. Гаврилова, И.Н. Чернышова, Е.П. Пашков,  
О.А. Свитич «IgM- и IgA-ответ перитонеальных  
В1-клеток на Т-независимый антиген второго рода  
в присутствии  $\gamma\delta$ T-клеток *in vitro*» // Медицинская  
иммунология, 2021. Т. 23, № 2. С. 245-256.  
doi: 10.15789/1563-0625-IAI-2157

© Снегирева Н.А. и соавт., 2021

### For citation:

N.A. Snegireva, E.V. Sidorova, I.N. Dyakov, M.V. Gavrilova,  
I.N. Chernishova, E.P. Pashkov, O.A. Svitich "IgM- and  
IgA-response of peritoneal B1 cells to the TI-2 antigen  
with *in vitro* presence of  $\gamma\delta$ T cells", Medical Immunology  
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 2,  
pp. 245-256. doi: 10.15789/1563-0625-IAI-2157

DOI: 10.15789/1563-0625-IAI-2157

## IgM- AND IgA-RESPONSE OF PERITONEAL B1 CELLS TO THE TI-2 ANTIGEN WITH *IN VITRO* PRESENCE OF $\gamma\delta$ T CELLS

Snegireva N.A.<sup>a</sup>, Sidorova E.V.<sup>a</sup>, Dyakov I.N.<sup>a</sup>, Gavrilova M.V.<sup>a</sup>, Chernishova I.N.<sup>a</sup>, Pashkov E.P.<sup>b</sup>, Svitich O.A.<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** IgA is an important component of the mucosal system of the body. It limits penetration of pathogens into the bloodstream. Inflammatory diseases such as Crohn disease and colitis may be associated with disorders of IgA synthesis. Both B1 and B2 cells are a source of IgA in the intestines. Special attention is paid to B1 cells, which are able to respond to T-independent type 2 antigens and produce natural antibodies. B1 cells produce about 50% of the intestinal IgA including specific antibodies to the components of microorganisms contained in the gastrointestinal tract. The mechanism of IgA formation in the T-independent way is not investigated in details. It was suggested that the  $\gamma\delta$ T-cells promote switching to IgA synthesis by B1 cells. This assumption may be supported by their co-localization with B1 lymphocytes in the intestinal mucosa, as well as participation, along with B1 cells, in formation of the first-line defense against the pathogens. In addition, the both lymphocyte subpopulations evolve during initial ontogenesis, earlier than "classic" B2 and  $\alpha\beta$ T cells. Therefore, it was suggested that  $\gamma\delta$ T lymphocytes may be involved into the processes of induction and/or regulation of IgM and IgA production by B1 cells in response to TH2 antigens.

In the present study, we have shown the effect of  $\gamma\delta$ T cells upon generation of IgM- and IgA-forming B1 cells in response to  $\alpha$ -1,3-dextran *in vitro*. We also studied the dynamics of the mRNA expression for IgM- and IgA-heavy chains by the B1 cells at different terms of *in vitro* culture.

It was found that, during co-cultivation of B1 cells with 20%  $\gamma\delta$ T lymphocytes, there is no increase in the number of dextran-specific IgM-producing cells. The B1 cells exhibited an increase of IgM heavy chain mRNA expression in response to dextran but not in co-cultures. Expression of mRNA for IgM heavy chains in co-cultures was decreased compared to non-treated B-cell cultures. Contrary to the earlier assumption, a presence of  $\gamma\delta$ T lymphocytes in culture did not enhance the formation of IgA products. The obtained data suggest regulatory properties of the  $\gamma\delta$ T lymphocytes during the B1 cells response to T-independent antigens.

**Keywords:** IgM, IgA, B1 cells,  $\gamma\delta$ T cells, TI-2 antigen, intestine, dextran

### Введение

Мукозальная система кишечника является важным компонентом иммунной системы организма. Факторы врожденного иммунитета, находящиеся в слизистой оболочке кишечника, обеспечивают баланс с микрофлорой. Кроме того, слизистая оболочка является барьером, который защищает организм от потенциально вредных пищевых антигенов и патогенных микробов [9]. В слизистой кишечника локализовано большое число иммунных факторов, выполняющих защитные функции.

Микрофлора кишечника представлена разнообразными микроорганизмами. Компоненты микробов являются антигенами различной природы, значительная часть которых имеет небелковую Т-независимую природу. Они, в свою очередь, подразделяются на антигены первого и второго рода (ТН1 и ТН2) [28]. Для ТН2-антигенов характерно наличие множества одинаковых регулярно расположенных антигенных детерминант. Связывание с В-клеточными рецепторами обуславливает их кластеризацию и приводит к

индукции сигнала, достаточного для инициации ответа В-клетки в отсутствие «второго» сигнала от Т-лимфоцитов. На ТН2-антигены отвечают преимущественно клетки минорной субпопуляции В1-лимфоцитов. К ТН2-антигенам относятся бактериальные полисахариды, полимеризованный флагеллин, а также синтетические антигены — поливинилпирролидон, полипептиды, состоящие из D-аминокислот, конъюгаты гаптенных с Т-независимыми носителями и др. Таким образом, ТН2-антигены являются важным компонентом окружающей среды, и в организме сформировалась система взаимодействия с такими антигенами и микроорганизмами, являющимися их источниками.

К компонентам иммунной системы, отвечающим за взаимодействие с микрофлорой, относится IgA слизистого секрета кишечника, участвующий в регуляции состава кишечной микрофлоры [30]. Принято считать, что IgA является основным иммуноглобулином в слизистых секретах и вырабатывается как В2-, так и В1-клетками. В2-лимфоциты локализуются в лимфоидной ткани кишечника в основном в Пейе-

ровых бляшках, а В1 — преимущественно в *lamina propria* [34]. В2-клетки отвечают на Т-зависимые антигены (ТЗ) белковой природы и для переключения классов продуцируемых иммуноглобулинов им нужна «помощь» Т-клеток. В1-клетки отвечают преимущественно на ТН2-АГ и, как было отмечено выше, помощь «классических» Т-хелперов при этом не вовлекается.

Первым изотипом антител, продуцируемых В-лимфоцитом, является IgM. Известно, что в «классическом» варианте В2-лимфоцитам для смены изотипа антител с IgM на любой другой изотип требуется помощь Т-хелперных клеток. Как было отмечено выше, В1-лимфоциты не способны привлекать «классическую» Т-клеточную помощь при ответе на Т-независимые антигены. В то же время В1-лимфоциты продуцируют значительную часть IgA в кишечнике [15], что свидетельствует о том, что переключение изотипа иммуноглобулина в них происходит даже в отсутствие помощи от Т-хелперов.

В настоящее время способность В1-клеток переключаться на синтез IgA Т-независимым путем уже не подвергается сомнению, однако не выяснены механизмы, вовлеченные в этот процесс. В исследовании Macpherson A.J. и соавт. (2000) отмечается, что присутствие бактериальной микрофлоры в кишечнике является необходимым условием для последующей индукции синтеза секреторного IgA [25]. Тем не менее работы по изучению продукции IgA В1-клетками при добавлении ТН2-антигенов *in vitro* в литературе практически не встречаются. Известен ряд факторов, способствующих синтезу IgA В1-клетками [27]. В работе Genestier (2007) показано, что различные TLR-лиганды могут индуцировать продукцию IgA в В1-клетках *in vitro* [22]. Известно также, что некоторые цитокины (TGF- $\beta$ , IL-5, IL-15 и BAFF и др.) могут способствовать переключению на IgA. Помимо гуморальных факторов, на продукцию IgA может влиять и ряд клеток, таких как макрофаги, дендритные клетки и др. Участие Т-хелперов при этом остается незначительным [27]. Так, известно, что образование IgA происходит и у мышей, имеющих дефицит Т-лимфоцитов, у CD40<sup>-/-</sup> или CD28<sup>-/-</sup> мышей (т.е. не имеющих важных костимулирующих молекул, участвующих в индукции Т-зависимого иммунного ответа) и т.д. [21]. В работе Fagarasan S. (2001) показано, что культивирование IgM<sup>+</sup> В-клеток вместе со стромальными клетками слизистой оболочки кишечника преимущественно усиливает дифференцировку В-лимфоцитов в IgA<sup>+</sup>-плазматические клетки [18]. Также было выдвинуто предположение, что на синтез IgA В1-клетками могут влиять и другие компоненты мукозальной иммунной системы [27], в частности — субпопуляция  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов [22, 41].

$\gamma\delta$ Т-лимфоциты локализуются преимущественно в коже и слизистых оболочках [29]. Они проявляют различные биологические эффекты: могут проявлять цитотоксичность, участвуют в иммунорегуляции, презентации антигенов и репарации поврежденных тканей и органов [7]. Особенности происхождения и полиморфность свойств этих клеток обуславливают их способность участвовать в процессах как врожденного, так и адаптивного иммунитета.  $\gamma\delta$ Т-лимфоциты, вероятно, могут влиять и на синтез иммуноглобулинов. В пользу этого предположения может свидетельствовать совместная локализация с В1-лимфоцитами в слизистой оболочке кишечника и участие наравне с В1-клетками в формировании первой линии защиты от патогенов. Кроме того, обе эти субпопуляции лимфоцитов появляются в онтогенезе первыми, раньше «классических» В2- и  $\alpha\beta$ Т-клеток. Исходя из этого, было сделано предположение, что  $\gamma\delta$ Т-лимфоциты могут быть вовлечены в процессы индукции и/или регуляции образования IgM и IgA В1-клетками при ответе на ТН2-антигены [16].

Изучение роли  $\gamma\delta$ Т-клеток в продукции IgM и IgA В1-лимфоцитами в слизистой кишечника является важной и весьма актуальной задачей в области фундаментальной иммунологии. Исходя из этого, целью представленной работы было изучение образования IgM и IgA В1-клетками в присутствии  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов и ТН2-антигена.

## Материалы и методы

### Животные

В работе использовали мышей линии СВА, самок, массой 18-20 г. Мыши получены из питомника «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России. Работа с животными проводилась согласно рекомендациям в ГОСТ 33215-2014 [5].

### Антиген и индукция иммунного ответа

В качестве ТН2-антигена для индукции иммунного ответа в В1-лимфоцитах использовали  $\alpha(1,3)$ -декстран *Leuconostoc mesenteroides* (Декс) (Sigma, США) в конечной концентрации 10 нг/мл в культуре клеток.

*In vitro* клетки культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах (Nunc, США) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (5% CO<sub>2</sub>, 37 °С) в среде RPMI 1640 с добавлением 10% «HI FBS», 2% антибиотиков «PenStrep», 0,02 М HEPES (Gibco, США), 5 × 10<sup>-7</sup>М 2-меркаптоэтанола (Sigma, США), 0,003М L-глутамин (Gibco, США), 0,001 М пирувата натрия (Gibco, США).

### Выделение В1-лимфоцитов

В1-клетки выделяли у мышей СВА из перитонеальной полости. Полный протокол выделения представлен в статье [2]. Для получения В-лимфоцитов клетки инкубировали с магнитными бусами, покрытыми антителами крысы к

CD19 мыши “CD19 MicroBeads, mouse” (Miltenyi, Германия), в течение 15 мин при 4 °С. Смесь перитонеальных В1- и В2-клеток выделяли на магнитной MS колонке “MS Column” (Miltenyi, Германия). Затем методом негативной иммуномгнитной сепарации удаляли В2-популяцию, последовательно инкубируя перитонеальные В-клетки вначале с биотинилированными антителами к CD23 мыши “Biotin Rat Anti-Mouse CD23” (BD Biosciences, США) (20 мин при 4 °С), а затем с магнитными бусами “Biotin Binder Dynabeads” (Invitrogen, США) (30 мин при +4 °С на ротаторе “Multi Bio RS-24” (Biosan, Латвия)). В результате выделения получали суспензию В1-клеток с чистотой более 95%.

#### Выделение $\gamma\delta$ T-лимфоцитов

Выделение  $\gamma\delta$ T-лимфоцитов проводилось с помощью модифицированного метода [38]. Кишечник измельчали и промывали в среде RPMI 1640 с 8% “HI FBS” (Gibco, США) без антибиотиков. Для выделения лимфоцитов промытые фрагменты кишечника инкубировали на горизонтальном шейкере в среде RPMI 1640 содержащую 8% ЭТС “HI FBS”, 1 мМ ЭДТА (Calbiochem, США), 1 мМ дитиотрейтола (ДТТ) (Sigma, США), и 2% антибиотиков “PenStrep” (GIBCO, США) предварительно прогретой в термостате до +37 °С. Состав сред подробно описан в публикации [38]. Полученную суспензию фильтровали для удаления остатков кишечника и клеточных агломератов и осаждали центрифугированием.

Из полученной суспензии лимфоцитов слизистой оболочки кишечника мыши выделяли  $\gamma\delta$ T-клетки методом иммуномагнитной сепарации с использованием “TCR  $\gamma\delta$ T cell Isolation Kit” (Miltenyi, Германия). Полученные  $\gamma\delta$ T-клетки переводили в полную среду для культивирования *in vitro* и инкубировали согласно схеме опыта. Из кишечника 3 мышей удавалось получить  $1,0 \pm 0,2$  млн  $\gamma\delta$ T-клеток с чистотой 90-92%.

#### Клеточный иммуноферментный анализ ELISPOT

ELISPOT проводили в планшетах с подложкой из нитроцеллюлозы Elispot MultiScreen (Merck, США). Для определения числа иммуноглобулинобразующих клеток (ИГОК) на нитроцеллюлозу сенсibilизировали антитела козы против IgM, IgA и IgG мыши “Goat Anti-Mouse IgG, IgA, IgM [H+L]” (Invitrogen, США). Для определения числа антителообразующих клеток (АОК) к Декс фильтры сенсibilозировали Декс в концентрации 10 нг/мл в течение 2 ч при +37 °С, затем 12 ч при +20 °С. После сенсibilизации фильтры отмывали ФСБ и с помощью 1% БСА блокировали сайты неспецифической сорбции на мембране. Клетки культивировали на фильтрах 12-18 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С в среде RPMI 1640 с 1% ЭТС “HI FBS”.

Для определения числа АОК в лунку планшета вносили 100-200 × 10<sup>3</sup> клеток в 100 мкл среды, для определения ИГОК – 5-50 × 10<sup>3</sup> клеток в лунку. По окончании инкубации клетки удаляли. Образовавшиеся иммунные комплексы выявляли с использованием иммуноферментного анализа, поэтапно добавляя биотинилированные антитела к IgM “Goat Anti-Mouse IgM” или IgA мыши “Goat Anti-Mouse IgA” (Invitrogen, США), конъюгат Streptavidin HRP “AbD” (Bio-Rad, США) и субстратный буфер, содержащий 1,4-хлорнафтол и перекись водорода. Реакцию останавливали дистиллированной водой. После высыхания фильтров подсчитывали число окрашенных точек – «спотов» (каждая точка соответствует клетке). Полученный результат пересчитывали на 10<sup>6</sup> клеток.

#### Оценка экспрессии генов IgM и IgA в В1-лимфоцитах

Для оценки экспрессии генов IgM и IgA в В1-лимфоцитах, из клеток выделяли общую РНК на сроки: 0 ч, 1 ч, 1-е, 4-е и 7-е сут. Экстракция РНК из клеток проводилась с использованием набора для выделения нуклеиновых кислот «АмплиСенс РИБО-сорб» (ИнтерЛабСервис, РФ). Для проведения реакции обратной транскрипции (ОТ) в работе использовался набор «ОТ-1» (Синтол, РФ). Реакция проводилась по протоколу, представленному в инструкции к набору. Для постановки ПЦР-РВ применяли метод с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I и использованием «Набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I» (Синтол, РФ). Реакция проводилась согласно протоколу, приложенному к набору. Образцы супернатантов, полученные *in vitro* были исследованы на наличие мРНК константных областей иммуноглобулинов IgA и IgM. Данные о последовательностях праймеров для детекции экспрессируемых генов константных областей тяжелых цепей IgA (Ig  $\alpha$  C region-1, sense primer GTCTGCGAGAAATCCCACCA, antisense primer CATCTGAACCCAGGAGCAGG) и IgM мыши (Ig  $\mu$  C region. sense primer CCTGGCAACCTATGAAAC, antisense primer GGATGCTGTGGGTAAGT) взяты из статьи [35]. Уровень экспрессии генов иммуноглобулинов IgM и IgA указаны в количестве копий на 10<sup>6</sup> клеток.

#### Статистическая обработка данных

Для обработки результатов применяли непараметрический метод анализа с использованием критерия Манна–Уитни. Все графики и расчеты выполняли с использованием программ GraphPad Prism 6 и Microsoft Office Excel. Достоверными считались результаты при  $p \leq 0,05$ . Данные представлены в форме медиан и 5-95 перцентилей.

## Результаты

### Образование IgM- и IgA-продуцирующих В1-лимфоцитов при совместной инкубации с $\gamma\delta$ Т-клетками

Первой задачей была отработка системы *in vitro* для совместного культивирования В1- и  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов. Из литературных данных известно, что в слизистой оболочке кишечника  $\gamma\delta$ -TCR экспрессируют  $\approx$  20-40% всех Т-лимфоцитов [14], в зависимости от линии мышей. Ранее было установлено, что  $\gamma\delta$ Т-клетки мышей линии СВА составляют около 10%, а В1-клетки – около 5% всех лимфоцитов, выделяемых из тонкого кишечника [38].

В1-лимфоциты способны отвечать на ТН2-антигены без «классической» помощи Т-хелперных клеток. Условия экспериментов были подобраны так, чтобы обеспечить взаимодействие выделенных субпопуляций В1- и  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов. В эксперименте оценивали следующие группы сравнения: интактные В1-лимфоциты (В1), В1-лимфоциты с добавлением 10 нг/мл Декс (В1 + Декс), смесь В1- и  $\gamma\delta$ Т-клеток (В1 +  $\gamma\delta$ Т), смесь В1 с  $\gamma\delta$ Т-клетками с добавлением 10 нг/мл Декс (В1 +  $\gamma\delta$ Т + Декс). Число ИГОК и АОК определяли на 4-е и 7-е сутки [8].

Предшественниками IgA-продуцентов в кишечнике являются преимущественно В1-клетки. Основным местом локализации В1-лимфоцитов, помимо слизистых оболочек, являются серозные полости, в том числе брюшная полость [17], где они составляют около 40% от лимфоцитов [11]. В связи с этим в качестве источника В1-лимфоцитов для оценки влияния  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов на синтез IgA использовали клетки брюшной полости. Для инкубации *in vitro* использовали соотношения  $\gamma\delta$ Т- и В1-клеток 1:10 и 1:5. Сравнивали количество АОК и ИГОК, образованных В1-клетками в монокультуре при добавлении Декс с числом АОК и ИГОК, образованных В1-клетками в ответ на Декс при совместной инкубации с  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами. На первом этапе работы число IgM- и IgA-АОК и ИГОК оценивали на 4-е сутки,  $\gamma\delta$ Т- и В1-клетки инкубировали в соотношении 1:10 (рис. 1).

При внесении ТН2-антигена Декс в культуру число IgM-АОК увеличивалось в 2 раза по сравнению с интактными В1-клетками. При этом достоверного возрастания числа IgM-ИГОК не происходило (рис. 1А). IgA-продуцентов на 4-е сутки выявлялось на порядок меньше, чем IgM-ИГОК. Добавление Декс к В1-лимфоцитам не приводило к достоверному изменению числа клеток, продуцирующих IgA *in vitro* (рис. 1В). IgA-АОК, специфичных к Декс на 4-е сутки выявлено не было.

Совместное культивирование  $\gamma\delta$ Т-клеток с В1-клетками в соотношении 1:10, а также до-

бавление к смеси Декс также не приводило к достоверным изменениям числа IgM-АОК и IgM- и IgA-ИГОК (рис. 1). По-видимому,  $\gamma\delta$ Т-клетки в нашем эксперименте не оказывали влияния на продукцию неспецифических антител, но были способны угнетать образование антител, специфичных к Декс.

Поскольку влияния  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов на образование АОК и ИГОК В1-клетками при совместной инкубации в соотношении 1:10 выявлено не было, а соотношение  $\gamma\delta$ Т- и В1-клеток в норме [14] превышает использованное в эксперименте, была предпринята попытка увеличить количество  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов в культуре в рамках, которые позволяла методика их выделения, т.е. в 2 раза. Последующие эксперименты проводили, смешивая  $\gamma\delta$ Т- и В1-лимфоциты в соотношении 1:5.

Совместная инкубация  $\gamma\delta$ Т- и В1-клеток с Декс в соотношении 1:5 не приводила к увеличению числа IgM-АОК. Более того, число IgM-АОК в этой группе было достоверно ниже числа IgM-АОК в группе В1-клеток с Декс. Такие данные могут указывать на угнетающее действие  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов на специфический ответ В1-лимфоцитов на Декс (рис. 2).

Добавление к В1-лимфоцитам как  $\gamma\delta$ Т, так и Декс не изменяло индукцию IgA-ИГОК в сравнении с интактными В1-клетками (рис. 2). IgA-АОК при этом ни в одной группе выявлено не было. По-видимому, добавление Декс *in vitro* не приводит к увеличению уровня IgA-продуцентов среди В1-клеток и  $\gamma\delta$ Т-лимфоциты не влияют на образование IgA В1-лимфоцитами.

Таким образом, на 4-е сутки различного влияния  $\gamma\delta$ Т-клеток на продукцию IgA в ответ на ТН2-антиген Декс выявлено не было. Предположили, что для выявления IgA необходима более длительная совместная инкубация. Оценивали те же показатели на более поздние сроки. Результаты совместной культивации клеток двух субпопуляций в течение 7 суток в соотношении 1:5 представлены на рисунке 3.

На 7-е сутки инкубации В1-клеток с Декс выявлено увеличение в 2 раза как IgM-АОК так и IgM-ИГОК (рис. 3). При совместном культивировании В1-и  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов с Декс выявленное число специфичных IgM-АОК было в 2,5 раза больше, чем в культуре В1 и  $\gamma\delta$ Т без антигена, но достоверно не отличалось от числа IgM-АОК в культуре В1-клеток с Декс. Такие данные могут указывать, что  $\gamma\delta$ Т-клетки к 7 суткам перестают оказывать влияние на специфический IgM ответ В1-клеток на Декс.

По результатам экспериментов можно сделать вывод о супрессирующем влиянии  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов на специфический IgM-ответ на ТН2-антиген на 4-е сутки. Поскольку IgA-ИГОК

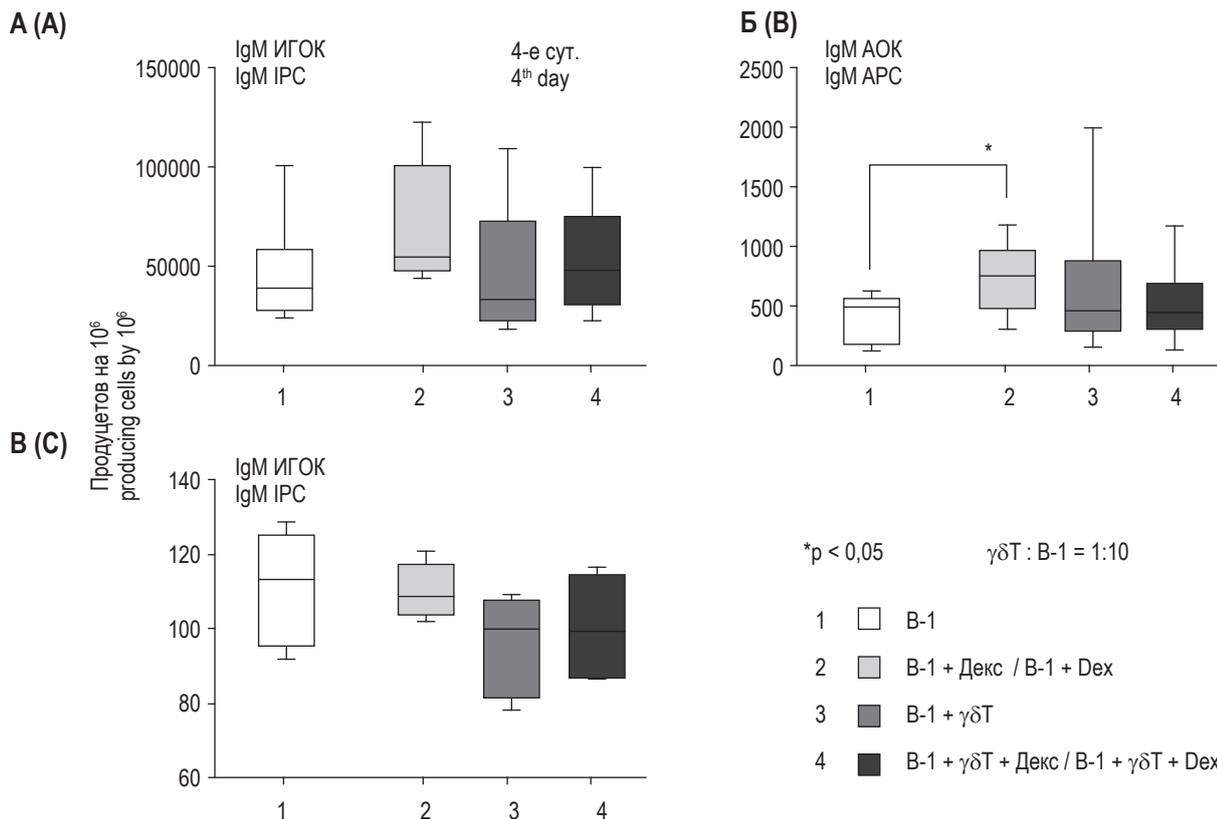


Рисунок 1. Количество Ig-продуцентов на 4-е сутки после инкубации  $\gamma\delta$ T- и B1-клеток *in vitro* в соотношении 1 к 10

Figure 1. The number of Ig-producing cells after co-incubation of  $\gamma\delta$ T and B-1 cells *in vitro* in a ratio of 1 to 10, 4<sup>th</sup> day

и IgA-АОК на 7-е сутки выявлено не было, можно заключить, что в условиях нашего эксперимента взаимодействие с  $\gamma\delta$ T-клетками не приводило к увеличению продукции IgA B1-лимфоцитами. Тем не менее отсутствие секретируемых молекул может свидетельствовать как об отсутствии их индукции, так и о нарушении трансляции и экспрессии/секреции. В связи с этим на следующем этапе работы был оценен уровень экспрессии генов тяжелых цепей IgM и IgA.

#### Динамика экспрессии генов тяжелой цепи IgM и IgA в B1-клетках в присутствии ТН2-антигена и/или $\gamma\delta$ T-клеток

Поскольку результаты полученные методом ELISPOT не являются достаточными для оценки генерации IgA-продуцентов, было решено использовать для этой цели молекулярный метод исследования ПЦР-РВ. Преимуществом такого анализа является возможность выявить синтезируемые, но не секретируемые иммуноглобулины.

Клетки  $\gamma\delta$ T- и B1-инкубировали *in vitro* в соотношении 1:5 с добавлением и без добавления Декс. Полученные данные по экспрессии гена тяжелой цепи IgM приведены на рисунке 4.

В течение первых суток во всех группах клеток изменений в экспрессии IgM не выявилось. На 4-е сутки при добавлении к B1-клеткам Декс

происходило достоверное увеличение экспрессии мРНК тяжелой цепи IgM, что соответствует описанным выше результатам, полученным методом ELISPOT. К 7-му дню уровень экспрессии мРНК IgM увеличивался в 4,6 раза в интактных B1-клетках, в 5,7 раза в B1-клетках при добавлении Декс.

При совместной инкубации B1- и  $\gamma\delta$ T-клеток, как с Декс, так и без него динамика экспрессии мРНК IgM была аналогичной динамике в интактных B1-лимфоцитах. Добавление Декс к смеси B1- и  $\gamma\delta$ T-клеток не приводило к усилению экспрессии мРНК тяжелой цепи IgM на 4-е сутки и на 7-е сутки. Такие данные могут указывать на супрессирующее действие  $\gamma\delta$ T-лимфоцитов, которое задерживает развитие ответа B1-клеток при контакте с Декс *in vitro*.

Результаты оценки экспрессии мРНК тяжелой цепи IgA в динамике указывают на ее усиление к 4-м суткам во всех группах. На 7-е сутки значения выходили на плато (рис. 5). В культуре B1+Декс экспрессия мРНК тяжелой цепи IgA была выше, чем в остальных группах. На 7-е сутки различий в экспрессии IgA в исследуемых культурах клеток уже не выявлялось.

Экспрессия мРНК тяжелой цепи IgA была выявлена у интактных B1-клеток и в смеси  $\gamma\delta$ T- и

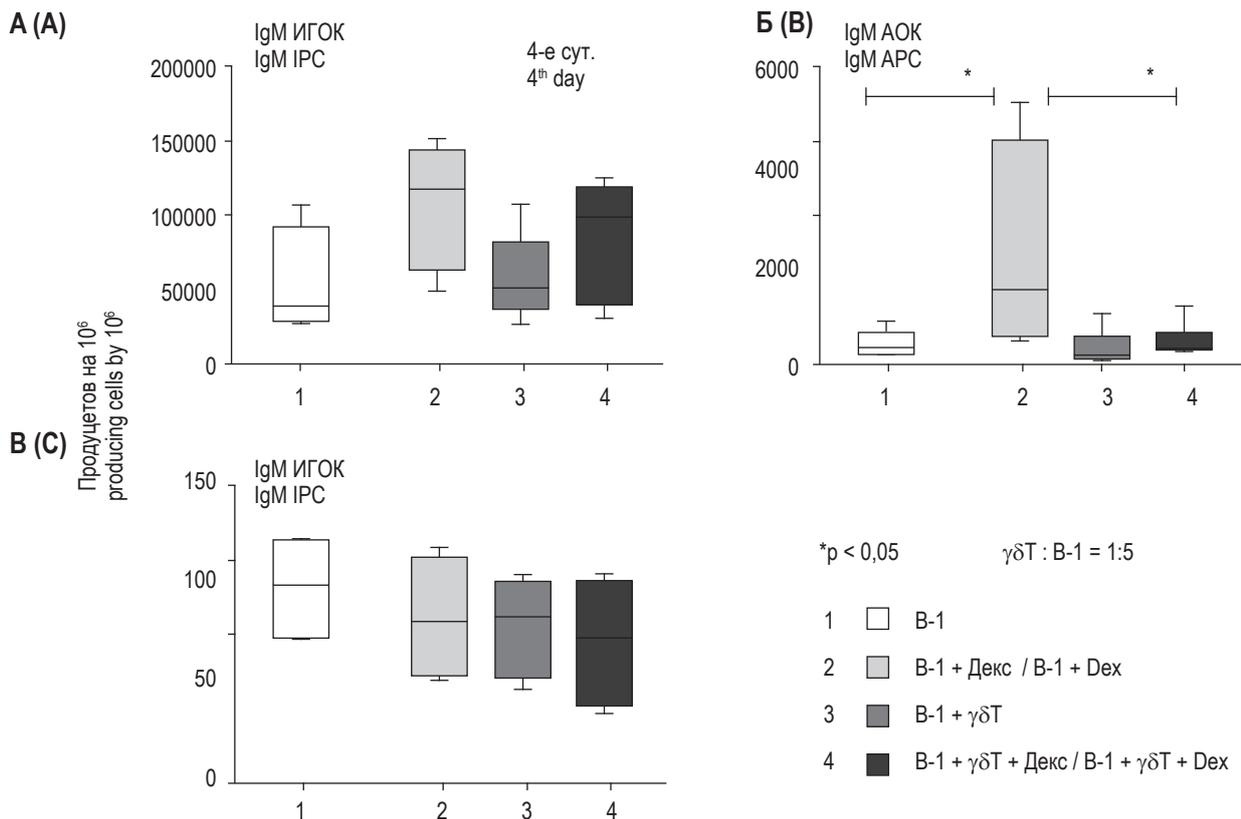


Рисунок 2. Количество Ig-продуцентов на 4-е сутки после инкубации  $\gamma\delta$ T- и В1-клеток *in vitro* в соотношении 1 к 5

Figure 2. The number of Ig-producing cells after co-incubation of  $\gamma\delta$ T and B-1 cells *in vitro* in a ratio of 1 to 5, 4<sup>th</sup> day

В1-лимфоцитов без антигена при инкубации в соотношении 1:5. Она увеличивалась уже в первый час совместной инкубации (в 4,5 и в 5,4 раза соответственно), однако через сутки экспрессия снижалась до исходного уровня.

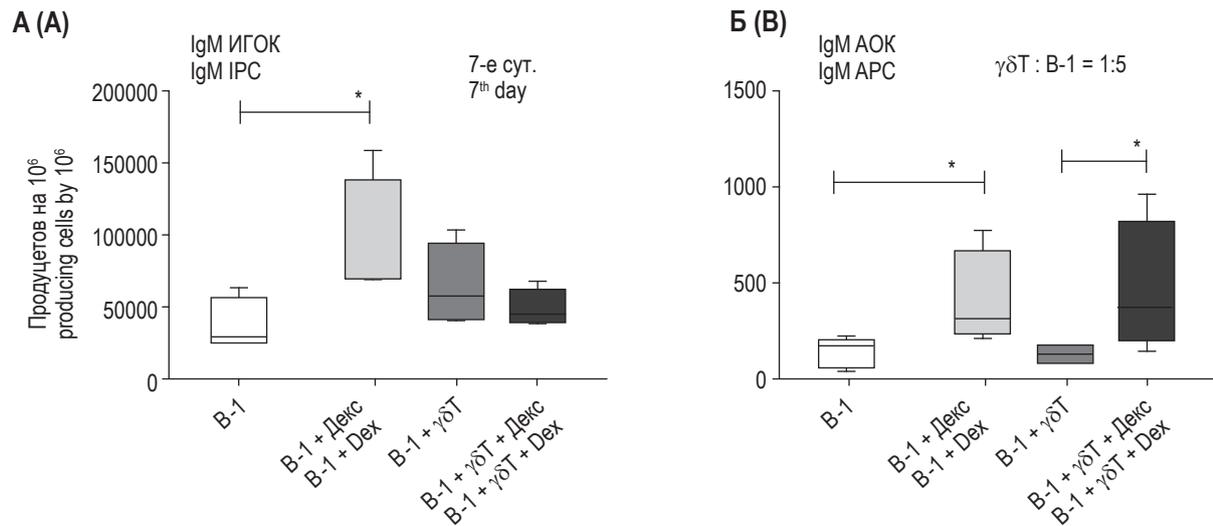
Добавление антигена Декс к смеси клеток В1 и  $\gamma\delta$ T не вызывает достоверного увеличения экспрессии мРНК тяжелой цепи IgA в течение первого часа, однако на 1-е сутки наблюдается наибольшее возрастание этого показателя относительно нулевой точки в сравнении с другими группами. Отсутствие усиления экспрессии IgA в 1-й час в группах с Декс можно объяснить преимущественным ответом В-лимфоцитов вообще и В1-клеток в частности при первом контакте с антигеном продукции IgM. По той же причине происходит усиление экспрессии IgM во всех группах вплоть до четвертых суток, где наибольшие уровни отмечаются при добавлении Декс к В1-клеткам.

Экспрессия мРНК тяжелых цепей IgA на 1-е сутки усиливалась во всех группах. При этом в группе В1-клеток с добавлением ТН2-антигена экспрессия возрастала в 6,5 раз, тогда как в остальных группах отмечалось усиление не более чем в 2 раза (рис. 5). Такие результаты могут быть объяснены супрессорным действием  $\gamma\delta$ T-клеток

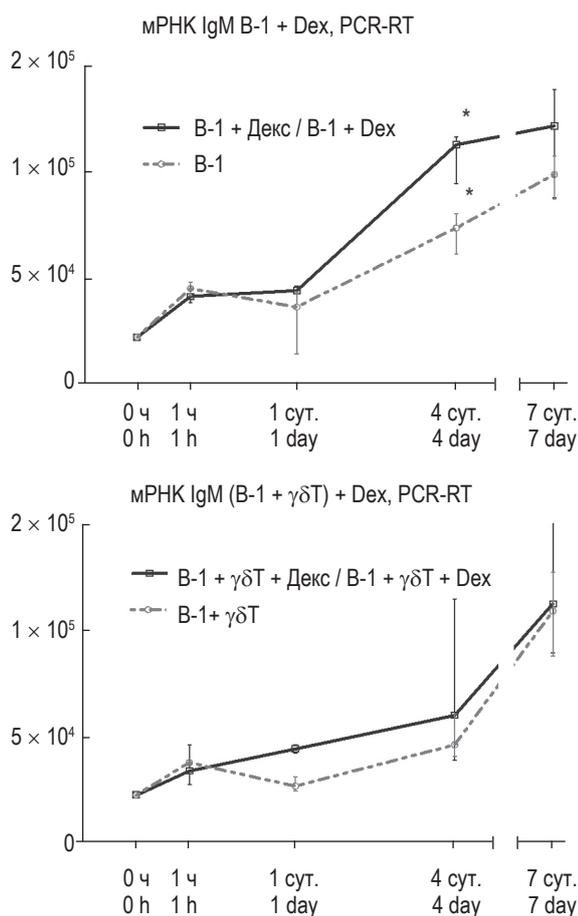
на способность В1-лимфоцитов экспрессировать IgA *in vitro* в ответ на ТН2-антиген.

## Обсуждение

В литературе есть большое количество данных, касающихся разнообразия субпопуляций  $\gamma\delta$ T-клеток, их локализации, свойств и роли в различных иммунных процессах. Однако о механизмах взаимодействия  $\gamma\delta$ T- с В-лимфоцитами известно мало. В частности показано, что  $\gamma\delta$ T-клетки мыши способны взаимодействовать с клетками сингенной В-клеточной лимфомы и индуцировали ее дифференцировку [13]. Помимо этого, встречаются сообщения о способности  $\gamma\delta$ T-лимфоцитов поддерживать и модулировать продукцию антител и влиять на дифференцировку популяций В-клеток селезенки [23]. Мыши с дефицитом  $\alpha\beta$ T-лимфоцитов сохраняют способность продуцировать антитела Т-зависимых подклассов IgG1 и IgE, что предполагает участие в этом процессе  $CD4^+$   $\gamma\delta$ T-клеток [32]. Упоминается также опосредованное влияние  $\gamma\delta$ T-клеток на продукцию антител. Rezende и соавт. (2015) показывают, что  $\gamma\delta$ T-клетки могут индуцировать  $CD4^+$  FoxP3<sup>+</sup> регуляторные Т-клетки, которые способны подавлять гуморальный ответ [12].



**Рисунок 3.** Количество Ig-продуцентов на 7-е сутки после инкубации  $\gamma\delta T$ - и B1-клеток *in vitro* в соотношении 1 к 5  
Figure 3. The number of Ig-producing cells after co-incubation of  $\gamma\delta T$  and B-1 cells *in vitro* in a ratio of 1 to 5, 7<sup>th</sup> day

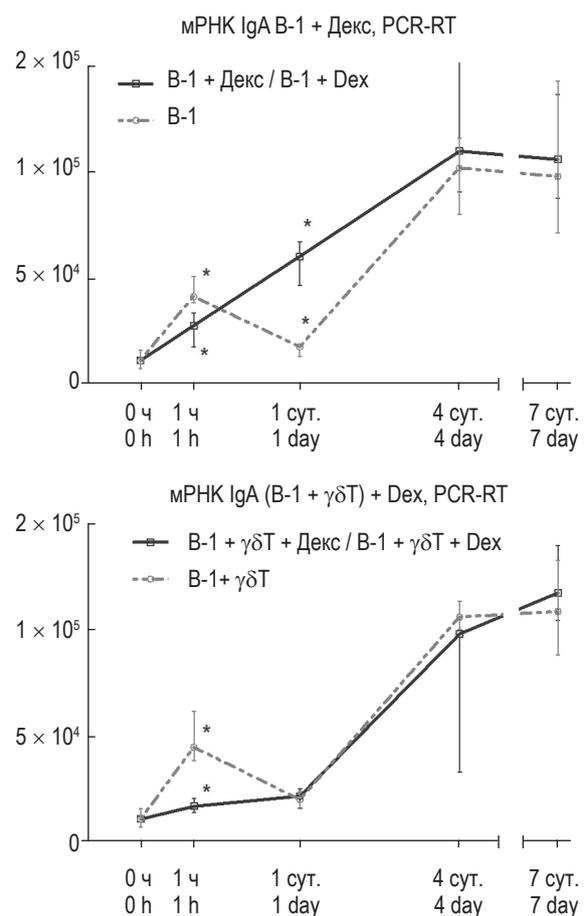


**Рисунок 4.** Динамика экспрессии мРНК тяжелой цепи IgM B1-клетками

Примечание.\* –  $p < 0,05$ .

Figure 4. An heavy chain IgM mRNA expression dynamics in the B-1 cells

Note. \*,  $p < 0.05$ .



**Рисунок 5.** Динамика экспрессии мРНК тяжелой цепи IgA B1-клетками

Примечание.\* –  $p < 0,05$ .

Figure 5. An heavy chain IgA mRNA expression dynamics in the B-1 cells

Note. \*,  $p < 0.05$ .

Однако большинство упомянутых исследований описывают  $\gamma\delta$ Т-клетки селезенки.

Имеется сообщение, что у мышей, у которых полностью отсутствуют  $\gamma\delta$ Т-лимфоциты, IgA-ответ на холерный и столбнячный токсин были значительно снижены в сравнении с нормой [20]. Однако практически отсутствуют данные о непосредственном воздействии  $\gamma\delta$ Т на продукцию антител. Ранее в опытах с мышами линии C57BL/6, нормальными и нокаутными по  $\gamma\delta$  ( $\gamma\delta$ Т-) *in vivo* нами были получены данные, что у нокаутных особей число IgA-продуцентов в селезенке норме и при иммунизации Декс также было снижено по сравнению с обычными C57BL/6 мышами. Однако введение Декс приводило к пропорциональному увеличению числа тотальных IgM и IgA-продуцентов у мышей обеих групп. По таким данным отсутствие в организме  $\gamma\delta$ Т-клеток не влияло на количество и соотношение IgM- и IgA-ИГОК в ответ Декс [6].

В настоящей работе была проведена оценка влияния  $\gamma\delta$ Т-клеток на образование IgM и IgA В1-лимфоцитами перитонеальной полости мышей СВА в присутствии ТН2-АГ Декс. Для этого была отработана система *in vitro*, где В1-клетки культивировали вместе с  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами с добавлением антигена Декс.

Увеличение числа IgM-АОК (АТ к Декс) при добавление антигена к В1-лимфоцитам в 1,5-2 раза на 4-е сутки согласуется с полученными в предыдущих работах данными [1]. Пик продукции и экспрессии IgM приходился на 4-е сутки, что подтверждалось использованными методами. Продукция и экспрессия IgA количественно уступала IgM, несмотря на резкий, но кратковременный пик усиления экспрессии мРНК тяжелой цепи IgA. Это может означать, что экспрессия в данном случае не приводила к трансляции тяжелых цепей IgA. Интересно также отметить, что «всплеск» экспрессии мРНК тяжелой цепи IgA выявился только в группах, где отсутствует ТН2-антиген.

Сравнение данных по числу IgM-ИГОК показывает, что ярко выраженного увеличения числа IgM-ИГОК под действием Декс не происходит, что коррелирует с данными литературы, согласно которым ТН2-антигены являются низкоиммуногенными [21].

Результаты исследования образования IgM и IgA-продуцентов показывают, что  $\gamma\delta$ Т-лимфоциты, вероятно, оказывают супрессирующее действие на специфический IgM-ответ В1-клеток на ТН2-антиген Декс на ранних сроках *in vitro*. При этом само присутствие  $\gamma\delta$ Т-клеток в культуре без антигена не снижает образование естественных IgM-продуцентов в В1-лимфоцитах *in vitro*.

Тем не менее на 7-е сутки в культуре клеток выявляется ответ на Декс в культуре В1- и  $\gamma\delta$ Т-клеток. Вероятно, происходит снижение влияния  $\gamma\delta$ Т-клеток на ответ В1 клеток на ТН2-антиген Декс в использованных нами экспериментальных условиях. Также можно предположить, что сразу после выделения из кишечника  $\gamma\delta$ Т-лимфоциты проявляют регуляторные свойства и способны угнетать иммунный ответ *in vitro*, однако после длительной инкубации в отсутствие специфических факторов микроокружения они теряют эту способность. Обратимое изменение свойств клеток в результате инкубации *in vitro* было ранее продемонстрировано нами на примере В-клеток перитонеальной полости [3, 4].

Результаты исследования экспрессии мРНК IgM и IgA под действием  $\gamma\delta$ Т и сопоставление этих данных с результатами образования Ig-продуцентов предполагают супрессирующее воздействие  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов в ответ на добавление ТН2-АГ Декс. По-видимому,  $\gamma\delta$ Т-клетки способны подавлять индукцию В1-клеток ТН2-антигеном. Известно, что  $\gamma\delta$ Т-клетки могут обладать как эффекторными, так и регуляторными свойствами. Они способны продуцировать противовоспалительный цитокин IL-10, который, наряду с IL-4, важен для переключения изотипов иммуноглобулинов [24, 31].

Данные по экспрессии мРНК на 4-е сутки не противоречат данным по числу IgM-продуцентов, полученные методом ELISPOT, где при добавлении Декс достоверно возрастает продукция IgM В1-клетками, но при добавлении Декс к смеси В1 и  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов такого увеличения не происходит. И в этом случае  $\gamma\delta$ Т-клетки, вероятно, оказывали супрессирующее действие на функциональную активность В1-клеток при ответе на Декс.

Следует отметить, что при совместной инкубации В1- и  $\gamma\delta$ Т-клеток без антигена абсолютные значения экспрессии мРНК тяжелой цепи IgM в этой группе были самыми низкими, что также может указывать на супрессирующее действие  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов на функциональную активность В1-клеток.

По результатам настоящей работы можно заключить, что  $\gamma\delta$ Т-клетки слизистой оболочки тонкого кишечника мыши способны супрессировать выработку IgM и IgA при ответе на ТН2-антиген, а не усиливать, как предполагалось ранее. Такой эффект может быть обусловлен недостатком активирующих провоспалительных сигналов в использованной нами системе *in vitro*.

Роль В1-клеток в хронических воспалительных заболеваниях кишечника в настоящее время активно изучается. Согласно данным литературы В1-клетки играют регуляторную роль при Th2-опосредованных колитах, вероятно, путем

продукции IL-10 и, вероятно, продукцией естественных антител. Способность противостоять образованию колитов коррелировала с продукцией естественного IgM B1-клетками [10, 36]. Встречаются сведения о способности B1a-клеток представлять антиген и способствовать дифференцировке T-лимфоцитов в Th17-клетки. Таким образом, они могут способствовать развитию аутоиммунных процессов при нарушении их IL-10-опосредованных супрессорных функций [33].

$\gamma\delta$ T-клетки могут выступать в роли регуляторных и эффекторных клеток. Одни популяции  $\gamma\delta$ T-клеток кишечника защищают эпителиальные клетки кишечника за счет продукции факторов роста, тогда как другие популяции способны приводить к негативным последствиям [24]. Также у пациентов с язвенным колитом и болезнью Крона было показано значительное увеличение экспрессии хемокинового рецептора CCR9, расположенного на циркулирующих  $\gamma\delta$ T-клетках. Этим можно объяснить рецидивы названных заболеваний [19, 26]. Таким образом, роль  $\gamma\delta$ T-клеток в иммунитете неоднозначна, и дальнейшее исследование этих клеток может быть полезным для понимания механизмов воспалительных заболеваний кишечника.

Немаловажным фактором иммунитета служит IgA. А поскольку B1-лимфоциты вносят большой вклад в синтез IgA, то изучение функциональной активности этих клеток имеет большое значение.

Появляется все больше доказательств, что дефициты IgA связаны с аутоиммунными процессами [37]. А также изменение состава микрофлоры слизистых может вносить свой вклад в патогенез аутоиммунных заболеваний [40]. Изучение механизмов продукции IgA клетками кишечника может быть информативным для изучения иммунопатогенеза воспалительных заболеваний слизистой кишечника, а также для разработки вакцин нового поколения.

Учитывая такие сходства B1- и  $\gamma\delta$ T-лимфоцитов, как раннее появление в онтогенезе, преимущественная локализация в слизистых, участие в первой линии защиты, наличие регуляторных свойств, можно предположить, что  $\gamma\delta$ T-клетки и B1 могут взаимодействовать при реализации своей функциональной активности.

В настоящей работе было впервые продемонстрировано влияние  $\gamma\delta$ T-лимфоцитов на синтез IgM и IgA B1-клетками. Было показано, что продукция IgM B1-лимфоцитами может быть супрессирована  $\gamma\delta$ T-клетками. Это означает, что сделанное раннее предположение о роли  $\gamma\delta$ T-лимфоцитов как T-хелперов для продукции IgA в ответ на TH2-антигены не подтверждается.

Изучение клеточной биологии B1-лимфоцитов, взаимодействие их с клетками микроокружения поможет разработать новые подходы к профилактике инфекционных, аутоиммунных и воспалительных заболеваний.

## Список литературы / References

1. Гаврилова М.В., Снегирева Н.А., Сидорова Е.В. Влияние Breg и IL-10 на гуморальный иммунный ответ // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 4. С. 331-338. [Gavrilova M.V., Snegireva N.A., Sidorova E.V. Influence of Breg and IL-10 upon humoral immune response. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 4, pp. 331-338. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-331-338.
2. Гаврилова М.В., Чернышова И.Н., Хоченков Д.А., Сидорова Е.В. Клеточные взаимодействия при ответе на T-независимые антигены 2-го типа *in vitro* // Медицинская иммунология, 2013. Т. 15, № 4. С. 325-334. [Gavrilova M.V., Chernyshova I.N., Khochenkov D.A., Sidorova E.V. *In vitro* cellular interactions during immune response to t cellindependent type 2 antigens. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2013, Vol. 15, no. 4, pp. 325-334. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2013-4-325-334.
3. Дьяков И.Н., Гаврилова М.В., Чернышова И.Н., Сидорова Е.В. Влияние микроокружения на функциональную активность B-лимфоцитов мыши // Биологические мембраны: журнал мембранной и клеточной биологии, 2008. Т. 25, № 5. С. 360-366. [Dyakov I.N., Gavrilova M.V., Chernyshova I.N., Sidorova E.V. The influence of microenvironment on the functional activity of murine B lymphocytes. *Biologicheskie membrany: Zhurnal membrannoy i kletchnoy biologii = Biochemistry (Moscow) Supplement. Series A: Membrane And Cell Biology*, 2008, Vol. 25, no. 5, pp. 360-366. (In Russ.)]
4. Дьяков И.Н., Григорьев И.В., Сидорова Е.В., Чернышова И.Н. Функциональная активность в-клеток мыши. Роль микроокружения // Медицинская иммунология, 2008. Т. 10, № 1. С. 51-58. [Dyakov I.N., Grigoriev I.V., Sidorova E.V., Chernyshova I.N. Functional activity of murine b cell: a role of microenvironment. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2008, Vol. 10, no. 1, pp. 51-58. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2008-1-51-58.
5. Каркищенко Н.Н. Альтернативы биомедицины. Том 2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии. М.: ВПК, 2007. 448 с. [Karkischenko N.N. Biomedicine alternatives. Part 2. Classical and Alternative Pharmacotoxicology]. Moscow: VPK, 2007. 448 p.
6. Молекулярные и клеточные основы иммунорегуляции, иммунодиагностики и иммунокоррекции (экспериментальные модели) // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 3s. С. 9-56. [Molecular and cellular basis of immune regulation, immune and immunodiagnosics (experimental models). *Meditsinskaya*

*immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 3s, pp. 9-56. (In Russ.)] doi.:10.15789/1563-0625-2015-3s-9-56.

7. Нижегородова Д.Б., Зафранская М.М.  $\gamma\delta$ T-лимфоциты: общая характеристика, субпопуляционный состав, биологическая роль и функциональные особенности // Медицинская иммунология, 2009. Т. 11, № 2-3. С. 115-130. [Nizhegorodova D.B., Zafranskaya M.M.  $\gamma\delta$ T-lymphocytes: general characteristics, subpopulation profile, biological role, and functional features. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2009, Vol. 11, no. 2-3, pp. 115-130. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2009-2-3-115-130.

8. Чернышова И.Н., Гаврилова М.В., Сидорова Е.В. Модельная система для изучения клеточных взаимодействий и механизмов иммунного ответа на T-независимые антигены 2-го типа *in vitro* // Биологические мембраны: журнал мембранной и клеточной биологии, 2010. Т. 27, № 5. С. 1-7. [Chernyshova I.N., Gavrilova M.V., Sidorova E.V. Model system to study cell interactions and mechanisms of immune response to T-independent type 2 antigens *in vitro*. *Biologicheskie membrany: zhurnal membrannoy i kletchnoy biologii = Biochemistry (Moscow) Supplement. Series A: Membrane and Cell Biology*, 2010, Vol. 27, no. 5, pp. 1-7. (In Russ.)]

9. Allaire J.M., Crowley S.M., Law H.T., Chang S.Y., Ko H.J., Vallance B.A. The intestinal epithelium: central coordinator of mucosal immunity. *Trends Immunol.*, 2018, Vol. 39, no. 9, pp. 677-696.

10. Aziz M., Holodick N.E., Rothstein T.L., Wang P. The role of B-1 cells in inflammation. *Immunol. Res.*, 2015, Vol. 63, no. 1-3, pp. 153-166.

11. Baumgarth N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 1, pp. 34-46.

12. Born W.K., Huang Y., Reinhardt R.L., Huang H., Sun D., O'Brien R.L.  $\gamma\delta$  T Cells and B Cells. *Adv. Immunol.*, 2017, Vol. 134, pp. 1-45.

13. Born W., Cady C., Jones-Carson J., Mukasa A., Lahn M., O'Brien R. Immunoregulatory functions of gammadelta T cells. *Adv. Immunol.*, 1999, Vol. 71, pp. 77-144.

14. Chien Y.H., Meyer C., Bonneville M.  $\gamma\delta$  T cells: first line of defense and beyond. *Annu. Rev. Immunol.*, 2014, Vol. 32, pp. 121-155.

15. Fagarasan S., Honjo T. Regulation of IgA synthesis at mucosal surfaces. *Curr. Opin. Immunol.*, 2004, Vol. 16, no. 3, pp. 277-283.

16. Fagarasan S., Honjo T. T-Independent immune response: new aspects of B cell biology. *Science*, 2000, Vol. 290, no. 5489, pp. 89-92.

17. Fagarasan S., Kawamoto S., Kanagawa O., Suzuki K. Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. *Annu. Rev. Immunol.*, 2010, Vol. 28, pp. 243-273.

18. Fagarasan S., Kinoshita K., Muramatsu M., Ikuta K., Honjo T. *In situ* class switching and differentiation to IgA-producing cells in the gut lamina propria. *Nature*, 2001, Vol. 413, no. 6856, pp. 639-643.

19. Fay N.S., Larson E.C., Jameson J.M. Chronic inflammation and  $\gamma\delta$  T Cells. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, 210. doi: 10.3389/fimmu.2016.00210.

20. Fujihashi K., McGhee J.R., Kweon M.N., Cooper M.D., Tonegawa S., Takahashi I., Hiroi T., Mestecky J., Kiyono H. gamma/delta T cell-deficient mice have impaired mucosal immunoglobulin A responses. *J. Exp. Med.*, 1996, Vol. 183, no. 4, pp. 1929-1935.

21. Gärdby E., Wrammert J., Schön K., Ekman L., Leanderson T., Lycke N. Strong differential regulation of serum and mucosal IgA responses as revealed in CD28-deficient mice using cholera toxin adjuvant. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 170, no. 1, pp. 55-63.

22. Genestier L., Taillardet M., Mondiere P., Gheit H., Bella C., Defrance T. TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 12, pp. 7779-7786.

23. Huang, Y., Getahun, A., Heiser, R.A., Detanico, T., Aviszus, K., Kirchenbaum, G. et al. Gammadelta T cells shape preimmune peripheral B cell populations. *J. Immunol.*, 2016, Vol. 196, pp. 217-231.

24. Kober O.I., Ahl D., Pin C., Holm L., Carding S.R., Juge N.  $\gamma\delta$  T-cell-deficient mice show alterations in mucin expression, glycosylation, and goblet cells but maintain an intact mucus layer. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2014, Vol. 306, no. 7, pp. G582-G593.

25. Macpherson A.J., Gatto D., Sainsbury E., Harriman G.R., Hengartner H., Zinkernagel R.M. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science*, 2000, Vol. 288, no. 5474, pp. 2222-2226.

26. Mann E.R., McCarthy N.E., Peake S.T., Milestone A.N., Al-Hassi H.O., Bernardo D., Tee C.T., Landy J., Pitcher M.C., Cochrane S.A., Hart A.L., Stagg A.J., Knight S.C. Skin- and gut-homing molecules on human circulating  $\gamma\delta$  T cells and their dysregulation in inflammatory bowel disease. *Clin. Exp. Immunol.*, 2012, Vol. 170, no. 2, pp. 122-130.

27. Meyer-Bahlburg A. B-1 cells as a source of IgA. *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*, 2015, Vol. 1362, pp. 122-131.

28. Mond J.J., Vos Q., Lees A., Snapper C.M. T cell independent antigens. *Curr. Opin. Immunol.*, 1995, Vol. 7, no. 3, pp. 349-354.

29. Nielsen M.M., Witherden D.A., Havran W.L.  $\gamma\delta$  T cells in homeostasis and host defence of epithelial barrier tissues. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 12, pp. 733-745.

30. Pabst O. New concepts in the generation and functions of IgA. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, no. 12, pp. 821-832.

31. Paul S., Lal G. Regulatory and effector functions of gamma-delta ( $\gamma\delta$ ) T cells and their therapeutic potential in adoptive cellular therapy for cancer. *Int. J. Cancer*, 2016, Vol. 139, no. 5, pp. 976-985.
32. Rezende R.M., Lanser A.J., Rubino S., Kuhn C., Skillin N., Moreira T.G., Liu S., Gabriely G., David B.A., Menezes G.B., Weiner H.L.  $\gamma\delta$  T cells control humoral immune response by inducing T follicular helper cell differentiation. *Nat. Commun.*, 2018, Vol. 9, no. 1, 3151. doi: 10.1038/s41467-018-05487-9.
33. Rothstein T.L., Griffin D.O., Holodick N.E., Quach T.D., Kaku H. Human B-1 cells take the stage. *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*, 2013, Vol. 1285, pp. 97-114.
34. Roy B., Agarwal S., Brennecke A., Krey M., Pabst O., Düber S., Weiss S. B-1-cell subpopulations contribute differently to gut immunity. *Eur. J. Immunol.*, 2013, Vol. 43, pp. 2023-2032.
35. Shao W., Zhang C., Liu E., Zhang L., Ma J., Zhu Z., Gong X., Qin Z., Qiu X. Identification of liver epithelial cell-derived Ig expression in  $\mu$  chain-deficient mice. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, 23669. Available at: <https://www.nature.com/articles/srep23669>.
36. Shimomura Y., Mizoguchi E., Sugimoto K., Kibe R., Benno Y., Mizoguchi A., Bhan A.K. Regulatory role of B-1 B cells in chronic colitis. *Int. Immunol.*, 2008, Vol. 20, no. 6, pp. 729-737.
37. Singh K., Chang C., Gershwin M.E. IgA deficiency and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.*, 2014, Vol. 13, pp. 163-177.
38. Snegireva N., Gavrilova M., Sidorova E. Isolation of  $\gamma\delta$ T cells from mouse small intestine. *Open J. Immunol.*, 2013, Vol. 3, No.4, 221-223.
39. Tougaard P., Skov S., Pedersen A.E., Krych L., Nielsen D.S., Bahl M.I., Christensen E.G., Licht T.R., Poulsen S.S., Metzdorff S.B., Hansen A.K., Hansen C.H. TL1A regulates TCR $\gamma\delta$ + intraepithelial lymphocytes and gut microbial composition. *Eur. J. Immunol.*, 2015, Vol. 45, no. 3, pp. 865-875.
40. van Praet J.T., Donovan E., Vanassche I., Drennan M.B., Windels F., Dendooven A., Allais L., Cuvelier C.A., van de Loo F., Norris P.S., Kruglov A.A., Nedospasov S.A., Rabot S., Tito R., Raes J., Gaboriau-Routhiau V., Cerf-Bensussan N., van de Wiele T., Eberl G., Ware C.F., Elewaut D. Commensal microbiota influence systemic autoimmune responses. *EMBO J.*, 2015, Vol. 34, no. 4, pp. 466-474.
41. Watanabe N., Ikuta K., Fagarasan S., Yazumi S., Chiba T., Honjo T. Migration and differentiation of autoreactive B-1 cells induced by activated gamma/delta T cells in antierythrocyte immunoglobulin transgenic mice. *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 192, no. 11, pp. 1577-1586.

**Авторы:**

**Снегирева Н.А.** – научный сотрудник лаборатории биосинтеза иммуноглобулинов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Сидорова Е.В.** – д.б.н., профессор, заведующая лабораторией биосинтеза иммуноглобулинов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Дьяков И.И.** – к.б.н., заведующий лабораторией биосинтеза иммуноглобулинов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Гаврилова М.В.** – к.б.н., научный сотрудник лаборатории биосинтеза иммуноглобулинов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Чернышова И.Н.** – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории биосинтеза иммуноглобулинов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Пашков Е.П.** – д.м.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Свитич О.А.** – д.м.н., член-корр. РАН, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Authors:**

**Snegireva N.A.**, Research Associate, Immunoglobulin Biosynthesis Laboratory, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

**Sidorova E.V.**, PhD, MD (Biology), Professor, Head, Immunoglobulin Biosynthesis Laboratory, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

**Dyakov I.N.**, PhD (Biology), Head, Immunoglobulin Biosynthesis Laboratory, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

**Gavrilova M.V.**, PhD (Biology), Research Associate, Immunoglobulin Biosynthesis Laboratory, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

**Chernishova I.N.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Immunoglobulin Biosynthesis Laboratory, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

**Pashkov E.P.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

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

Поступила 20.10.2020  
Принята к печати 10.01.2021

Received 20.10.2020  
Accepted 10.01.2021

## ВЛИЯНИЕ GcMAF-RF НА EX VIVO ПОЛЯРИЗАЦИЮ МАКРОФАГОВ, АКТИВАЦИЮ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК И ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Кирикович С.С.<sup>1</sup>, Левитес Е.В.<sup>1</sup>, Долгова Е.В.<sup>1</sup>, Проскурина А.С.<sup>1</sup>,  
Риттер Г.С.<sup>1</sup>, Рузанова В.С.<sup>1,2</sup>, Леплина О.Ю.<sup>3</sup>, Шевела Е.Я.<sup>3</sup>,  
Останин А.А.<sup>3</sup>, Рябичева Т.Г.<sup>4</sup>, Рыжикова С.Л.<sup>4</sup>, Дружинина Ю.Г.<sup>4</sup>,  
Вараксин Н.А.<sup>4</sup>, Черных Е.Р.<sup>3</sup>, Богачев С.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики” Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

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

<sup>3</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

<sup>4</sup> АО «Вектор-Бест», р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

**Резюме.** Данная статья представляет собой второе сообщение из серии статей, посвященных получению отечественного препарата макрофаг-активирующего фактора (GcMAF-RF) и оценке его биологических свойств. Целью данной работы являлось изучение воздействия препарата GcMAF-RF на M0 → M1 поляризацию макрофагов (Мф) и активацию профессиональных свойств антиген-презентирующих дендритных клеток (ДК), генерированных *ex vivo*, а также на *ex vivo* продукцию провоспалительных (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN $\gamma$ , IL-17, IL-18) и противовоспалительных (TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10) цитокинов, факторов роста (IL-2, GM-CSF, G-CSF, VEGF) и хемокинов (MCP, IL-8) клетками цельной крови здоровых доноров. Мф и ДК генерировали из моноцитов (3-5 × 10<sup>6</sup>/мл) прилипающей фракции мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови здоровых доноров; при этом для получения Мф использовали гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (rhGM-CSF), а при получении ДК – GM-CSF и интерферон- $\alpha$ . В качестве M1-поляризующих сигналов использовали липополисахарид (LPS *E. coli* 0114:B4) (контроль) либо препарат GcMAF-RF

### Адрес для переписки:

Богачев Сергей Станиславович  
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр  
“Институт цитологии и генетики” Сибирского  
отделения Российской академии наук»  
630090, Россия, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, 10.  
Тел.: 8 (383) 363-49-63 (доб. 3411).  
Факс: 8 (383) 333-12-78.  
E-mail: labmolbiol@mail.ru

### Address for correspondence:

Bogachev Sergey S.  
Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian  
Academy of Sciences  
630090, Russian Federation, Novosibirsk, Lavrentiev ave, 10.  
Phone: 7 (383) 363-49-63 (add. 3411).  
Fax: 7 (383) 333-12-78.  
E-mail: labmolbiol@mail.ru

### Образец цитирования:

С.С. Кирикович, Е.В. Левитес, Е.В. Долгова,  
А.С. Проскурина, Г.С. Риттер, В.С. Рузанова,  
О.Ю. Леплина, Е.Я. Шевела, А.А. Останин,  
Т.Г. Рябичева, С.Л. Рыжикова, Ю.Г. Дружинина,  
Н.А. Вараксин, Е.Р. Черных, С.С. Богачев «Влияние  
GcMAF-RF на *ex vivo* поляризацию макрофагов,  
активацию дендритных клеток и продукцию  
цитокинов клетками цельной крови человека» //  
Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 2. С. 257-274.  
doi: 10.15789/1563-0625-EOM-2132

© Кирикович С.С. и соавт., 2021

### For citation:

S.S. Kirikovich, E.V. Levites, E.V. Dolgova, A.S. Proskurina,  
G.S. Ritter, V.S. Ruzanova, O. Yu. Leplina, E. Ya. Shevela,  
A.A. Ostanin, T.G. Ryabicheva, S.L. Ryzhikova,  
Yu.G. Druzhinina, N.A. Varaksin, E.R. Chernykh,  
S.S. Bogachev “Effect of macrophage-activating factor  
(GcMAF-RF) upon *ex vivo* polarization of macrophages,  
activation of dendritic cells and production of cytokines by  
human whole blood cells”, *Medical Immunology (Russia)/  
Meditsinskaya Immunologiya*, 2021, Vol. 23, no. 2,  
pp. 257-274. doi: 10.15789/1563-0625-EOM-2132

DOI: 10.15789/1563-0625-EOM-2132

(опыт), которые добавляли за 48 ч до окончания культивирования. Стимулирующее влияние полученных Мф и ДК на пролиферацию клеток оценивали в аллогенной смешанной культуре лейкоцитов (алло-СКЛ) радиометрически по включению 3H-тимидина. Индекс влияния (ИВ) Мф или ДК на алло-СКЛ рассчитывали как отношение пролиферативного ответа МНК в присутствии Мф или ДК к уровню спонтанной пролиферации МНК. Для определения продукции цитокинов клетками цельной крови человека *ex vivo* использовали образцы периферической крови 3 доноров с двумя повторностями препарата GcMAF-RF, итого 6 вариантов. Все варианты исследования проведены на активированных митогеном и неактивированных клетках крови. Содержание цитокинов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа. Для количественной оценки воздействия GcMAF-RF использован индекс влияния (ИВ) как отношение продукции цитокина в присутствии GcMAF-RF к уровню спонтанной продукции. Показано, что препарат GcMAF-RF эффективно, как и «стандартный» активатор Мф и ДК липополисахарид (LPS), индуцирует поляризацию дифференцированных M0-макрофагов в M1-клетки и конечное созревание ДК, что проявляется значимым усилением их аллостимуляторной активности в смешанной культуре лейкоцитов (алло-СКЛ). Кроме того, препарат GcMAF-RF стимулирует продукцию клетками крови (гранулоцитами, лимфоцитами, моноцитами) широкий спектр цитокинов и хемокинов (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, IL-4, IL-10, GM-CSF, G-CSF, VEGF, IL-8), что свидетельствует о прямом участии активатора макрофагов GcMAF-RF в различных иммунных процессах. Таким образом, отечественный препарат GcMAF-RF индуцирует поляризацию макрофагов M0  $\rightarrow$  M1, конечное созревание ДК и аллостимулирующую активность Мф и ДК, а также способен эффективно стимулировать циркулирующие клетки крови к синтезу цитокинов/хемокинов с провоспалительной и иммунорегуляторной активностью.

*Ключевые слова:* макрофаг-активирующий фактор (GcMAF-RF), макрофаги, дендритные клетки, цитокины

## **EFFECT OF MACROPHAGE-ACTIVATING FACTOR (GcMAF-RF) UPON EX VIVO POLARIZATION OF MACROPHAGES, ACTIVATION OF DENDRITIC CELLS AND PRODUCTION OF CYTOKINES BY HUMAN WHOLE BLOOD CELLS**

**Kirikovich S.S.<sup>a</sup>, Levites E.V.<sup>a</sup>, Dolgova E.V.<sup>a</sup>, Proskurina A.S.<sup>a</sup>, Ritter G.S.<sup>a</sup>, Ruzanova V.S.<sup>a, b</sup>, Leplina O.Yu.<sup>c</sup>, Shevela E.Ya.<sup>c</sup>, Ostanin A.A.<sup>c</sup>, Ryabicheva T.G.<sup>d</sup>, Ryzhikova S.L.<sup>d</sup>, Druzhinina Yu.G.<sup>d</sup>, Varaksin N.A.<sup>d</sup>, Chernykh E.R.<sup>c</sup>, Bogachev S.S.<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russian Federation

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

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

**Abstract.** This article is the second communication in a series of articles devoted to the effects of a domestic preparation of macrophage-activating factor (GcMAF-RF) and assessment of its biological properties. The aim of this work was to study the effect of the GcMAF-RF upon M0  $\rightarrow$  M1 polarization of macrophages (Mph), and activation of the professional properties of *ex vivo* generated antigen-presenting dendritic cells (DC), as well as on *ex vivo* production of pro-inflammatory (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN $\gamma$ , IL-17, IL-18) and anti-inflammatory (TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10) cytokines, growth factors (IL-2, GM-CSF, G-CSF, VEGF) and chemokines (MCP, IL-8) by the whole blood cells from healthy donors.

Mph and DC were generated from the monocytes (3 to 5  $\times$  10<sup>6</sup>/ml) derived from adherent fraction of peripheral blood mononuclear cells (MNC) of healthy donors. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF) was used to obtain Mph, whereas DC production was induced by GM-CSF and interferon- $\alpha$ .

To provide M1 polarizing signals, bacterial lipopolysaccharide (LPS from *E. coli* 0114:B4) was used in controls. In experimental series, GcMAF-RF was added 48 h before the end of culture. The stimulating effect of the obtained Mph and DC upon cell proliferation was assessed in allogeneic mixed culture of leukocytes (allo-MLC) using radiometric technique, by <sup>3</sup>H-thymidine incorporation. The influence index (IR) of Mph or DC upon allo-SCL was calculated as the ratio of the proliferative response of MNCs in the presence of Mph, or DC to the level of spontaneous MNC proliferation. To determine the cytokine production by human whole blood cells *ex vivo*, peripheral blood samples from 3 donors with two replicate GcMAF-RF preparations were used, at a total of 6 points. All variants of the study were carried out with mitogen-activated and non-activated blood cells. The cytokine content was determined by the ELISA assays. The effects of GcMAF-RF were quantified as a fold increase (FI), i.e., the ratio of cytokine production in the presence of GcMAF-RF to the level of their spontaneous production. It was shown that the GcMAF-RF preparation was as effective, as lipopolysaccharide (LPS), the standard Mph and DC activator which induces polarization of differentiated M0-macrophages into M1 cells and final maturation of DCs, manifesting by a significant increase in their allo-stimulatory activity in a mixed leukocyte culture (allo-MLC). Moreover, GcMAF-RF stimulates production of numerous cytokines and chemokines (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, IL-4, IL-10, GM-CSF, G-CSF, VEGF, IL-8), by blood cells (granulocytes, lymphocytes, monocytes), thus indicating direct participation of the macrophage activator GcMAF-RF in various immune processes. The domestic GcMAF-RF drug induces polarization of macrophages M0  $\rightarrow$  M1, final maturation of DCs and allostimulating activity of Mf and DCs, and is also able to effectively stimulate circulating blood cells to synthesize cytokines/chemokines with pro-inflammatory and immunoregulatory activities.

*Keywords: macrophage-activating factor (GcMAF-RF), macrophages, dendritic cells, cytokines*

Данная работа была выполнена при поддержке бюджетного финансирования по теме государственного задания № 0259-2021-0013.

## Введение

Успехи в иммунологических исследованиях в значительной степени зависят от возможности использования в экспериментальной работе специфических факторов, эффективно влияющих на характер иммунного ответа организма, и которые доступны в необходимых количествах. Одним из таких факторов является белок, активирующий макрофаги, GcMAF (group-specific component protein-derived macrophage activating factor), впервые охарактеризованный в работе японских исследователей [49]. GcMAF получают *in vitro* энзиматическим преобразованием витамин D<sub>3</sub>-связывающего белка плазмы крови (DBP) [3, 35, 39, 43, 49, 50, 52]. Способность GcMAF активировать циторедуцирующие и опсонизирующие функции макрофагов (элиминация микроорганизмов, стареющих, опухолевых и поврежденных клеток) широко используется в экспериментах на животных и в клинических исследованиях [26, 41, 46, 47, 49, 50, 51, 52].

В лаборатории индуцированных клеточных процессов ИЦиГ СО РАН совместно с ООО «АКТИВАТОР МАФ» был разработан оригинальный способ получения DBP и разработана процедура

его конвертации в GcMAF-RF цитоэнзиматическим способом [3]. Полученный полипептид GcMAF-RF по своим молекулярным свойствам соответствует описанному в литературе белку GcMAF, находящемуся на стадии клинических испытаний в США, Британии, Израиле и Японии (Saisei Mirai, Keihan, Reno Integrative Medical Center, Immuno Biotech Ltd, Efranat, Catalytic longevity).

Макрофаги (Мф), относятся к системе клеток врожденного иммунитета. Выделяют два основных фенотипа макрофагов: М1/провоспалительный и М2/противовоспалительный [6, 16, 22]. Макрофаги выполняют в организме множество функций, что обусловлено их функциональной гетерогенностью и высокой пластичностью [23]. Пул резидентных Мф может пополняться за счет дифференцировки циркулирующих моноцитов при их попадании в ткани из кровотока. Макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) являются основными регуляторами дифференцировки моноцитов в макрофаги. При этом M-CSF стимулирует дифференцировку моноцитов в Мф, характеризующиеся М2/противовоспалительным фенотипом (про-М2 клетки), тогда как GM-CSF индуцирует дифференцировку моноцитов в Мф с М1/провоспалительным фенотипом (про-М1 клетки) [19, 28]. Как про-М1, так и

про-M2 клетки могут быть поляризованы в Мф 1-го или 2-го типа под влиянием различных факторов микроокружения (поляризующих стимулов) [42, 45].

Макрофаги являются одной из основных популяций клеток, формирующих опухолевую строму. В опухолевом очаге, в ходе прогрессии опухоли под действием секретируемых опухолью гуморальных факторов и в результате межклеточных контактов, происходит поляризация моноцитарных предшественников в макрофаги М2/противовоспалительного фенотипа. М2-макрофаги совместно с миелоидными супрессорными клетками (MDSC, myeloid-derived suppressor cells) ингибируют противоопухолевую активность эффекторных иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль [33, 36, 44]. Под действием различных стимулов макрофаги способны переходить из М2 фенотипа в М1. Это свойство макрофагов является базовым при активации противоопухолевых свойств опухоль-инфильтрирующих фагоцитов [6]. Несмотря на обилие данных об активирующем влиянии препарата GcMAF на зрелые макрофаги, отсутствуют доказательства его влияния на процесс поляризации М0-макрофагов.

Наряду с макрофагами важным компонентом иммунной системы млекопитающих являются антиген-презентирующие дендритные клетки (ДК), осуществляющие запуск адаптивного иммунного ответа [2, 14, 20, 21, 25, 30, 38]. Известно, что «стандартный» активатор макрофагов, липополисахарид бактериальных стенок (LPS), также является «стандартным» активатором профессиональных свойств ДК [54, 55]. В настоящем исследовании был проведен сравнительный анализ поляризующего действия LPS и GcMAF-RF на сгенерированные *ex vivo* М0-макрофаги, а также проведена оценка активирующего влияния LPS и GcMAF-RF на сгенерированные *ex vivo* ДК человека.

Цитокины представляют собой низкомолекулярные белки, которые продуцируются многими типами клеток и прежде всего клетками иммунной системы. Они обеспечивают межклеточные связи и управляют различными процессами, происходящими в нормальных условиях и при патологических воздействиях. Цитокины обладают плеiotропностью биологического действия. Один и тот же цитокин может действовать на многие типы клеток, вызывая различные эффекты, в зависимости от вида клеток-мишеней. Для цитокинов характерна взаимозаменяемость биологического действия [1, 15, 17, 18, 32, 40,

53]. Выделяют несколько групп цитокинов. Это провоспалительные и противовоспалительные цитокины, факторы роста и хемокины [1, 18]. Цитокины, продуцируемые клетками периферической крови, индуцируют быстрый системный ответ [1, 15, 17, 18, 32, 53]. В этой связи представляется интересным оценить влияние GcMAF-RF на продукцию цитокинов клетками цельной крови. Этот интерес также связан с тем, что предполагается интраперитонеальное введение препарата, и в этой связи необходимо знать возможные клинические последствия такого введения, которые могут быть оценены по способности клеток крови секретировать определенную палитру цитокинов.

**Целью данной работы** является изучение влияния препарата GcMAF-RF на поляризацию макрофагов М0 фенотипа и созревание дендритных клеток, а также на продукцию цитокинов клетками цельной крови человека.

## Материалы и методы

### Получение GcMAF-RF

Витамин D<sub>3</sub>-связывающий белок (DBP) выделяли из человеческой плазмы с помощью актиносефарозной аффинной хроматографии. Полученный полипептид конвертировали в GcMAF-RF цитоэнзиматическим способом, разработанным компанией ООО «АКТИВАТОР МАФ» [3].

### Получение макрофагов

Макрофаги генерировали из моноцитов (3-5 × 10<sup>6</sup>/мл) прилипающей фракции мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови здоровых доноров в 6-луночных планшетах (TPP, Швейцария) в среде RPMI-1640, дополненной 0,05 мМ β-меркаптоэтанолом, 2 мМ пирувата натрия, 0,3 мг/мл L-глутамина, 1% раствором незаменимых аминокислот (все реактивы Sigma-Aldrich), 100 мг/мл гентамицина в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (rhGM-CSF, 50 нг/мл, Sigma-Aldrich) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FCS, «БиолоТ», Санкт-Петербург) в течение 7 суток при 37 °С и 5% CO<sub>2</sub>. В качестве М1-поляризующих сигналов использовали липополисахарид (LPS *E. coli* 0114:B4, Sigma-Aldrich) в дозе 10 мкг/мл, либо препарат GcMAF-RF в дозе 50 или 250 нг/мл, которые добавляли за 48 ч до окончания культивирования. GM-CSF-дифференцированные М0 и поляризованные М1 макрофаги снимали с пластика 0,25% раствором трипсин-версена («БиолоТ», Россия), отмывали, определяли цитоз и жизнеспособность.

### Получение дендритных клеток

Дендритные клетки (ДК) генерировали из моноцитов ( $3-5 \times 10^6$ /мл) прилипающей фракции МНК периферической крови доноров в 6-луночных планшетах (TPP, Швейцария) в среде RPMI-1640, дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5мМ 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 интерферона- $\alpha$  (1000 Ед/мл, Роферон-А, Roche, Швейцария) при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Для индукции конечного созревания ДК на 4-е сутки вносили LPS (*E. coli* 0114:B4, Sigma-Aldrich, 10 мкг/мл) либо препарат GcMAF-RF в дозе 50, 100, 250 и 500 нг/мл и продолжали культивировать в течение 24 ч.

### Оценка аллостимуляторной активности Мф и ДК

Стимуляторную активность Мф и ДК оценивали в аллогенной смешанной культуре лейкоцитов (алло-СКЛ), используя в качестве отвечающих клеток аллогенные МНК доноров ( $0,1 \times 10^6$ /лунку), которые культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах в среде RPMI-1640 в присутствии 10%-ной инактивированной сыворотки крови АВ(IV) группы при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Стимуляторами служили либо Мф, либо ДК в соотношении МНК:Мф/ДК = 10:1. Пролиферативный ответ оценивали на 5 сутки радиометрически по включению 3Н-тимидина (1 мкКю/лунку), вносимого за 18 ч до окончания культивирования. Индекс влияния (ИВ) Мф или ДК в алло-СКЛ рассчитывали, как отношение пролиферативного ответа МНК в присутствии Мф к уровню спонтанной пролиферации МНК.

### Оценка продукции цитокинов клетками цельной крови человека *ex vivo*

Для определения продукции цитокинов клетками цельной крови человека *ex vivo* использовали образцы периферической крови 3 доноров и 2 препарата GcMAF-RF с независимым выделением, итого 6 вариантов. Пробу 2 мл крови в стерильных условиях вносили во флакон, содержащий 8 мл стерильной поддерживающей среды (DMEM), гепарин (2,5 ЕД/мл), гентамицин (100 мкг/мл) и L-глутамин (0,6 мг/мл). Полученную разведенную кровь (к1/5) разделили на порции:

Для определения спонтанной продукции цитокинов использовали пробу:

- 3 мл к1/5;

Для оценки влияния препарата GcMAF-RF использовали пробы:

- 1 мл к1/5 + GcMAF-RF до конечной концентрации 5 мкг/мл;
- 1 мл к1/5 + GcMAF-RF до конечной концентрации 0,5 мкг/мл;
- 1 мл к1/5 + GcMAF-RF до конечной концентрации 0,05 мкг/мл.

Для определения митоген-индуцированной продукции цитокинов использовали пробу:

- 1 мл к1/5 + комплекс митогенов (РНА-М – 4 мкг/мл, РНА-Р – 4 мкг/мл, ConA – 4 мкг/мл и LPS – 2 мкг/мл).

Для оценки влияния препарата GcMAF-RF на митоген-индуцированную продукцию цитокинов использовали следующие пробы:

- 1 мл к1/5 + комплекс митогенов + GcMAF-RF до конечной концентрации 5 мкг/мл;
- 1 мл к1/5 + комплекс митогенов + GcMAF-RF до конечной концентрации 0,5 мкг/мл;
- 1 мл к1/5 + комплекс митогенов + GcMAF-RF до конечной концентрации 0,05 мкг/мл.

Препараты крови с добавленными активаторами инкубировали при 37 °С в течение суток. После окончания инкубации клетки крови осаждали центрифугированием при 10000 G в течение 3 минут на микроцентрифуге. Отобранную надосадочную жидкость аликвотировали, замораживали и хранили при -40 °С до проведения анализа. В полученном супернатанте определяли концентрацию IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , VEGF и MCP-1 методом твердофазного иммуоферментного анализа с использованием наборов реагентов производства АО «Вектор-Бест»; концентрацию G-CSF, GM-CSF, IL-17, TGF- $\beta$  определяли с использованием реактивов фирмы R&D Systems (Великобритания).

Для количественной характеристики влияния активаторов на продукцию цитокинов использовали Индекс влияния (ИВ) и Цитокиновый индекс (ЦИ) (см. приложение 1). Индекс влияния (ИВ) = продукция цитокина во флаконе с разбавленной кровью + препарат/спонтанная продукция этого цитокина (во флаконе с разбавленной кровью без препарата). Цитокиновый индекс (ЦИ) = продукция цитокина во флаконе с разбавленной кровью + препарат + митоген/митогенная продукция этого цитокина (во флаконе с разбавленной кровью без препарата + митоген). ИВ характеризует влияние препарата на неактивированные клетки крови, что имитирует введение препарата GcMAF-RF пациенту. ЦИ характеризует влияние препарата на активиро-

ванные митогеном клетки крови, что имитирует либо синергичное с митогеном усиление препаратом активности клеток, либо ее подавление, возникающее при воздействии препарата в очаге воспаления [8].

#### Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica 10.0. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический W-критерий Вилкоксона (для связанных, парных выборок). Выявленные различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты

### M0 → M1 поляризация макрофагов препаратом GcMAF-RF

В настоящее время отработаны различные протоколы генерации из моноцитов крови макрофагов 1-го и 2-го типа на основе использования соответствующих дифференцировочных факторов (GM-CSF или M-CSF) и/или поляризующих стимулов. В культуре *in vitro* в качестве M1-поляризующих сигналов могут выступать различные инфекционные агенты (например, липополисахарид (LPS) или провоспалительные цитокины (TNF $\alpha$  или IFN $\gamma$ , по отдельности или в комбинации). M1 макрофаги характеризуются *in vitro* фенотипом IL-12<sup>high</sup>IL-23<sup>high</sup>IL-10<sup>low</sup>; они

активно секретируют реактивные метаболиты кислорода и монооксид азота (ROS и NO), а также воспалительные цитокины (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6); участвуют в развитии Th1-опосредованных иммунных реакций, обеспечивающих устойчивость к внутриклеточным патогенам и опухолям. Макрофаги M1/провоспалительного фенотипа, которые высоко экспрессируют молекулы, вовлеченные в активацию и ко-стимуляцию T-лимфоцитов (HLA-DR, CD86, CD40), а также активно секретируют иммунорегуляторные (IL-12, IL-23), но не иммуносупрессорные (IL-10, TGF- $\beta$ ) цитокины, способны наиболее эффективно индуцировать пролиферативный ответ T-лимфоцитов на аллоантигены в СКЛ. Поэтому оценка аллостимуляторной активности M $\phi$ , являясь «интегральным» показателем их функционального потенциала, позволяет четко идентифицировать M1 фенотип макрофагов человека, генерированных *ex vivo* из моноцитов крови [13, 34].

В настоящем исследовании была проведена сравнительная оценка влияния LPS и GcMAF-RF на аллостимуляторную активность GM-CSF-дифференцированных (неполяризованных) M0-макрофагов. Как видно из полученных данных, добавление M1-поляризующего стимула LPS к неполяризованным M $\phi$  усиливало их аллостимуляторную активность ( $p < 0,01$ ). GcMAF-RF обладал схожим эффектом, причем в

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ GcMAF-RF НА M0 → M1 ПОЛЯРИЗАЦИЮ

TABLE 1. EFFECT OF GcMAF-RF ON THE M0 → M1 POLARIZATION

Варианты смешанной культуры лейкоцитов (алло-СКЛ) Allo-MLC (variants)	Пролиферативный ответ T-клеток (срп) T cell proliferative response (cpm)	ИБ FI
МНК (Мононуклеарные клетки) MNC (Mononuclear cells) alone	220 (190-310)	
МНК + M $\phi$ 0 MNC + M $\phi$ 0	1090 (800-2100)	5,1 (3,6-6,9)
МНК + M $\phi$ LPS MNC + M $\phi$ LPS	3420 (2020-4600)**	13,5 (9,1-17,0)**
МНК + M $\phi$ GcMAF-RF <sub>50</sub> MNC + M $\phi$ GcMAF-RF <sub>50</sub>	3250 (2060-3800)**	11,7 (9,5-12,9)**
МНК + M $\phi$ GcMAF-RF <sub>250</sub> MNC + M $\phi$ GcMAF-RF <sub>250</sub>	1820 (1470-2600)*	8,3 (6,9-9,1)*

Примечание. Данные двух независимых экспериментов (n = 9) представлены в виде медианных значений и интерквартильного диапазона – Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>). срп – импульсы в минуту; ИБ – индекс влияния. МНК + M $\phi$ 0 – отрицательный контроль; МНК + M $\phi$ LPS – положительный контроль. Активаторы: LPS 10 мкг/мл; GcMAF-RF 50 и 250 нг/мл. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 – по сравнению с неполяризованными M $\phi$ 0 (парный тест Вилкоксона).

Note. Data from two independent experiments (n = 9) are presented as median and interquartile range – Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>). cpm, count per minute; FI, fold increase. MNC + M $\phi$ 0, negative control; MNC + M $\phi$ LPS, positive control. Activators: LPS 10  $\mu$ g/ml; GcMAF-RF 50 and 250 ng/ml. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01, vs unpolarized M $\phi$ 0 (Wilcoxon matched pairs test).

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ GcMAF-RF НА СОЗРЕВАНИЕ ДК, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

TABLE 2. EFFECT OF GcMAF-RF ON THE DC MATURATION

Варианты смешанной культуры лейкоцитов (алло-СКЛ) Allo-MLC (variants)	Пролиферативный ответ Т-клеток (срм) T cell proliferative response (cpm)	ИБ FI
МНК + ДК <sub>0</sub> MNC + DC <sub>0</sub>	3980 (2670-5300)	
МНК + ДК <sub>LPS</sub> MNC + DC <sub>LPS</sub>	6480 (6270-6690)*	1,6 (1,3-2,4)
МНК + ДК <sub>GcMAF-RF50</sub> MNC + DC <sub>GcMAF-RF50</sub>	6130 (5490-6760)*	1,5 (1,3-1,5)
МНК + ДК <sub>GcMAF-RF100</sub> MNC + DC <sub>GcMAF-RF100</sub>	6660 (6200-7120)*	1,7 (1,5-2,7)
МНК + ДК <sub>GcMAF-RF250</sub> MNC + DC <sub>GcMAF-RF250</sub>	7430 (7390-7480)*	1,9 (1,4-2,9)
МНК + ДК <sub>GcMAF-RF500</sub> MNC + DC <sub>GcMAF-RF500</sub>	5470 (5450-5490)*	1,4 (1,0-2,3)

Примечание. Данные двух независимых экспериментов (n = 9) представлены в виде медианных значений и интерквартильного диапазона – Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ). срм – импульсы в минуту; ИБ – индекс влияния. МНК + ДК<sub>0</sub> – отрицательный контроль; МНК + ДК<sub>LPS</sub> – положительный контроль. Активаторы: LPS 10 мкг/мл; GcMAF-RF 50, 100, 250 и 500 нг/мл. \* p < 0,05 – по сравнению с незрелыми ДК<sub>0</sub> (парный тест Вилкоксона).

Note. Data from two independent experiments (n = 9) are presented as median and interquartile range – Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ). cpm, count per minute; FI, fold increase. MNC + DC<sub>0</sub>, negative control; MNC + DC<sub>LPS</sub>, positive control. Activators: LPS 10 µg/ml; GcMAF-RF 50, 100, 250 and 500 ng/ml. \* p < 0.05, vs immature DC<sub>0</sub> (Wilcoxon matched pairs test).

дозе 50 нг/мл проявлял более выраженную М1-поляризирующую активность (p < 0,01), чем в дозе 250 нг/мл (p < 0,05) (табл. 1). Полученные данные свидетельствуют, что GcMAF-RF усиливает аллостимуляторную активность макрофагов аналогично LPS, что свидетельствует о его способности индуцировать поляризацию М0-макрофагов в сторону М1-фенотипа.

#### Влияние GcMAF-RF на конечное созревание и аллостимуляторную активность ДК

ДК, являясь «профессиональными» антиген-презентирующими клетками, не только обеспечивают инициацию специфического иммунного ответа, но наряду с этим способны выполнять регуляторные функции, контролируя силу и направленность иммунных реакций. Многочисленные экспериментальные исследования *in vivo* и *in vitro* показали, что ДК, нагруженные опухолевыми антигенами или антигенами инфекционных возбудителей, индуцируют эффективный противоопухолевый и противоинфекционный иммунный ответ.

Одним из интегральных показателей функциональной активности ДК является их способность к стимуляции пролиферативного ответа аллогенных Т-лимфоцитов в СКЛ, поскольку аллостимуляторная активность ДК ассоцииро-

вана со степенью зрелости ДК, а также со спектром и уровнем продуцируемых ими цитокинов. Показано, что ДК, которые генерируются из моноцитов крови в присутствии GM-CSF и интерферона-альфа (IFN-ДК), обладают выраженной аллостимуляторной активностью [5, 10]. Такую способность ДК приобретают в результате конечного созревания под влиянием различных факторов, таких как кондиционная среда моноцитов (monocyte conditionate medium; MCM, 30% v/v), лейкинферон (НПФ «Интекор», Москва), «Полиоксидоний», «Суперлимф», препарат двуцепочечной ДНК человека «Панаген» и др. Тем не менее наиболее часто используемым «классическим» дозревающим стимулом является LPS [4, 11, 12].

В настоящей работе был проведен сравнительный анализ стимулирующего действия LPS и отечественного активатора макрофагов GcMAF-RF [3] на созревание и аллостимуляторную активность (IFN-ДК). Для этого из моноцитов периферической крови генерировали ДК в течение 96 часов, затем культивировали их в течение 24 часов в присутствии либо липополисахарида (LPS), либо GcMAF-RF в различных дозах (50, 100, 250, 500 нг/мл) (по целевому белку) (табл. 2).

ТАБЛИЦА 3. ВЛИЯНИЕ GcMAF-RF НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ  
TABLE 3. EFFECT OF GcMAF-RF ON CYTOKINE PRODUCTION BY WHOLE BLOOD CELLS

Продукция Production	Группы цитокинов Groups of cytokines															
	Провоспалительные Pro-inflammatory						Противовоспалительные Anti-inflammatory				Факторы роста Group factors				Хемокины Chemokines	
	TNF $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6	IFN $\gamma$	IL-17	IL-18	TGF- $\beta$	IL-4	IL-10	IL-2	GM-CSF	G-CSF	VEGF	MCP	IL-8	
Спонтанная, пг/мл Spontaneous, pg/ml	1,0-5,1	1,3-7,2	0,8-30,2	2,0-2,0	1,0-1,0	30,0-38,0	1873-7571	0,4-0,4	1,0-1,5	2,0-2,0	2,0-2,0	2,0-2,0	10,4-77,3	54,9-3715,2	2,0-1061,0	
Митоген-индуцированная, пг/мл Mitogen-induced, pg/ml	1090,6-1940,9	1358,8-3409,4	9405,3-19254,6	1940,1-3963,2	48,9-295,7	37,3-58,7	1192-22377	1,0-4,1	79,7-186,8	45,5-100,4	14,2-137,8	531,8-1070,2	17,5-97,2	2825,1-4144,7	22250,0-38710,5	
GcMAF-RF <sub>0,5</sub> -индуцированная, пг/мл GcMAF-RF <sub>0,5</sub> -induced, pg/ml	13,1 (11,0-16,9)	67,4 (48,1-79,5)	317,77 (174,2-877,0)	2,4 (2,0-2,7)	1,0 (1,0-1,0)	49,5 (47,0-49,5)	6650,8 (4111,3-10667,1)	1,9 (1,9-1,9)	2,3 (1,0-5,2)	2,0 (2,0-5,5)	4,4 (3,3-5,4)	11,5 (2,0-27,8)	44,8 (35,6-52,6)	612,8 (311,0-22131,9)	340,2 (286,1-5234,1)	
ИБ FI	2,6	9,3	10,5	1,2	1,0	1,3	0,9	4,8	1,5	1,0	2,2	5,8	0,6	0,2	0,3	
GcMAF-RF <sub>5,0</sub> -индуцированная, пг/мл GcMAF-RF <sub>5,0</sub> -induced, pg/ml	40,9 (33,3-50,4)	482,7 (330,3-613,2)	2237,2 (806,4-2385,5)	2,0 (2,0-2,3)	1,0 (1,0-1,0)	117,8 (101,7-149,3)	6264 (4882-8935)	1,8 (1,5-1,9)	17,0 (8,3-19,4)	2,0 (2,0-3,2)	19,6 (12,5-27,3)	103,9 (70,6-132,3)	96,0 (85,3-123,7)	3882,6 (3000,0-34770,0)	4059,0 (3878,5-14810,5)	
ИБ FI	8,0	66,7	74,1	1,0	1,0	3,1	0,8	4,4	10,9	1,0	9,8	51,9	1,2	1,1	3,8	

Примечание. Данные по спонтанной и митоген-индуцированной продукции цитокинов (n = 3) представлены в виде минимальных и максимальных значений. Данные двух экспериментов по воздействию GcMAF-RF на продукцию цитокинов клетками цельной крови (n = 6) представлены в виде медианных значений и интерквартильного диапазона – Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>). ИВ – индекс влияния (медиана/максимальное значение спонтанной продукции цитокина). Исползованные концентрации активатора GcMAF-RF 0,5 и 5 мкг/мл.

Note. Data on spontaneous and mitogen-induced cytokine production (n = 3) are presented as minimum and maximum values (pg/ml). Data from two experiments on the effect of GcMAF-RF on cytokine production by whole blood cells (n = 6) are presented as median values and interquartile range – Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>). FI, fold increase (median/maximum value of spontaneous cytokine production). The concentrations of GcMAF-RF used were 0.5 and 5  $\mu$ g/ml.

Из результатов, представленных в таблице 2, видно, что добавление GcMAF-RF в культуру ДК на этапе созревания приводило к усилению аллостимуляторной активности ДК, сопоставимому с влиянием на ДК «стандартного» индуктора созревания, LPS. Максимальный эффект влияния GcMAF-RF отмечался при использовании дозы 250 нг/мл.

#### **Влияние GcMAF-RF на продукцию цитокинов клетками цельной крови**

Для оценки влияния препарата GcMAF-RF на продукцию цитокинов клетками цельной крови человека свежесыворотная кровь здоровых доноров обрабатывалась различными количествами активатора макрофагов GcMAF-RF (5,0 мкг/мл, 0,5 мкг/мл и 0,05 мкг/мл) (приложение 1). Были проанализированы цитокины, относящиеся к группе провоспалительных, противовоспалительных, факторов роста и хемокинов. Сравнивались: спонтанная продукция цитокинов, продукция цитокинов после активации комплексом митогенов (см. раздел материалы и методы) и после активации препаратом GcMAF-RF. Для сравнительного анализа были взяты данные по активации препаратом GcMAF-RF в концентрациях 5 мкг/мл и 0,5 мкг/мл. В случае спонтанной и митоген-индуцированной продукции цитокинов ( $n = 3$ ) приводится диапазон min-max значений показателя (пг/мл). Для GcMAF-RF ( $n = 6$ ) полученные результаты представлены медианами и интерквартильным размахом – Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ), что позволяет оценить, как уровни продукции соответствующих цитокинов в пг/мл, так и индексы влияния (ИВ) комплекса митогенов, и препарата GcMAF-RF (табл. 3, приложение 1).

Показано, что препарат GcMAF-RF оказывает стимулирующее влияние на продукцию клетками цельной крови следующих из проанализированных цитокинов: провоспалительных (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18), противовоспалительных (IL-4 и IL-10), факторов роста (GM-CSF, G-CSF, VEGF) и хемокинов (IL-8). Поскольку спонтанная продукция оценивалась по трем донорам и оценка эффекта выражалась в диапазоне минимальных-максимальных значений, то сравнение медианы индукции GcMAF-RF, показанной для 6 вариантов, проводилось с максимальным значением спонтанной продукции и эффект был выражен в индексе влияния (ИВ).

Из данных таблицы 3 видно, что используемый в исследовании комплекс митогенов (PHA-M, PHA-P, ConA и LPS) индуцировал значительное усиление интенсивности продукции клетками крови практически всех анализируемых цитоки-

нов. В сравнении с митогенами GcMAF-RF также характеризовался значимым, но при этом не таким «тотальным» стимулирующим эффектом. Так, из группы провоспалительных цитокинов GcMAF-RF в дозе 5,0 мкг/мл повышал продукцию TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 и IL-18 в ~ 8, 70, 70 и 3 раза соответственно, при этом наблюдался выраженный дозозависимый эффект. В то же время уровень секреции IFN $\gamma$  и IL-17 в ответ на активацию препаратом GcMAF-RF практически не изменялся.

В группе противовоспалительных цитокинов наиболее сильно отреагировал на воздействие препаратом GcMAF-RF интерлейкин IL-10, и в меньшей степени IL-4 (ИВ GcMAF-RF в дозе 5,0 мкг/мл составляли в среднем 10,9 и 4,4 расч. ед. соответственно).

В ответ на стимуляцию препаратом GcMAF-RF<sub>5,0</sub> усиливается также продукция факторов роста (GM-CSF, G-CSF, VEGF) и хемокина IL-8, что подтверждается значениями соответствующих индексов влияния. Видно, что интенсивность секреции этих цитокинов в примерно 10; 50; 1,2 и 3,8 раза превышает максимальные значения спонтанной продукции и зависит от дозы вносимого GcMAF-RF (табл. 3).

Полученные результаты демонстрируют высокую стимулирующую активность препарата GcMAF-RF на клетки цельной крови человека в условиях *ex vivo*.

## **Обсуждение**

Многочисленные экспериментальные работы, проведенные с использованием различных очищенных препаратов GcMAF и активированной плазмы так называемого GcMAF второго поколения свидетельствуют о разноплановом биологическом действии фактора [37, 43]. Наиболее многочисленные исследования посвящены противораковой активности GcMAF. В различных экспериментах установлено, что противоопухолевая активность GcMAF главным образом опосредована активацией макрофагов [24, 35, 49, 52].

В настоящем исследовании в качестве фактора, активирующего макрофаги, был использован отечественный препарат GcMAF-RF<sup>®</sup>, получаемый из плазмы крови человека с использованием нового регламента, разработанного компанией ООО «АКТИВАТОР МАФ» [3]. Препарат выделяется в биохимических условиях, основанных на использовании лигандов, аффинных к специфическим функциональным доменам витамин D<sub>3</sub>-связывающего белка. Препарат GcMAF-RF индуцирует фагоцитарную активность перитоне-

альных макрофагов мыши и увеличивает продукцию ими монооксида азота, что является важнейшим показателем провоспалительного вектора активации [3, 7].

В настоящем исследовании были охарактеризованы ранее неизвестные свойства активирующего макрофаги препарата GcMAF-RF.

1. Показано, что препарат GcMAF-RF так же эффективно, как и LPS, индуцирует поляризацию GM-CSF-дифференцированных M0-макрофагов в M1-клетки, что проявляется значимым усилением их стимуляторной активности в алло-СКЛ. Максимальный эффект поляризации обнаруживается при концентрации GcMAF-RF 50 нг/мл. Макрофаги M1-фенотипа характеризуются активным фагоцитозом и функционированием киллерных систем [48], где основными цитолитиками выступают свободные радикалы кислорода и монооксид азота (NO), продуцируемые активированными макрофагами. В этой связи можно предположить, что противоопухолевое действие GcMAF, проявляющееся в различных биологических системах [9, 27, 29, 31, 41, 47], связано с перепрограммированием инфильтрирующих опухоль макрофагов с M2- на M1-фенотип. Именно эта активность GcMAF может являться одним из возможных механизмов ослабления опухоль-индуцированной иммуносупрессии и, как следствие, индукции эффективного противоопухолевого иммунного ответа.

2. Показано, что препарат GcMAF-RF индуцирует конечное созревание ДК и усиливает их функциональную активность в алло-СКЛ. Максимальный эффект отмечался при использовании GcMAF-RF в дозе 250 нг/мл и был сопоставим с действием LPS – «стандартного» индуктора созревания ДК. Ранее в литературе были опубликованы сведения о том, что GcMAF не оказывает активирующего влияния на ДК [52]. Полученные нами результаты демонстрируют более высокую биологическую активность отечественного препарата GcMAF-RF, что, вероятно, обусловлено использованием нового технологического регламента его получения.

3. Показано, что препарат GcMAF-RF стимулирует продукцию клетками крови (гранулоцитами, лимфоцитами, моноцитами) широкого спектра цитокинов и хемокинов (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, IL-4, IL-10, GM-CSF, G-CSF, VEGF, IL-8).

В целом полученные данные свидетельствуют о широком диапазоне биологических эффектов отечественного препарата GcMAF-RF, который не только усиливает фагоцитарную активность

Мф и продукцию ими монооксида азота [3], но также индуцирует M0 → M1 поляризацию макрофагов, конечное созревание и аллостимуляторную активность ДК и способен эффективно стимулировать синтез циркулирующими клетками крови цитокинов/хемокинов с провоспалительной и иммунорегуляторной активностью.

Комплексное исследование *ex vivo* влияния препарата GcMAF-RF свидетельствует о его выраженном активирующем векторе воздействия на системы врожденного и адаптивного иммунитета. Тем не менее одновременная стимуляция продукции противовоспалительного цитокина IL-10, показанная для клеток цельной крови здоровых доноров, может свидетельствовать о вариативности эффектов GcMAF-RF на иммунокомпетентные клетки и, как следствие, о более тонкой регуляции иммунных реакций.

Полученные нами данные позволяют рассматривать GcMAF-RF в качестве перспективного препарата, обладающего широким «репертуаром» биологических эффектов, наиболее значимых с точки зрения его потенциального использования для стимуляции противоопухолевого или противоинфекционного иммунитета.

## Заключение

В настоящей работе охарактеризованы ранее неизвестные свойства активирующего макрофаги препарата GcMAF-RF: способность индуцировать поляризацию GM-CSF-дифференцированных M0-макрофагов в M1-клетки, индуцировать конечное созревание ДК и усиливать их функциональную активность в алло-СКЛ. Показано также, что GcMAF-RF способен эффективно стимулировать синтез циркулирующими клетками крови цитокинов/хемокинов с провоспалительной и иммунорегуляторной активностью. Полученные данные позволяют рассматривать GcMAF-RF в качестве перспективного препарата, обладающего широким «репертуаром» биологических эффектов.

## Благодарности

Работа была выполнена при поддержке ООО «АКТИВАТОР МАФ» и ООО «БА-фарма».

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Соавторы статьи А.С. Проскурина и С.С. Богачев являются директорами ООО «АКТИВАТОР МАФ» и ООО «БА-фарма» соответственно.

**ПРИЛОЖЕНИЕ 1. ВЛИЯНИЕ GcMAF-RF НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ МИТОГЕН-ИНДУЦИРОВАННЫМИ И НЕИНДУЦИРОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ**  
APPLICATION 1. EFFECT OF GcMAF-RF ON CYTOKINE PRODUCTION BY MITOGEN-INDUCED AND NON-INDUCED WHOLE BLOOD CELLS

Доноры Donors	Цитокины (пг/мл) Cytokines (pg/ml)														
	TGF-β	GM-CSF	IL-2	VEGF	TNFα	MCP	G-CSF	IL-1β	IFNγ	IL-8	IL-6	IL-17	IL-4	IL-18	IL-10
<b>Комплекс митогенов Mitogen complex</b>															
1	15974,1	93,7	80,3	56,7	1394,7	3379,8	786,6	2355,4	3094,1	28026,3	15307,0	135,1	3,0	46,0	120,9
2	12252,9	107,0	70,8	113,9	500,0	3595,2	605,8	1847,3	782,5	30460,5	5452,0	58,1	2,8	156,3	357,7
3	13064,6	109,5	64,3	110,2	548,6	3308,8	953,6	2426,8	592,3	30657,9	7885,2	51,0	2,9	118,3	417,0
4	19696,7	24,5	41,3	156,8	1006,2	3591,3	1078,6	3860,4	1162,8	46763,2	12893,6	70,0	0,7	176,2	491,2
5	19791,5	38,3	32,7	150,0	1040,0	3479,1	1107,7	4625,5	953,0	43447,4	14271,3	47,9	0,7	141,6	422,0
6	14099,0	159,6	92,6	86,2	718,7	2991,5	1216,0	2583,9	2367,3	39144,7	12219,4	406,2	2,8	153,3	684,4
1	13238,5	158,2	78,5	59,0	701,4	3065,0	1505,5	2910,1	1927,9	37368,4	13978,2	353,1	2,8	120,0	808,9
2	0,8	1,1	0,9	2,0	0,4	1,1	0,8	0,8	0,3	1,1	0,4	0,4	0,9	3,4	3,0
3	0,8	1,2	0,8	1,9	0,4	1,0	1,2	1,0	0,2	1,1	0,5	0,4	1,0	2,6	3,4
4	1,2	0,3	0,5	2,8	0,7	1,1	1,4	1,6	0,4	1,7	0,8	0,5	0,2	3,8	4,1
5	1,2	0,4	0,4	2,6	0,7	1,0	1,4	2,0	0,3	1,6	0,9	0,4	0,2	3,1	3,5
6	0,9	1,7	1,2	1,5	0,5	0,9	1,5	1,1	0,8	1,4	0,8	3,0	0,9	3,3	5,7
1	0,8	1,7	1,0	1,0	0,5	0,9	1,9	1,2	0,6	1,3	0,9	2,6	0,9	2,6	6,7
2	12702,2	131,0	80,2	56,4	868,2	3707,4	582,9	1587,8	1892,9	18386,2	7475,1	55,2	3,1	53,3	293,4
3	13311,0	127,0	77,5	79,4	739,6	3738,4	509,6	1534,4	1506,0	18004,7	7311,1	65,5	3,7	51,7	337,9
4	20787,7	16,4	48,8	130,1	1318,7	4024,8	897,4	3804,0	2611,1	35473,7	14359,2	76,7	1,1	70,2	402,2
5	24677,6	18,5	53,2	120,7	1372,2	4930,3	859,9	3365,1	2487,5	44947,4	15766,3	78,1	1,1	67,6	426,9
6	14692,0	153,9	91,9	31,3	986,5	3010,8	1101,5	1992,4	3638,1	20592,1	14359,2	335,0	3,4	55,5	692,4
1	13956,7	178,7	106,9	34,6	944,3	3037,9	1238,9	2189,3	3683,6	22447,4	13948,9	370,1	4,0	49,8	748,7
2	0,8	1,4	1,0	1,0	0,6	1,1	0,7	0,7	0,6	0,7	0,5	0,4	1,0	1,2	2,4
3	0,8	1,4	1,0	1,4	0,5	1,1	0,6	0,7	0,5	0,6	0,5	0,5	1,2	1,1	2,8
4	1,3	0,2	0,6	2,3	0,9	1,2	1,1	1,6	0,8	1,3	0,9	0,6	0,4	1,5	3,3
5	1,5	0,2	0,7	2,1	1,0	1,5	1,1	1,4	0,8	1,6	1,0	0,6	0,4	1,5	3,5
6	0,9	1,6	1,1	0,6	0,7	0,9	1,4	0,8	1,2	0,7	0,9	2,5	1,1	1,2	5,7
1	0,9	1,9	1,3	0,6	0,7	0,9	1,6	0,9	1,2	0,8	0,9	2,7	1,4	1,1	6,2

Приложение 1 (продолжение)  
Appendix 1 (continued)

Доноры Donors	Цитокины (пг/мл) Cytokines (pg/ml)														
	TGF-β	GM-CSF	IL-2	VEGF	TNFα	MCP	G-CSF	IL-1β	IFNγ	IL-8	IL-6	IL-17	IL-4	IL-18	IL-10
1	14170,2	141,7	93,9	52,2	1090,7	3602,9	374,5	1629,8	2923,1	20552,6	9053,5	67,2	3,6	44,7	244,0
2	12774,7	135,3	84,3	49,3	907,7	3239,2	529,8	1450,4	2211,3	17711,3	8408,6	66,2	3,9	45,0	268,7
3	22732,7	16,7	46,7	71,1	1859,2	4489,2	770,3	2604,0	4216,7	41157,9	18580,4	62,2	1,0	55,5	303,3
4	23871,2	17,1	54,1	74,2	1831,1	4911,0	953,6	2841,6	4210,2	48855,3	19371,8	75,5	1,2	59,0	347,8
5	13340,0	178,3	117,9	15,6	1166,7	3409,4	1114,0	2032,2	4314,2	25447,4	16206,0	355,0	4,2	44,7	708,5
6	15047,8	183,9	119,9	12,8	1189,2	3606,8	978,6	2145,0	4164,7	25881,6	16088,7	336,4	3,6	43,4	676,3
1	0,9	1,5	1,2	0,9	0,8	1,1	0,5	0,7	0,9	0,7	0,6	0,5	1,2	1,0	2,0
2	0,8	1,4	1,1	0,9	0,7	1,0	0,7	0,6	0,7	0,6	0,5	0,5	1,3	1,0	2,2
3	1,4	0,2	0,6	1,3	1,3	1,3	1,0	1,1	1,4	1,5	1,2	0,5	0,3	1,2	2,5
4	1,5	0,2	0,7	1,3	1,3	1,5	1,2	1,2	1,4	1,7	1,3	0,6	0,4	1,3	2,9
5	0,8	1,9	1,5	0,3	0,8	1,0	1,4	0,9	1,4	0,9	1,1	2,6	1,4	1,0	5,9
6	0,9	2,0	1,5	0,2	0,9	1,1	1,2	0,9	1,3	0,9	1,1	2,5	1,2	0,9	5,6
Спонтанная продукция Spontaneous production	4071,2	2,0	2,0	36,7	2,8	1281,1	2,0	3,5	2,0	362,1	12,6	1,0	0,4	33,2	1,2
1	3381,0	15,3	2,0	88,2	33,3	3000,0	70,6	321,1	2,3	4204,2	569,7	1,0	2,1	149,3	6,7
2	5471,7	35,2	2,0	123,7	51,8	4015,2	178,6	670,0	2,0	3456,0	2385,5	1,0	1,5	110,2	19,5
3	12362,0	10,4	2,0	139,4	39,8	34770,5	88,2	382,7	2,0	14810,5	2185,3	1,0	1,5	150,2	15,0
4	8935,3	24,0	3,2	103,8	50,4	40693,7	132,3	613,2	2,0	17507,8	3822,7	1,0	1,6	101,7	27,9
5	4882,2	12,5	14,2	85,3	30,8	1481,7	46,3	330,3	2,0	3913,7	806,4	1,0	1,9	125,4	8,3
6	7056,1	27,3	2,0	69,7	42,1	3750,0	119,6	582,7	3,5	3878,5	2289,0	1,0	1,9	90,8	19,0
1	0,8	7,6	1,0	2,4	11,9	2,3	35,3	91,7	1,2	11,6	45,2	1,0	5,1	4,5	5,7
2	1,3	17,6	1,0	3,4	18,4	3,1	89,3	191,3	1,0	9,5	189,4	1,0	3,8	3,3	16,4
3	3,0	5,2	1,0	3,8	14,2	27,1	44,1	109,3	1,0	40,9	173,6	1,0	3,8	4,5	12,7
4	2,2	12,0	1,6	2,8	18,0	31,8	66,2	175,1	1,0	48,4	303,6	1,0	4,1	3,1	23,5
5	1,2	6,3	7,1	2,3	11,0	1,2	23,1	94,3	1,0	10,8	64,0	1,0	4,8	3,8	7,0
6	1,7	13,6	1,0	1,9	15,0	2,9	59,8	166,3	1,8	10,7	181,8	1,0	4,8	2,7	16,0

Приложение 1 (окончание)  
Application 1 (continued)

Доноры Donors	Цитокины (пг/мл) Cytokines (pg/ml)														
	TGF-β	GM-CSF	IL-2	VEGF	TNFα	MCP	G-CSF	IL-1β	IFNγ	IL-8	IL-6	IL-17	IL-4	IL-18	IL-10
1	2029,8	3,3	2,0	35,6	8,7	182,9	2,0	34,9	2,0	131,4	76,1	1,0	1,9	51,2	1,0
2	5729,6	9,8	2,0	61,2	14,0	567,1	27,8	79,5	2,0	340,2	274,2	1,0	1,9	49,5	3,1
3	11109,2	2,2	2,0	42,7	16,9	23404,9	8,2	58,8	2,0	7065,8	877,0	1,0	1,6	49,5	5,2
4	10667,1	4,4	15,0	52,6	17,9	22131,9	40,6	109,2	2,7	5234,2	1063,9	1,0	1,9	49,5	5,7
5	7572,0	4,4	2,0	46,9	11,0	311,0	2,0	48,1	3,5	340,2	174,2	1,0	1,9	47,0	1,0
6	4111,3	5,5	5,5	0,0	12,3	658,5	14,9	76,0	2,7	286,1	361,3	1,0	2,2	36,9	1,6
1	0,5	1,6	1,0	1,0	3,1	0,1	1,0	10,0	1,0	0,4	6,0	1,0	4,8	1,5	0,8
2	1,4	4,9	1,0	1,7	5,0	0,4	13,9	22,7	1,0	0,9	21,8	1,0	4,8	1,5	2,6
3	2,7	1,1	1,0	1,2	6,0	18,3	4,1	16,8	1,0	19,5	69,6	1,0	4,1	1,5	4,4
4	2,6	2,2	7,5	1,4	6,4	17,3	20,3	31,2	1,4	14,5	84,5	1,0	4,8	1,5	4,8
5	1,9	2,2	1,0	1,3	3,9	0,2	1,0	13,7	1,8	0,9	13,8	1,0	4,8	1,4	0,8
6	1,0	2,7	2,8	0,0	4,4	0,5	7,4	21,7	1,4	0,8	28,7	1,0	5,5	1,1	1,3
1	3381,0	3,3	2,0	42,7	8,2	219,5	2,0	16,5	2,7	108,2	30,6	1,0	2,2	36,9	1,0
2	2687,1	2,0	2,0	25,6	5,6	457,3	2,0	14,5	2,0	85,1	37,7	1,0	2,5	35,8	1,0
3	11698,8	2,7	2,0	59,7	11,6	13815,8	2,0	77,2	2,7	4512,3	147,2	1,0	1,6	42,8	1,0
4	12177,8	4,4	6,3	69,7	28,3	26518,4	52,0	156,5	3,1	13223,7	1522,3	1,0	1,8	44,5	5,7
5	4367,0	2,0	2,0	19,9	5,5	182,9	5,2	8,4	2,7	2,0	20,4	1,0	2,2	32,7	1,0
6	3161,9	3,3	2,0	31,3	7,4	622,0	10,4	15,0	3,1	162,4	47,1	1,0	1,8	36,9	1,0
1	0,8	1,6	1,0	1,2	2,9	0,2	1,0	4,7	1,4	0,3	2,4	1,0	5,5	1,1	0,8
2	0,7	1,0	1,0	0,7	2,0	0,4	1,0	4,1	1,0	0,2	3,0	1,0	6,2	1,1	0,9
3	2,9	1,4	1,0	1,6	4,1	10,8	1,0	22,0	1,4	12,5	11,7	1,0	4,1	1,3	0,8
4	3,0	2,2	3,2	1,9	10,1	20,7	26,0	44,7	1,6	36,5	120,9	1,0	4,4	1,3	4,8
5	1,1	1,0	1,0	0,5	2,0	0,1	2,6	2,4	1,4	0,0	1,6	1,0	5,5	1,0	0,8
6	0,8	1,6	1,0	0,9	2,6	0,5	5,2	4,3	1,6	0,4	3,7	1,0	4,4	1,1	0,8

Примечание. ЦИ = продукция при активаторах митоген + GcMAF-RF/митоген; ИВ = продукция при активаторе GcMAF-RF/спонтанная продукция. Исползованные концентрации активатора GcMAF-RF: 5,0; 0,5 и 0,05 мкг/мл.

Note. CI = production with activators mitogen + GcMAF-RF/mitogen; FI = production with GcMAF-RF activator/spontaneous production. The used concentrations of the activator GcMAF-RF: 5.0, 0.5 and 0.05 µg/ml.

## Список литературы / References

1. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб: Фолиант, 2008. 552 с. [Ketlinsky S.A., Simbirtsev A.S. Cytokines. St. Petersburg: Foliant, 2008. 552 p.]
2. Козлова А.И., Воропаев Е.В., Конопля А.И. Роль дендритных клеток в формировании противоопухолевого иммунитета (обзор литературы) // Проблемы здоровья и экологии, 2015. С. 19-24. [Kozlova A.I., Voropaev E.V., Konoplya A.I. The role of dendritic cells in the formation of antitumor immunity (literature review). *Problemy zdorovya i ekologii = Health and Ecology Problems*, 2015, pp. 19-24. (In Russ.)]
3. Левитес Е.В., Кирикович С.С., Долгова Е.В., Проскурина А.С., Риттер Г.С., Останин А.А., Черных Е.Р., Богачев С.С. Оценка *in vitro* биологической активности отечественного препарата макрофаг-активирующего фактора (GcMAF-RF) // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2020. Т. 24, № 3. С. 284-291. [Levites E.V., Kirikovich S.S., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Ritter G.S., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. *In vitro* assay of biological activity of a national preparation of macrophage activating factor (GcMAF-RF). *Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2020, Vol. 24, no. 3, pp. 284-291. (In Russ.)]
4. Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Козлов Ю.П., Ступак В.В., Никонов С.Д., Останин А.А., Черных Е.Р. Частично зрелые дендритные клетки как потенциальная основа для индукции противоопухолевого ответа у больных злокачественными глиомами // Медицинская иммунология, 2005. Т. 7, № 4. С. 365-374. [Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Kozlov Yu.P., Stupak V.V., Nikonov S.D., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Semi-mature dendritic cells as a potential basis for the induction of anti-tumor response in patients with malignant gliomas. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2005, Vol. 7, no. 4, pp. 365-374. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2005-4-365-374.
5. Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Алямкина Е.А., Богачев С.С., Останин А.А., Черных Е.Р. Функциональная активность IFN $\alpha$ - и IL-4-индуцированных дендритных клеток человека: сравнительное исследование // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 1. С. 43-52. [Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Tyrinova T.V., Alyamkina E.A., Bogachev S.S., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Functional activity of IFN $\alpha$ - and IL-4-induced human dendritic cells: a comparative study. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 1, pp. 43-52. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2014-1-43-52.
6. Монастырская Е.А., Лямина С.В., Малышев И.Ю. M1 и M2 фенотипы активированных макрофагов и их роль в иммунном ответе и патологии // Патогенез, 2008. Т. 6, № 4. С. 31-39. [Monastyrskaya E.A., Lyamina S.V., Malyshev I.Yu. M1 and M2 phenotypes of activated macrophages and their role in the immune response and pathology. *Patogenez = Pathogenesis*, 2008, Vol. 6, no. 4, pp. 31-39. (In Russ.)]
7. Останин А.А., Кирикович С.С., Долгова Е.В., Проскурина А.С., Черных Е.Р., Богачев С.С. Тернистый путь макрофаг-активирующего фактора (GcMAF): от открытия к клинической практике // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2019. Т. 23, № 5. С. 624-631. [Ostanin A.A., Kirikovich S.S., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Chernykh E.R., Bogachev S.S. A thorny pathway of macrophage activating factor (GcMAF): from bench to bedside. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2019, Vol. 23, no. 5, pp. 624-631. (In Russ.)]
8. Рыжикова С.Л., Дружинина Ю.Г., Рябичева Т.Г., Вараксин Н.А. Стандартизация методики определения продукции цитокинов клетками крови *ex vivo* // Клиническая лабораторная диагностика, 2011. Т. 11. С. 49-53. [Ryzhikova S.L., Druzhinina Yu.G., Ryabicheva T.G., Varaksin N.A. Standardization of the method for determining the production of cytokines by blood cells *ex vivo*. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2011, Vol. 11, pp. 49-53. (In Russ.)]
9. Сахно Л.В., Шевела Е.Я., Тихонова М.А., Останин А.А., Черных Е.Р. Молекулярные механизмы иммуносупрессорной активности M2-макрофагов // Иммунология, 2016. Т. 37, № 6. С. 311-315. [Sakhno I.V., Shevela E.Ya., Tikhonova M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Molecular mechanisms of M2 macrophage immunosuppressive activity. *Immunologiya = Immunologiya*, 2016, Vol. 37, no. 6, pp. 311-315. (In Russ.)]
10. Талаев В.Ю., Плеханова М.В., Матвейчев А.В. Экспериментальные модели, пригодные для оценки влияния компонентов новых разрабатываемых вакцин на дифференцировку дендритных клеток // Медиаль, 2014. Т. 2, № 12. С. 135-153. [Talaev V.Yu., Plekhanova M.V., Matveichev A.V. Experimental models suitable for evaluating the effect of components of new vaccines under development on dendritic cell differentiation. *Medial*, 2014, Vol. 2, no. 12, pp. 135-153. (In Russ.)]
11. Черных Е.Р., Леплина О.Ю., Тыринова Т.В., Тихонова М.А., Ступак В.В., Мишинов С.В., Пендюрин И.В., Останин А.А. Противоопухолевая активность дендритных клеток здоровых доноров и больных с опухолями головного мозга // Медицинская иммунология, 2010. Т. 12, № 3. С. 199-206. [Chernykh E.R., Leplina O.Yu., Tyrinova T.V., Tikhonova M.A., Stupak V.V., Mishinov S.V., Pendyurin I.V., Ostanin A.A. Anti-tumor

activity of dendritic cells in healthy donors and patients with brain tumors. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2010, Vol. 12, no. 3, pp. 199-206. (In Russ.)]

12. 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.)]

13. Шевела Е.Я., Янковская А.А., Сахно Л.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Патент. РФ 2717024 Способ идентификации функционального M1 и M2 фенотипа макрофагов человека, генерированных *in vitro* из моноцитов крови / № 2019118746, заявл. 17.06.2019; опубл. 17.03.2020, Бюл. № 8. [Shevela E.Ya., Yankovskaya A.A., Sakhno L.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Pat. RF 2717024 Method for identification of functional M1 and M2 phenotype of human macrophages generated *in vitro* from blood monocytes / No. 2019118746, Appl. 06/17/2019; publ. 03.17.2020, Bul. No. 8.]

14. Banchereau J., Steinman R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998, Vol. 392, no. 6673, pp. 245-252.

15. Blanco P., Palucka A.K., Pascual V., Banchereau J. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2008, Vol. 19, no. 1, pp. 41-52.

16. Cassetta L., Cassol E., Poli G. Macrophage polarization in health and disease. *Sci. World J.*, 2011, Vol. 11, pp. 2391-2402.

17. Cheda A., Nowosielska E.M., Wrembel-Wargocka J., Janiak M.K. Production of cytokines by peritoneal macrophages and splenocytes after exposures of mice to low doses of X-rays. *Radiat. Environ. Biophys.*, 2008, Vol. 47, pp. 275-283.

18. Duque G.A., Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 491. doi: 10.3389/fimmu.2014.00491.

19. Fleetwood A.J., Lawrence T., Hamilton J.A., Cook A.D. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 8, pp. 5245-5252.

20. Fogg D.K., Sibon C., Miled C., Jung S., Aucouturier P., Littman D.R., Cumano A., Geissmann F.A. Clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science*, 2006, Vol. 311, no. 5757, pp. 83-87.

21. Geissmann F., Gordon S., Hume D.A., Mowat A.M., Randolph G.J. Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, Vol. 10, no. 6, pp. 453-460.

22. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.*, 2003, Vol. 3, pp. 23-35.

23. Gordon S., Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005, Vol. 5, no. 12, pp. 953-964.

24. Homma S., Yamamoto M., Yamamoto N. Vitamin D-binding protein (group-specific component) is the sole serum protein required for macrophage activation after treatment of peritoneal cells with lysophosphatidylcholine. *Immunol. Cell Biol.*, 1993, Vol. 71, pp. 249-257.

25. Hume D.A. Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, no. 9, pp. 5829-5835.

26. Inui T., Kuchiike D., Kubo K., Mette M., Uto Y., Hori H., Sakamoto N. Clinical experience of integrative cancer immunotherapy with GcMAF. *Anticancer Res.*, 2013, Vol. 33, no. 7, pp. 2917-2919.

27. Ishikawa M., Inoue T., Inui T., Kuchiike D., Kubo K., Uto Y., Nishikata T. A novel assay system for macrophage-activating factor activity using a human U937 cell line. *Anticancer Res.*, 2014, Vol. 34, no. 8, pp. 4577-4581.

28. Jaguin M., Houllbert N., Fardel O., Lecureur V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell. Immunol.*, 2013, Vol. 281, pp. 51-61.

29. Kisker O., Onizuka S., Becker C.M., Fannon M., Flynn E., d'Amato R., Zetter B., Folkman J., Ray R., Swamy N., Pirie-Shepherd S. Vitamin D binding protein-macrophage activating factor (DBP-maf) inhibits angiogenesis and tumor growth in mice. *Neoplasia*, 2003, Vol. 5, no. 1, pp. 32-40.

30. Kroemer G., Galluzzi L., Kepp O., Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 31, pp. 51-72.

31. Kuchiike D., Uto Y., Mukai H., Ishiyama N., Abe C., Tanaka D., Kawai T., Kubo K., Mette M., Inui T., Endo Y., Hori H. Degalactosylated/desialylated human serum containing GcMAF induces macrophage phagocytic activity and *in vivo* antitumor activity. *Anticancer Res.*, 2013, Vol. 33, no. 7, pp. 2881-2885.
32. Kurosaka K., Takahashi M., Kobayashi Y. Activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 is involved in production of CXC-chemokine by macrophages during phagocytosis of late apoptotic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, Vol. 306, no. 4, pp. 1070-1074.
33. Lamagna C., Aurrand-Lions M., Imhof B.A. Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, Vol. 80, no. 4, pp. 705-713.
34. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.*, 2008, Vol. 1, no. 13, pp. 453-461.
35. Mohamad S.B., Nagasawa H., Uto Y., Hori H. Tumor cell alpha-N-acetylgalactosaminidase activity and its involvement in GcMAF-related macrophage activation. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 2002, Vol. 132, pp. 1-8.
36. Murray P.J., Wynn T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 11, pp. 723-737.
37. Nagasawa H., Uto Y., Sasaki H., Okamura N., Murakami A., Kubo S., Kirk K.L., Hori H. Gc protein (vitamin D-binding protein): Gc genotyping and GcMAF precursor activity. *Anticancer Res.*, 2005, Vol. 25, no. 6, pp. 3689-3696.
38. Nagy L., Szanto A., Szatmari I., Szeles, L. Nuclear hormone receptors enable macrophages and dendritic cells to sense their lipid environment and shape their immune response. *Physiol. Rev.*, 2012, Vol. 92, pp. 739-789.
39. Naraparaju V.R., Yamamoto N. Roles of  $\beta$ -galactosidase of B lymphocytes and sialidase of T lymphocytes in inflammation-primed activation of macrophages. *Immunol. Lett.*, 1994, Vol. 43, no. 3, pp. 143-148.
40. O'Shea J.J., Siegel R.M. Cytokines and cytokine receptors. Clinical immunology. Ed. Rich R.R., Fleisher T.A., Shearer W.T., Schroeder H.W., Frew A.J., Weyand C.M. Elsevier, 2019, pp. 127-155.
41. Rehder D.S., Nelson R.W., Borges C.R. Glycosylation status of vitamin D binding protein in cancer patients. *Protein Sci.*, 2009, Vol. 18, no. 10, pp. 2036-2042.
42. Roszer T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators Inflamm.*, 2015, Vol. 2015, 816460. doi: 10.1155/2015/816460.
43. Saburi E., Saburi A., Ghanei M. Promising role for Gc-MAF in cancer immunotherapy: from bench to bedside. *Casp. J. Intern. Med.*, 2017, Vol. 8, no. 4, pp. 228-238.
44. Sica A., Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J. Clin. Invest.*, 2007, Vol. 117, no. 5, pp. 1155-1166.
45. Tarique A.A., Logan J., Thomas E., Holt P.G., Sly P.D., Fantino E. Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2015, Vol. 53, no. 5, pp. 676-688.
46. Thyer L., Ward E., Smith R., Branca J.J.V., Morucci G., Gulisano M., Noakes D., Eslinger R., Pacini S. GC protein-derived macrophage-activating factor decreases  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase levels in advanced cancer patients. *Oncimmunology*, 2013, Vol. 2, no. 8, pp. 1-7.
47. Thyer L., Ward E., Smith R., Fiore M., Magherini S., Branca J., Morucci G., Gulisano M., Ruggiero M., Pacini S. A novel role for a major component of the vitamin d axis: vitamin d binding protein-derived macrophage activating factor induces human breast cancer cell apoptosis through stimulation of macrophages. *Nutrients*, 2013, Vol. 5, no. 7, pp. 2577-2589.
48. Weagel E., Smith C., Liu P., Robinson R., O'Neill K. Macrophage polarization and its role in cancer. *J. Clin. Cell Immunol.*, 2015, Vol. 6, pp. 4-11.
49. Yamamoto N., Homma S. Vitamin D3 binding protein (group-specific component) is a precursor for the macrophage-activating signal factor from lysophosphatidylcholine-treated lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1991, Vol. 88, no. 19, pp. 8539-8543.
50. Yamamoto N., Kumashiro R. Conversion of vitamin D3 binding protein (group-specific component) to a macrophage activating factor by the stepwise action of beta-galactosidase of B cells and sialidase of T cells. *J. Immunol.*, 1993, Vol. 151, no. 5, pp. 2794-2802.
51. Yamamoto N., Naraparaju V.R., Asbell S.O. Deglycosylation of serum vitamin D3-binding protein leads to immunosuppression in cancer patients. *Cancer Res.*, 1996, Vol. 56, no. 12, pp. 2827-2831.
52. Yamamoto N., Suyama H., Yamamoto N. Immunotherapy for prostate cancer with Gc protein-derived macrophage-activating factor, GcMAF. *Transl. Oncol.*, 2008, Vol. 1, pp. 65-72.

53. Yaraee R., Askari N., Naseri M. The effect of ms14 on production of pro-inflammatory cytokines by macrophages. *Iran. J. Basic Med. Sci.*, 2011. Vol. 14, no. 1, pp. 89-93.

54. Zhang G.-M., Wang X.-H., Sun L.-J. Effect of tacrolimus on maturity and allostimulatory activity of cultured dendritic cells of rats *in vitro*. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2009, Vol. 23, no. 5, pp. 345-350.

55. Zhou F., Zhang G-X., Rostami A. Distinct role of IL-27 in immature and LPS-induced mature dendritic cell-mediated development of CD4<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>3G11<sup>+</sup> regulatory T cell subset. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2562. doi 10.3389/fimmu.2018.02562.

---

**Авторы:**

**Кирикович С.С.** — к.б.н., научный сотрудник лаборатории индуцированных клеточных процессов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики” Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

**Левитес Е.В.** — к.б.н., научный сотрудник лаборатории индуцированных клеточных процессов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики” Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

**Долгова Е.В.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории индуцированных клеточных процессов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики” Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

**Проскурина А.С.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории индуцированных клеточных процессов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики” Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

**Риттер Г.С.** — аспирант, исследователь лаборатории индуцированных клеточных процессов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики” Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

**Рузанова В.С.** — исследователь лаборатории индуцированных клеточных процессов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики” Сибирского отделения Российской академии наук»; магистрант ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

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

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

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

**Authors:**

**Kirikovich S.S.**, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Induced Cell Processes, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

**Levites E.V.**, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Induced Cell Processes, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

**Dolgorova E.V.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Induced Cell Processes, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

**Proskurina A.S.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Induced Cell Processes, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

**Ritter G.S.**, Postgraduate Student, Researcher, Laboratory of Induced Cell Processes, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

**Ruzanova V.S.**, Researcher, Laboratory of Induced Cell Processes, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Master Study, 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

**Shevela E.Ya.**, PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, 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

**Рябичева Т.Г.** — ведущий специалист лаборатории стабилизации АО «Вектор-Бест», р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

**Рыжикова С.Л.** — ведущий биотехнолог лаборатории стабилизации АО «Вектор-Бест», р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

**Дружинина Ю.Г.** — ведущий биотехнолог лаборатории стабилизации АО «Вектор-Бест», р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

**Вараксин Н.А.** — заведующий лабораторией стабилизации АО «Вектор-Бест», р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

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

**Богачев С.С.** — д.б.н., заведующий лабораторией индуцированных клеточных процессов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

**Ryabicheva T.G.**, Leading Specialist, Laboratory of Stabilization, JSC Vector-Best, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

**Ryzhikova S.L.**, Leading Biotechnologist, Laboratory of Stabilization, JSC Vector-Best, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

**Druzhinina Yu.G.**, Leading Biotechnologist, Laboratory of Stabilization, JSC Vector-Best, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

**Varaksin N.A.**, Head, Laboratory of Stabilization, JSC Vector-Best, Koltsovo, Novosibirsk Region, 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

**Bogachev S.S.**, PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Induced Cell Processes, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

---

Поступила 21.09.2020  
Принята к печати 09.01.2021

---

Received 21.09.2020  
Accepted 09.01.2021

## **ПРОТЕОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ МОНОЦИТОПОДОБНЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ ТНР-1 И ПРОДУЦИРУЕМЫХ ИМИ МИКРОВЕЗИКУЛ С ПОМОЩЬЮ MALDI-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

**Корневский А.В.<sup>1</sup>, Милютин Ю.П.<sup>1</sup>, Березкина М.Э.<sup>1</sup>,  
Александрова Е.П.<sup>1</sup>, Балабас О.А.<sup>2</sup>, Маркова К.Л.<sup>1</sup>, Сельков С.А.<sup>1</sup>,  
Соколов Д.И.<sup>1</sup>**

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

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

**Резюме.** Отделяющиеся от плазматической мембраны клетки экстраклеточные везикулы принимают активное участие в межклеточной коммуникации, транспортируя широкий спектр молекул, среди которых важное функциональное значение придается белкам, липидам, нуклеиновым кислотам и сахарам. Одним из важных этапов в понимании дистантной коммуникации клеток и механизмов ее регуляции является изучение протеома различных экстраклеточных везикул, в том числе микровезикул и экзосом. Синтезируемые моноцитами провоспалительные цитокины и отдельные компоненты системы комплемента играют ключевую роль в осуществлении их специфических функций. Целью данного исследования явилось изучение протеомного состава моноцитоподобных клеток линии ТНР-1 и продуцируемых ими микровезикул. В результате MALDI-масс-спектрометрического анализа электрофоретических белковых фракций лизата клеток и микровезикул идентифицировано 107 белков, выполняющих различные функции. Среди 19 функциональных групп наибольшие по численности группы образуют белки-регуляторы транскрипции и белки с неизвестными функциями, домены. Наименьшие по численности функциональные группы представлены белками-регуляторами клеточной дифференцировки и морфогенеза, белками иммунного ответа и воспаления, рецепторами и их регуляторами, транспортными белками и белками-регуляторами транспорта, белками-регуляторами клеточной адгезии и процессинга белков, белками убиквитин-протеасомной системы деградации белков, белками внутриклеточной сигнализации, белками-регуляторами аутофагоцитоза и экзоцитоза, белками структуры хроматина, белками-регуляторами гемостаза, гормонами. Промежуточное

### **Адрес для переписки:**

Корневский Андрей Валентинович  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
акушерства, гинекологии и репродуктологии  
имени Д.О. Отта»  
199034, Россия, Санкт-Петербург,  
Менделеевская линия, 3.  
Тел.: 8 (812) 328-98-91, 323-75-45.  
Факс: 8 (812) 323-75-45.  
E-mail: a.korenevsky@yandex.ru

### **Address for correspondence:**

Korenevsky Andrey V.  
D. Ott Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology  
199034, Russian Federation, St. Petersburg,  
Mendeleevskaya line, 3.  
Phone: 7 (812) 328-98-91, 323-75-45.  
Fax: 7 (812) 323-75-45.  
E-mail: a.korenevsky@yandex.ru

### **Образец цитирования:**

А.В. Корневский, Ю.П. Милютин, М.Э. Березкина,  
Е.П. Александрова, О.А. Балабас, К.Л. Маркова,  
С.А. Сельков, Д.И. Соколов «Протеомное  
профилирование моноцитоподобных клеток линии  
ТНР-1 и продуцируемых ими микровезикул с помощью  
MALDI-масс-спектрометрии» // Медицинская  
иммунология, 2021. Т. 23, № 2. С. 275-292.  
doi: 10.15789/1563-0625-MTM-2141

© Корневский А.В. и соавт., 2021

### **For citation:**

A.V. Korenevsky, Yu.P. Milyutina, M.E. Berezkina,  
E.P. Alexandrova, O.A. Balabas, K.L. Markova, S.A. Selkov,  
D.I. Sokolov "MALDI-TOF mass spectrometric protein  
profiling of THP-1 cells and their microvesicles", *Medical  
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2021,  
Vol. 23, no. 2, pp. 275-292.  
doi: 10.15789/1563-0625-MTM-2141

DOI: 10.15789/1563-0625-MTM-2141

положение занимают цитокины и факторы роста, ферменты, белки цитоскелета, структурные и моторные белки, белки-регуляторы трансляции, транскрипции и процессинга РНК. С помощью последнего кластерного анализа (DAVID Functional Annotation Clustering) идентифицированы наиболее широко представленные группы белков, распределенных по молекулярной функции, биологическому процессу и по положению в клетке. Отдельно в микровезикулах идентифицированы среди прочих белковых молекул белки иммунного ответа и воспаления, цитокины и факторы роста, белки внутриклеточной сигнализации, белки-регуляторы клеточной дифференцировки и морфогенеза, белки-регуляторы клеточной адгезии. Полученные данные о частичном протеоме моноцитоподобных клеток линии ТНР-1 и продуцируемых ими микровезикул расширяют имеющиеся представления о дистантной коммуникации клеток и указывают на новые механизмы взаимодействия моноцитов/макрофагов и их микроокружения.

*Ключевые слова:* иммунный ответ, моноциты, макрофаги, микровезикулы, воспаление, протеомный анализ, MALDI-масс-спектрометрия

## MALDI-TOF MASS SPECTROMETRIC PROTEIN PROFILING OF THP-1 CELLS AND THEIR MICROVESICLES

Korenevsky A.V.<sup>a</sup>, Milyutina Yu.P.<sup>a</sup>, Berezkina M.E.<sup>a</sup>,  
Alexandrova E.P.<sup>a</sup>, Balabas O.A.<sup>b</sup>, Markova K.L.<sup>a</sup>, Selkov S.A.<sup>a</sup>,  
Sokolov D.I.<sup>a</sup>

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

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

**Abstract.** Extracellular vesicles that are shed from the plasma membranes take an active part in intercellular communication, transporting a wide range of molecules, including proteins, lipids, nucleic acids and carbohydrates, being of great functional importance. One of the steps to better understanding of distant communications of cells and their regulatory mechanisms is a proteomic study of various extracellular vesicles, including microvesicles and exosomes. Pro-inflammatory cytokines produced by monocytes and individual complement system components play a key role in their specific functioning. The aim of this work was to study proteomic composition of THP-1 monocyte-like cells and their microvesicles. The MALDI-mass spectrometric analysis of electrophoretic protein fractions of cell lysates and microvesicles allowed for identifying 107 proteins that perform various functions. Among 19 determined functional groups, the largest ones comprise transcription regulators and proteins with unknown functions. The smallest functional groups include regulators of cell differentiation and development, proteins participating in immune response and inflammation, cellular receptors and their regulators, transporter and transport regulatory proteins, as well as cell proteins mediating adhesion and matrix structures, processing regulators, proteins of ubiquitin-proteasome system, intracellular signaling, autophagy and exocytosis regulators, chromatin structural proteins, hemostatic regulators, and peptide hormones. An intermediate position is occupied by cytokines and growth factors, enzymes, cytoskeleton and motor proteins, as well as RNA processing and translation regulators. The subsequent DAVID Functional Annotation Clustering analysis allowed for identifying the most common groups distributed by their molecular function, biological processes, and cellular component. Separately, in the microvesicles derived from THP-1 monocyte-like cells, proteins of the immune response and inflammation, cytokines and growth factors, intracellular signaling proteins, cell differentiation regulators and developmental proteins, as well as cell adhesion and matrix proteins were identified among other protein molecules. The data obtained on the partial proteome of THP-1 monocyte-like cells and their microvesicles extend the existing knowledge on distant communications between the cells and suggest new mechanisms of interaction between monocytes/macrophages and their microenvironment.

*Keywords:* immune response, monocytes, macrophages, microvesicles, inflammation, proteomics, MALDI-TOF mass spectrometry

This work was performed in the Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductology (St. Petersburg, Russia), within the institutional state assignment framework (R&D State Registration No. AAAA-A19-119021290116-1), using the equipment of Chemical Analysis and Materials Research Centre, St. Petersburg State University (St. Petersburg, Russia).

## Introduction

Microvesicles (MVs) are subcellular structures that are shed from the plasma membrane and may participate in intercellular communication. MVs transfer a variety of proteins, nucleic acids, lipids, and sugars from cell to cell [23] and are involved in the regulation of numerous biological processes, including angiogenesis, placentation, regeneration, and malignancy [32].

Of particular interest among various MV sources are monocytes, which are the most active phagocytes of peripheral blood. They carry out antitumor, antiviral, antimicrobial, antifungal and antiparasitic immunity, as well as participate in the specific immune response [27, 35]. There is evidence of the ability of monocytes to produce MVs, since those with the CD14 phenotype (LPS-R) have been found in peripheral blood plasma [34, 37].

The activity of exosomes derived from inactivated and activated THP-1 cells against THP-1 differentiated macrophages and THP-1 undifferentiated monocytes, as well as other types of cells, has been shown in a number of studies devoted to the isolation and description of various types of extracellular MVs produced by the THP-1 monocyte-like cell line. According to the authors, this activity was due to the activation of ERK1/2 and p38 kinases and the increased secretion of proinflammatory cytokines (TNF $\alpha$ , IL-8, IL-12) [10, 33], as well as the presence of such monocyte effector molecules in those exosomes as chitinase-3-like protein 1, acidic mammalian chitinase, C-C motif chemokine 5, interleukin 4-induced 1, vimentin, cell division control protein 42 homolog, RhoC, Rap1-GTP-interacting adaptor molecule, integrin-linked kinase [33], thyroid hormone receptor-associated protein 3, HLA-DRA, deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1, STAT1, STAT2, interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1, ubiquitin-like protein ISG15, interferon induced protein 44 like, and other proteins [40]. Other researchers have shown a similar activity of MVs produced by infected macrophages against intact macrophages *in vitro* and *in vivo* [39], as well as an activity of MVs derived from infected THP-1 monocyte-like cells against intact THP-1 cells [14]. The authors of these studies consider promising the use of proteomic technologies for

elucidating the mechanisms of interaction of immune cells with their microenvironment in response to infection and are considering the possibility of using extracellular MVs as an alternative to existing therapeutic drug delivery systems.

Previously, using various modifications of gel electrophoresis and mass spectrometry, there was shown that the MVs produced by the THP-1 monocyte-like cell line contain cytoskeleton proteins, cell adhesion receptors, signaling molecules, heat shock proteins, protein biosynthesis and energy metabolism enzymes, components of the ubiquitin-proteasome system, nuclear proteins [4], as well as proteins involved in MV formation, vesicular transport, and the immune response [4, 14]. Given the incompleteness of available information on the proteome of the source cells [12, 17, 18] and extracellular MVs produced by them, this study was aimed at expanding the existing knowledge of the proteomic profile of THP-1 cells and their MVs. To undertake this, direct MALDI-TOF mass spectrometry assay was used for identification of tryptic peptides in gel strips obtained after the one-dimensional gel electrophoresis analysis. Data on protein profiling of MVs produced by monocytes/macrophages will allow for assessing previously unknown mechanisms of interaction between these cells and their microenvironment under physiological and inflammatory conditions.

## Materials and methods

### Cells and cell culture

The cells of the THP-1 monocyte-like cell line (American Tissue Culture Collection, USA) obtained from the peripheral blood of a 1-year-old human male with acute monocytic leukemia were cultured in a suspension culture in accordance with the manufacturer's recommendations at a concentration of  $0.7-1.0 \times 10^6$  cells/ml using the complete cell culture medium based on RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA) containing 10% fetal calf serum (Invitrogen, USA). The medium was inactivated at 56 °C for 30 min, depleted of its own MVs using membrane filters with a pore diameter of 0.1  $\mu\text{m}$ , and supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin, and 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA). The cells were cultured using standard cell culture procedures under the damp atmosphere at 37 °C and 5% CO $_2$ . Using the trypan blue solution, the cell vitality was evaluated, which was not less than 96%.

### Isolation of biomaterial

One day before the isolation of MVs in the flasks containing the cell culture, the culture medium was completely replaced with a dilution required to achieve a concentration of  $1.0 \times 10^6$  cells/ml. The next day, the cell vitality was evaluated, after which the culture media from the flasks were centrifuged at 200 g (22 °C, 10 min) to separate the cells.

Because of no single standard protocol available for the isolation and characterization of MVs, a variety of methodological approaches are currently used to obtain MV fractions with a proper degree of purity and enrichment [22]. Therefore, the MVs separated from THP-1 cells were isolated by the modified step-wise centrifugation method in Hanks's solution without  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA), for which the supernatants were sequentially centrifuged at 500 g (4 °C, 10 min) and 9 900 g (4 °C, 10 min). After the second centrifugation, the pellet was washed twice with cold phosphate buffer solution (PBS; Sigma-Aldrich Chem. Co., USA) and was recentrifuged at 19 800 g (4 °C, 20 min). The supernatant was discarded, with the pellet washed several times with cold PBS, each time precipitating the MVs by centrifugation at 19 800 g (4 °C, 20 min). The purified pellet was resuspended in MilliQ deionized water, the protease inhibitor mixture (cOmplete, EDTA-free; Roche Diagnostics GmbH, Germany) being added at the concentration specified by the manufacturer, and was then stored at -80 °C until being analyzed. This protocol allows for isolating MVs with a diameter of 100-200 nm with sufficient purity and minimal loss-

es of the biomaterial, while the MVs are sequentially separated from coarse particles of cellular debris and large apoptotic bodies, as well as from exosomes [21].

#### Laser correlation analysis of microvesicles

The granulometric analysis of the MVs was performed by the dynamic light scattering method described in [20]. The MV diameter was calculated using Zetasizer Software 7.11 (Malvern Instruments, UK). The dimensions of the isolated MVs were shown to lie in the 170-410 nm range, which corresponds to the diameter of ectosomes (100-1000 nm), with the peak size amounting to 195 nm. The granulometric data obtained by us were consistent with the results of other researchers who evaluated the size of MVs produced by a number of cells [38].

#### Biomaterial preparation

The frozen cells and their MVs were thawed and subjected to repeated "freeze-thaw" cycles five times, and were then intensively homogenized in a glass homogenizer for 5 min. The debris was removed by centrifugation at 16 000 g (4 °C, 10 min), with the supernatant collected for further investigation.

#### Spectrophotometric analysis

The analysis of protein content in the cell and MV lysates was performed through the Bradford protein assay using the NanoDrop One spectrophotometer and NanoDrop One Viewer software (Thermo Scientific, USA).

#### One-dimensional gel electrophoresis analysis

Cell and MV proteins (the protein content was 40 µg in the both lysates) were fractionated in the Laemmli SDS electrophoresis system in 10% polyacrylamide gel under denaturing conditions in accordance with the manufacturer's protocol (Bio-Rad Laboratories, USA). Fractionated proteins in the gel were visualized by Coomassie G250 staining, after which 35 stained segments, an equal amount for the cells and their MVs, were excised from the gel (Figure 1).

#### MALDI-TOF mass spectrometric analysis

To remove the dye and SDS, the excised gel strips were crushed and washed three times in 50% acetonitrile (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA) in 30 mM Tris buffer solution (pH 8.2) within 15 min at room temperature. After discarding the solution, the pieces of gel were dehydrated by incubation for 10 min in acetonitrile, and then, after removing the latter, the samples were dried for 40 min at 4 °C.

Thereafter, 10 µl of modified bovine trypsin solution (Promega, USA) in 50 mM ammonium bicarbonate with a concentration of 20 ng/ml were added to the dried samples and incubated for 1 h on ice until the gel was completely rehydrated. After that, the excess trypsin solution was removed, and 50 µl of 30 mM Tris buffer solution (pH 8.2) were added to the samples, and those were incubated for 16-18 h at 37 °C. Mixtures of tryptic peptides were extracted three times

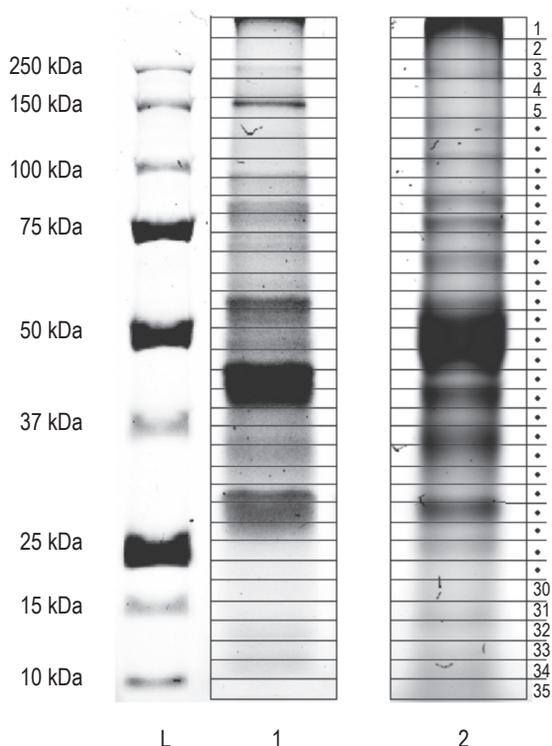


Figure 1. One-dimensional gel electrophoregrams showing 35 excised segments: L. Ladder; 1. Lysate of THP-1 cells; 2. Lysate of microvesicles produced by THP-1 cells (Coomassie G250 staining, 40 µg protein load in the both lysates)

from the gel with 50% acetonitrile solution in 30 mM Tris buffer solution (pH 8.2) containing 0.1% formic acid (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA) in an ultrasonic bath for 20 min. The peptides in the resulting solutions were dried up in the air at 4 °C and frozen at -80 °C until being analyzed.

On the day of the analysis, the dried-up mixtures of tryptic peptides were dissolved in 50 µl of 50% acetonitrile-water solution (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA) containing 0.1% trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA). The contents of the tubes were thoroughly mixed on a Vortex shaker until being completely dissolved. The solutions were then applied to standard steel target plates for MALDI analysis based on the following protocol: 2 × 0.5 µl of the matrix solution and 5 × 0.5 µl of a protein sample solution (in order to concentrate it on the substrate as much as possible). 2,5-dihydroxybenzoic acid at a concentration of 10 mg/ml in 10 mM sodium chloride (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA) was used as the matrix. The mixtures were dried up in the air.

MALDI-TOF mass spectra of tryptic peptides were acquired on an Axima Resonance MALDI mass spectrometer (Shimadzu/Kratos Analytical Ltd., UK) in the range of 200-3000 m/z with mass accuracy of all measurements within 0.01 m/z unit, selecting the laser power which is optimal for achieving good results. The measurements were carried out in the positive ion mode.

Proteins were searched against the UniProt/SwissProt database (<https://www.uniprot.org>) and the NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) with a taxonomic restriction for the species *Homo sapiens* using the Mascot search engine ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) by peptide mass fingerprinting. Parallel search was performed using the database of inverted and random amino acid sequences (decoy). After the peptides were identified, they were checked for their compliance with their actual positions on the gel.

#### Functional analysis

The identified proteins were divided into groups depending on molecular function, cellular component, and biological process. It should be noted that such a division is largely arbitrary, since many of the established proteins show multiple functions in the cell, and in most cases, this division corresponds to the division principle accepted in the SwissProt and NCBI databases. The functions of the proteins and their localizations in the cells were also determined using the GeneGO database with the algorithms of the DAVID Bioinformatics Resources 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov>).

## Results

The total protein content in THP-1 cells and their MVs was found to amount to 82.4±5.86 µg/10<sup>6</sup> cells and 0.15±0.036 µg/10<sup>6</sup> source cells, respectively.

These data subsequently allowed for calculating the protein load of the gel in order to obtain valid results.

The MALDI-TOF mass spectrometric analysis determined a total of 107 proteins that have a variety of functions (Table 1, Table 2).

The subsequent manual functional analysis showed that among 19 determined functional groups, the largest (> 15% of the total) ones comprise transcription regulators (20 entries) and proteins with unknown functions (19 entries). The smallest (< 5% of the total) functional groups include cell differentiation regulators and developmental proteins (5 entries), proteins of the immune response and inflammation (4 entries), receptors and receptor regulators (4 entries), transport proteins and transport regulatory proteins (4 entries), cell adhesion and matrix proteins (3 entries), protein processing regulators (3 entries), ubiquitin-proteasome system proteins (3 entries), intracellular signaling proteins (3 entries), autophagy regulators (2 entries), exocytosis regulators (1 entry), chromatin structural proteins (1 entry), hemostatic regulators (1 entry), and hormones (1 entry). An intermediate position (5-15% of the total) is occupied by cytokines and growth factors (10 entries), enzymes (9 entries), cytoskeleton and motor proteins (8 entries), and RNA processing and translation regulators (6 entries).

The identified entries were also distributed into functional groups by the DAVID GO analysis algorithm, with the proteins showing different functions in the cell appearing simultaneously in several groups. The subsequent cluster analysis (DAVID Functional Annotation Clustering) allowed for combining similar functional groups under one broader concept. Thus, the most common groups were obtained, being distributed by molecular function, biological process, and cellular component (Figure 2).

The analysis of the identified proteins distributed by molecular function showed that the bulk of the clusters is involved in sequence-specific DNA (8.5% of the total) and cytoskeletal protein (7.5% of the total) binding, as well as growth factor activity (4.7% of the total), while the minor components altogether account for only 7.5% of the total number of the identified proteins and include clusters involved in myosin heavy chain binding, transmembrane receptor protein serine/threonine kinase binding, BMP receptor binding, and NADP-retinol dehydrogenase activity (Figure 2A).

The distribution of proteins by biological process showed that the most representative (6.6-8.5% of the total) clusters are involved in positive regulation of transcription and transcription from RNA polymerase II promoter, while clusters involved in positive chemotaxis, adult locomotory behavior, anterior/posterior pattern specification, positive regulation of dopamine secretion, organ induction, and cellular re-

TABLE 1. MALDI-TOF MASS SPECTROMETRIC PROTEOME PROFILING OF THP-1 CELLS (p < 0.05)

Protein	UniProtKB / NCBI(*) entries	Gene	MW, kDa	pI	Number of peptides (% AAC)
<b>Cytoskeleton and motor proteins</b>					
Actin-binding LIM protein 2 isoform 1	Q6H8Q1	ABLIM2	67.8	8.29	11 (10)
Coronin-1A	P31146	CORO1A	51.0	6.25	7 (6)
Coronin-1B	Q9BR76	CORO1B	54.2	5.61	7 (4)
Dynein light chain 2, cytoplasmic	Q96FJ2	DYNLL2	10.3	6.81	7 (14)
<b>RNA processing regulators</b>					
tRNA (cytosine(38)-C(5))-methyltransferase isoform a	O14717	TRDMT1	44.6	8.78	6 (5)
<b>Protein processing regulators</b>					
Beta-1,3-galactosyltransferase 2	O43825	B3GALT2	49.2	9.50	10 (6)
Glycoprotein endo-alpha-1,2-mannosidase	Q5SR19 / NP_078917(*)	MANEA	53.6	9.14	11 (7)
UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase 13 isoform b	X5DRI3 / AHW56697(*)	GALNT13	7.4	9.39	6 (19)
<b>Enzymes</b>					
Iduronate 2-sulfatase	O60597 / AAC05984(*)	IDS	19.5	8.80	6 (11)
Iduronate 2-sulfatase (Hunter syndrome) isoform CRA_a	EAW61280(*)	IDS	19.5	9.21	6 (11)
Retinol dehydrogenase 13 isoform 1	Q8NBN7	RDH13	35.9	8.23	6 (7)
Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3 isoform 1	Q9P035	HACD3	43.1	9.04	6 (4)
<b>Receptors. Receptor regulators</b>					
Olfactory receptor 1L6	Q8NGR2	OR1L6	39.5	9.60	6 (6)
Prostate and testis expressed protein 4	P0C8F1	PATE4	11.4	8.97	6 (22)
<b>Hormones</b>					
Prolactin-releasing peptide	P81277	PRLH	9.6	11.66	6 (13)
<b>Proteins of the immune response and inflammation</b>					
C-type lectin domain family 2 member B	Q92478	CLEC2B	17.3	9.02	6 (13)
Protein phosphatase 1B isoform beta-1	O75688	PPM1B	52.6	4.95	8 (5)
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 14B	Q96C90	PPP1R14B	15.9	4.75	5 (10)

Таблица 1 (продолжение)  
Table 1 (continued)

Protein	UniProtKB / NCBI(*) entries	Gene	MW, kDa	pI	Number of peptides (% AAC)
<b>Cytokines. Growth factors</b>					
Bone morphogenetic protein 8A	Q7Z5Y6	BMP8A	44.8	9.06	6 (2)
Bone morphogenetic protein 8B isoform 1	P34820	BMP8B	44.7	8.76	6 (3)
Stromal cell-derived factor 1 isoform alpha precursor	P48061	CXCL12	10.1	9.72	5 (16)
Stromal cell-derived factor 1 isoform beta	P48061	CXCL12	10.7	9.93	5 (16)
Stromal cell-derived factor 1 isoform theta	P48061 / ABC69273(*)	CXCL12	11.4	9.67	5 (15)
<b>Exocytosis regulators</b>					
Synaptotagmin-8 isoform 4	Q8NBV8	SYT8	44.1	9.65	7 (6)
<b>Transcription factors</b>					
Cyclin-dependent kinase 9 isoform 1	P50750	CDK9	42.8	8.97	9 (8)
Flt3-interacting zinc finger protein 1	Q96SL8	FIZ1	52.0	8.59	8 (3)
Homeobox protein Hox-A7	P31268 / NP_008827(*)	HOXA7	25.3	5.26	6 (6)
Homeobox protein Hox-D12 isoform 1	P35452	HOXD12	29.0	9.82	6 (6)
Pirin	O00625	PIR	32.1	6.42	11 (7)
Putative transcription factor ovo-like protein 3	O00110 / AAB51180(*)	OVOL3	24.3	10.08	9 (11)
Putative transcription factor ovo-like protein 3 isoform X2	XP_011525553(*)	OVOL3	13.2	9.77	6 (13)
Putative zinc finger protein 840	A6NDX5	ZNF840P	83.2	9.69	13 (3)
Transcription initiation factor TFIID subunit 8 isoform 1	Q7Z7C8	TAF8	34.2	6.03	6 (5)
Zinc finger and SCAN domain-containing protein 9 isoform 2	O15535 / NP_001186408(*)	ZSCAN9	51.6	8.07	9 (8)
Zinc finger protein GLIS2	Q9BZE0	GLIS2	55.7	9.08	6 (4)
<b>Cell differentiation regulators. Developmental proteins</b>					
Neuronatin isoform alpha	Q16517	NNAT	9.2	10.17	4 (18)
Outer dense fiber protein 3 isoform 1	Q96PU9	ODF3	27.7	9.90	5 (9)
Vexin isoform 1	Q8TAG6	VXN	22.6	10.05	9 (6)

Таблица 1 (окончание)  
Table 1 (continued)

Protein	UniProtKB / NCBI(*) entries	Gene	MW, kDa	pI	Number of peptides (% AAC)
<b>Cell adhesion and matrix proteins</b>					
Sperm acrosome membrane-associated protein 3 isoform CRA_b	Q8IXA5 / EAW80218(*)	SPACA3	15.1	8.93	5 (12)
<b>Proteins with unknown functions. Domains</b>					
C2 domain-containing protein 2, partial	Q9Y426 / CAB43307(*)	C2CD2	19.8	5.97	6 (8)
Capsid scaffold protein	A0A126LB05 / AMD82185(*)	U53.5	27.6	7.06	7 (6)
cDNA FLJ39825 fis, clone SPLEN2012175, highly similar to Nicotinamide riboside kinase 1	B3KUG3 / BAG53425(*)	N/A	21.7	5.44	6 (7)
JHDM1D protein	A0JNV9 / AAI27008(*)	JHDM1D	9.8	11.46	7 (16)
Nicotinamide riboside kinase 1 isoform 3	Q5W125 / NP_001317607(*)	NMRK1	23.8	5.33	6 (6)
Nuclear pore complex-interacting protein family member B7	O75200	NPIP7	47.7	10.35	6 (3)
Outcome predictor in acute leukemia 1, partial	Q1EG69 / AAV68560(*)	OPAL1	3.3	11.53	5 (33)
Putative uncharacterized protein B3GALT5-AS1 isoform 1	P59052	B3GALT5-AS1	15.7	9.21	4 (4)
Testis-expressed protein 50	A0A1B0GTY4	TEX50	20.8	9.36	6 (8)

Note. Abbreviations: AAC, amino acid coverage; MW, molecular weight; pI, isoelectric point; N/A, not applicable or not available.

TABLE 2. MALDI-TOF MASS SPECTROMETRIC PROTEOME PROFILING OF MICROVESICLES PRODUCED BY THP-1 CELLS (p < 0.05)

Protein	UniProtKB / NCBI(*) entries	Gene	MW, kDa	pI	Number of peptides (% AAC)
<b>Cytoskeleton and motor proteins</b>					
Costars family protein ABRACL	Q9P1F3	ABRACL	9.1	5.86	5 (17)
Myosin regulatory light chain 12A	P19105	MYL12A	19.8	4.67	7 (10)
Myosin regulatory light chain 12B	O14950	MYL12B	19.8	4.71	7 (10)
Myosin regulatory light polypeptide 9 isoform 1	P24844	MYL9	19.8	4.80	7 (10)
<b>RNA processing and translation regulators</b>					
cDNA FLJ35275 fis, clone PROST2006282, weakly similar to Translation initiation factor IF-2	Q8NAJ1 / BAC03923(*)	N/A	27.4	11.90	10 (10)

Таблица 2 (продолжение)  
Table 2 (continued)

Protein	UniProtKB / NCBI(*) entries	Gene	MW, kDa	pI	Number of peptides (% AAC)
28S ribosomal protein S11 isoform 1, mitochondrial	P82912	MRPS11	20.6	10.82	7 (11)
39S ribosomal protein L12, mitochondrial	P52815	MRPL12	21.3	9.04	7 (7)
Mitochondrial assembly of ribosomal large subunit protein 1	Q96EH3	MALSU1	26.2	5.32	7 (7)
Ribonuclease P protein subunit p20	O75817	POP7	15.6	9.09	8 (14)
<b>Ubiquitin-proteasome system proteins</b>					
RING finger protein 175 isoform X3	XP_011530183(*)	RNF175	33.9	9.16	7 (5)
RING finger protein 175 isoform CRA_a, partial	EAX04950(*)	RNF175	34.1	9.15	7 (5)
UBX domain containing 5 isoform CRA_d	EAX07827(*)	UBXN5	21.5	8.42	7 (12)
<b>Enzymes</b>					
Acyl-coenzyme A thioesterase 13 isoform 1	Q9NPJ3	ACOT13	15.0	9.23	8 (16)
cDNA FLJ61119, highly similar to Developmentally-regulated GTP-binding protein 2	B4DIG2 / BAG58474(*)	N/A	15.5	9.27	8 (24)
Cytosolic 5'-nucleotidase 1A	Q9BXI3	NT5C1A	41.0	6.11	7 (6)
Dehydrogenase/reductase SDR family member 4 isoform 2	Q9BTZ2 / NP_001269916(*)	DHRS4	20.3	10.32	11 (20)
Valacyclovir hydrolase isoform 1	Q86WA6	BPHL	32.5	9.20	6 (7)
<b>Receptors. Receptor regulators</b>					
Oestrogen receptor, partial	Q13262 / AAB35900(*)	7 ER	4.6	6.45	6 (13)
Paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta isoform 3	AAG17224(*)	PILRB	29.6	9.84	6 (11)
<b>Proteins of the immune response and inflammation</b>					
TLR4 interactor with leucine rich repeats	Q7L0X0	TRIL	88.7	9.70	21 (3)
<b>Cytokines. Growth factors</b>					
Astrocyte-derived trophic factor 2	AAB33494(*)	GDNF	14.7	9.30	9 (16)
Fibroblast growth factor 10	O15520	FGF10	23.4	9.61	7 (9)
Fibroblast growth factor 10, partial	O15520 / CAG46489(*)	FGF10	23.4	9.67	7 (9)

Таблица 2 (продолжение)  
Table 2 (continued)

Protein	UniProtKB / NCBI(*) entries	Gene	MW, kDa	pI	Number of peptides (% AAC)
Fibroblast growth factor 10, partial	Q8NFI9 / AAM46926(*)	FGF10	19.2	9.94	7 (12)
Glial cell line-derived neurotrophic factor isoform 1	P39905	GDNF	23.7	9.26	15 (9)
<b>Autophagy regulators</b>					
Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B	Q9GZQ8	MAP1LC3B	14.7	8.89	5 (11)
Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3 beta 2	A6NCE7	MAP1LC3B2	14.6	8.74	5 (11)
<b>Intercellular signaling proteins</b>					
BTB/POZ domain-containing protein KCTD20 isoform 2	Q7Z5Y7 / NP_001273508(*)	KCTD20	28.9	5.25	8 (7)
Casein kinase II subunit alpha isoform 1	P68400	CSNK2A1	45.1	7.29	7 (4)
Guanylyl cyclase-activating protein 3 isoform 1	O95843	GUCA1C	23.8	4.95	7 (8)
<b>Transport proteins. Transport regulatory proteins</b>					
ATP synthase H+ transporting mitochondrial F1 complex delta subunit isoform CRA_a	EAW69531(*)	ATP5F1D	14.7	11.83	7 (14)
Biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 6 isoform 1	Q9UL45	BLOC1S6	19.7	6.01	7 (11)
Sesquipedalian-1 isoform 1	Q8N4B1	PHETA1	27.2	9.18	9 (6)
Vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog isoform 1	Q9NP79	VTA1	33.9	5.87	5 (3)
<b>Hemostatic regulators</b>					
Endothelin-2 isoform 2 preproprotein	NP_001289198(*)	EDN2	16.5	10.19	7 (11)
<b>Transcription factors</b>					
cDNA FLJ38903 fis, clone NT2NE2001252, highly similar to Homeobox protein Hox-B8	Q8N8T3 / BAC04730(*)	N/A	27.7	8.18	7 (7)
GA-binding protein subunit beta-1 isoform 1	Q06547	GABPB1	42.5	4.77	6 (5)
Homeobox protein BarH-like 2	Q9UMQ3	BARX2	31.2	8.65	5 (4)
Homeobox protein Hox-B8	P17481 / NP_076921(*)	HOXB8	27.6	8.48	7 (7)
Homeobox protein Hox-C8	P31273	HOXC8	27.7	6.57	6 (5)

Таблица 2 (окончание)  
Table 2 (continued)

Protein	UniProtKB / NCBI(*) entries	Gene	MW, kDa	pI	Number of peptides (% AAC)
Homeobox protein MOX-1 isoform 1	P50221	MEOX1	28.0	7.79	6 (5)
PAXIP1-associated glutamate-rich protein 1	Q9BTK6	PAGR1	27.7	4.40	6 (4)
THAP domain-containing protein 8	Q8NA92	THAP8	30.1	10.24	8 (6)
ZZ-type zinc finger-containing protein 3, partial	Q8IYH5 / BAB84945(*)	ZZZ3	58.1	4.96	11 (6)
<b>Chromatin structural proteins</b>					
Histone H4	P62805	H4C1	11.4	11.36	11 (22)
<b>Cell differentiation regulators. Developmental proteins</b>					
Netrin-4 isoform 1	Q9HB63	NTN4	70.0	8.44	10 (4)
Netrin-4, partial	Q9HB63 / BAB14964(*)	NTN4	37.9	8.40	13 (9)
<b>Cell adhesion and matrix proteins</b>					
LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 2 isoform 2	Q7Z4I7 / NP_060450(*)	LIMS2	41.5	8.71	18 (6)
LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 2 isoform X2	XP_011509755(*)	LIMS2	36.6	8.92	18 (7)
<b>Proteins with unknown functions. Domains</b>					
cDNA FLJ75546	A8K1F9 / BAF82563(*)	N/A	13.3	10.88	5 (11)
Chromosome 11 open reading frame 58 isoform CRA_c	E9PRZ9 / EAW68457(*)	C11orf58	10.6	4.09	5 (15)
Divergent protein kinase domain 1C isoform 1	Q0P6D2	DIPK1C	46.4	6.38	6 (4)
Leucine-rich repeat and IQ domain-containing protein 4	A6NIV6	LRRIQ4	63.9	8.43	8 (6)
Protein CEI isoform 1	Q86SI9	C5orf38	15.1	11.42	7 (9)
Small acidic protein	O00193	SMAP	20.3	4.57	6 (8)
Testis-expressed protein 50	A0A1B0GTY4	TEX50	20.8	9.36	5 (6)
Testis-expressed protein 51	A0A1B0GUA7	TEX51	18.8	7.59	5 (7)
Testis-expressed protein 51 isoform X12	XP_011510580(*)	TEX51	18.6	6.43	5 (8)
Uncharacterized protein C5orf47	Q569G3	C5orf47	19.2	10.48	6 (11)
Uncharacterized protein DKFZp762B162	Q69YQ6 / CAH10612(*)	DKFZp762B162	18.5	6.51	12 (12)

Note. As for Table 1.

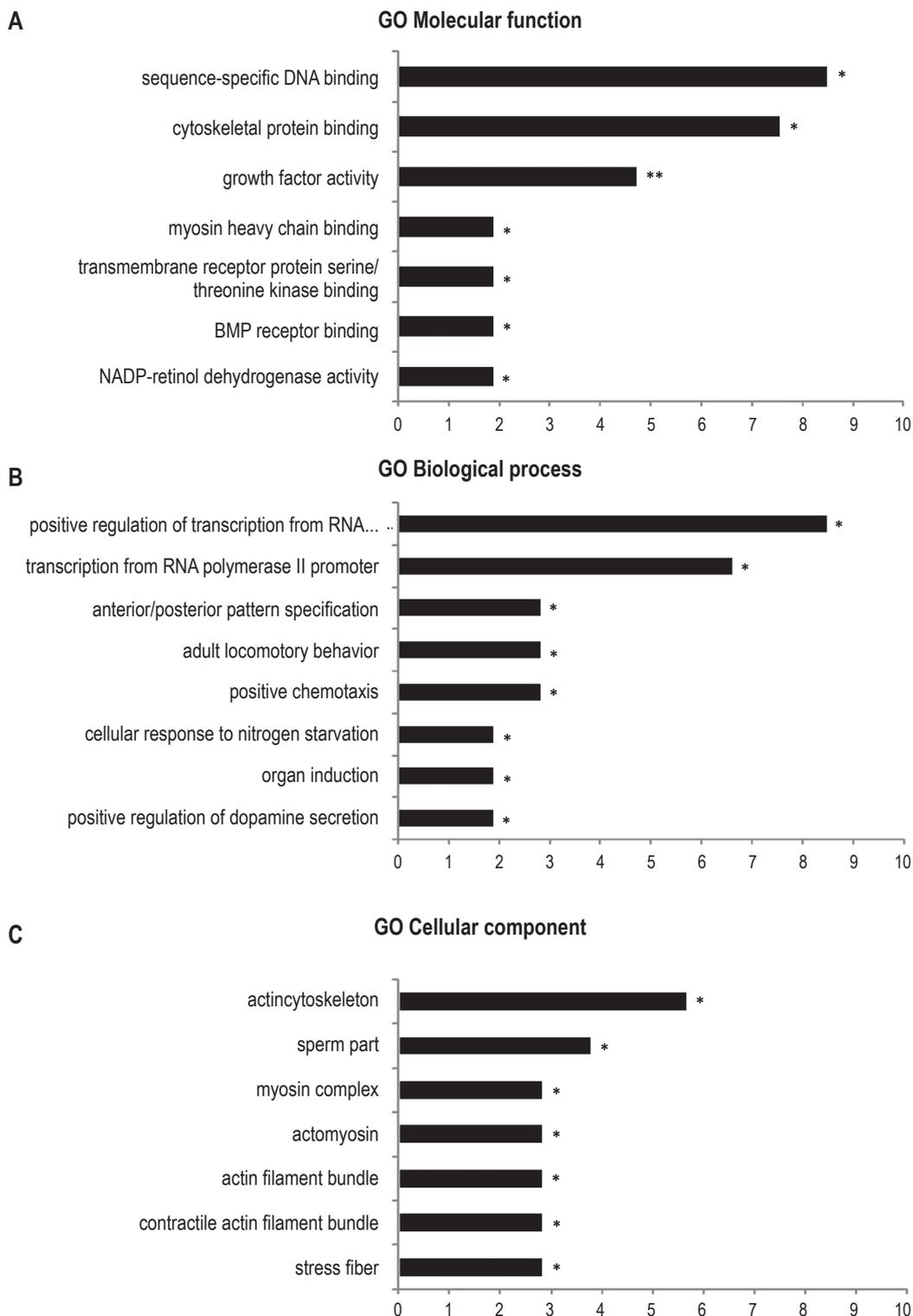


Figure 2. Most common clusters of proteins obtained from lysates of THP-1 cells and their microvesicles: A, molecular function; B, biological process; C, cellular component (percentage of the total number of identified proteins; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ ; DAVID 6.8)

sponse to nitrogen starvation are minor components, which account for only 14.2% of the total number of the identified proteins (Figure 2B).

In contrast, the functional groups distributed by cellular component were found to be more uniform. Approximately equal proportions (2.8–3.8% of the total) were obtained for the clusters associated with sperm part, myosin complex, actomyosin, actin filament bundle and contractile actin filament bundle, and stress fiber. At the same time, the most representative cluster, which accounts for only 5.7% of the total number of the identified proteins, was formed by proteins associated with the actin cytoskeleton as a whole (Figure 2C).

Among 16 functional groups of proteins identified separately in the MVs, the largest (> 15% of the total) ones are represented by proteins with unknown functions (11 entries) and transcription regulators (9 entries). The smallest (< 5% of the total) functional groups comprise receptors and receptor regulators (2 entries), autophagy regulators (2 entries), cell differentiation regulators and developmental proteins (2 entries), cell adhesion and matrix proteins (2 entries), proteins of the immune response and inflammation (1 entry), hemostatic regulators (1 entry), and chromatin structural proteins (1 entry). An intermediate position (5–15% of the total) is occupied by RNA processing and translation regulators (5 entries), enzymes (5 entries), cytokines and growth factors (5 entries), cytoskeleton and motor proteins (4 entries), transport proteins and transport regulatory proteins (4 entries), ubiquitin-proteasome system proteins (3 entries), and intracellular signaling proteins (3 entries) (Table 2).

## Discussion

THP-1 cells used by us allow for *in vitro* analyzing the main biochemical processes that occur in monocytes *in vivo*, including those leading to spontaneous secretion of their MVs into the extracellular space. The data obtained using MALDI-TOF mass spectrometry indicate that the studied cells and their MVs are characterized by a wide range of proteins with various functions and properties, providing the possibility of multilateral regulation of cell metabolism.

In recent years, international research teams have analyzed the proteome of the THP-1 monocyte-like cell line [12, 17, 18]. However, the most detailed study only mentioned approximately 5 400 proteins, which is significantly less than the number of proteins contained in any eukaryotic cell. That strongly indicates the incompleteness of the monocyte-like cell proteome described to date. Nevertheless, the main functional groups of proteins presented in the above works matched those found in our study (Table 1). However, from the list of proteins presented in the work [4] devoted to the protein profiling of the MVs derived from

the THP-1 monocyte-like cell line, only 1 entry (histone H4) matched those found by us in these MVs (Table 2). Meanwhile, the remaining 59 entries of the proteins identified by us in the studied MVs give new information on the proteome of the MVs produced by monocyte-like cells.

In concordance with the biogenesis pathways of the studied MVs, their proteome constitutes a set of protein molecules of cellular origin. Proteomes of extracellular MVs produced by platelets, mature lymphocytes, endotheliocytes, mast and some other types of cells are currently studied in relative detail, and data from these studies are presented by many authors, in particular [8, 11, 26]. Thanks to these works, it is now known that MVs derived from blood and vascular cells contain both non-specific proteins characteristic of any type of cells and specific proteins involved in the functioning of a particular cell. Proteins specific for cells of a certain type are, for example, a T cell receptor expressed primarily on T lymphocytes, platelet P-selectin, and other proteins capable of being involved in the immune response [2]. Regardless of their cellular origin, MV proteins are most often involved in the very formation of vesicles. Undoubtedly, such proteins are tetraspanins (CD9, CD63, CD81, and CD82), heat shock proteins (HSP70, HSP90), cytoskeletal elements, enzymes of various metabolic pathways, adhesion molecules, receptors, as well as proteins of the main histocompatibility complex (MHC) [36].

In the MVs studied by us, proteins belonging to the above classes were also found, in particular cytoskeleton and motor proteins, enzymes, cell adhesion and matrix proteins, and receptors. As well, as common proteins should be classified protein processing regulators and ubiquitin-proteasome system proteins identified in this study. Besides, we found some specific proteins, in particular those involved in the implementation of defense mechanisms, such as proteins of the immune response and inflammation, cytokines and growth factors, as well as their receptors.

Among the proteins identified by us in the studied MVs, cytokines, receptors, and regulatory proteins (Table 3) should be especially distinguished for two reasons. First, most of them have been found in monocytes/macrophages isolated from both tissues or peripheral blood and the transplantable monocyte-like cells. Secondly, the expression of such proteins in the MVs can have a certain signaling or regulatory function in relation to the microenvironment.

For example, fibroblast growth factor 10 (FGF10) identified by us in the studied MVs, which was not previously found there by other researchers, can exert multiple effects on cells of the microenvironment, activating the ERK signaling cascade and thus affecting the proliferation, survival and motility of various types of cells, as well as taking part in the activation of T cells, proliferation, migration and differentiation of

TABLE 3. SEVERAL FUNCTIONS OF PROTEINS OF MICROVESICLES PRODUCED BY THP-1 CELLS

Protein	Function (according to the SwissProt/UniProt and NCBI databases)	Presence in monocytes/ macrophages or THP-1 cells [references]
<b>Fibroblast growth factor 10 (FGF10)</b>	a growth factor; plays an important role in the regulation of embryonic development, cell proliferation and cell differentiation; required for normal branching morphogenesis; may play a role in wound healing; activates ERK1/2 cascades	[15] ( <i>FGF10</i> gene expression)
<b>Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), same as Astrocyte-derived trophic factor (ATF)</b>	a neurotrophic factor; enhances survival and morphological differentiation of dopaminergic neurons and increases their high-affinity dopamine uptake; negatively regulates extrinsic apoptotic signaling pathway in absence of ligand; positively regulates cell differentiation and cell population proliferation; binds various TGF-beta receptors leading to recruitment and activation of SMAD family transcription factors that regulate gene expression	[7]
<b>TLR4 interactor with leucine rich repeats</b>	a component of the TLR4 signaling complex; mediates the innate immune response to bacterial lipopolysaccharide leading to cytokine secretion	[6]
<b>Oestrogen receptor</b>	an estrogen receptor, a ligand-activated transcription factor composed of several domains important for hormone binding, DNA binding, and activation of transcription; recruited to the NF-kappa-B response element of the CCL2 and IL8 promoters and can displace CREBBP; present with NF-kappa-B components RELA/p65 and NFKB1/p50 on ERE sequences	[30]
<b>Paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta</b>	paired receptors; consist of highly related activating and inhibitory receptors and are widely involved in the regulation of the immune system; thought to act as a cellular signaling activating receptor that associates with ITAM-bearing adapter molecules on the cell surface	[31]
<b>LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 2</b>	an adapter protein in a cytoplasmic complex linking beta-integrins to the actin cytoskeleton; bridges the complex to cell surface receptor tyrosine kinases and growth factor receptors; plays a role in modulating cell spreading and migration	[31]
<b>BTB/POZ domain-containing protein KCTD20</b>	an intracellular signaling protein; promotes the phosphorylation of AKT family members	[19]
<b>Casein kinase II subunit alpha</b>	an intracellular signaling protein; regulates numerous cellular processes, such as cell cycle progression, apoptosis and transcription, as well as viral infection; required for p53/TP53-mediated apoptosis; phosphorylates the caspases CASP9 and CASP2 and the apoptotic regulator NOL3 (phosphorylation protects CASP9 from cleavage and activation by CASP8, and inhibits the dimerization of CASP2 and activation of CASP8); phosphorylates and regulates numerous transcription factors including NF-kappa-B, STAT1, CREB1, IRF1, IRF2, ATF1, SRF, MAX, JUN, FOS, MYC, and MYB; during viral infection, phosphorylates various proteins involved in the viral life cycles of EBV, HSV, HBV, HCV, HIV, CMV, and HPV; regulates Wnt signaling by phosphorylating CTNNB1 and the transcription factor LEF1	[29]
<b>Endothelin-2 isoform 2 preproprotein</b>	a member of the endothelin protein family of secretory vasoconstrictive peptides; is processed to a short mature form which functions as a ligand for the endothelin receptors that initiate intracellular signaling events; is involved in a wide range of biological processes, such as hypertension and ovulation; regulates growth in several cell types and may also affect differentiation, inflammation, and angiogenesis	[3]

endothelial cells during angiogenesis. FGF10 can also regulate synaptic plasticity and phosphorylation of the transcription factor p53, as well as activate granzyme B cleavage of the FGFR1 receptor [28]. The *FGF10* gene expression was shown in tumor associated macrophages [15]. Moreover, the role of FGF10 in the development of chorionic villi was elucidated, and, as currently established, the factor is expressed by both decidual cells and the cytotrophoblast [1]. The data obtained by us on FGF10 being present in the studied MVs may become a reason for further studies, in particular, of placental macrophages, which will possibly expand existing knowledge of their role in cell communication in the uteroplacental contact area.

Glial cell line-derived neurotrophic factor, also identified by us in the studied MVs, is able to protect from degeneration dopaminergic neurons in the substantia nigra of the midbrain and the terminals of tyrosine hydroxylase-positive axons in the striatum [7]. It can be assumed that TLR4 interactor with leucine rich repeats (a component of Toll-like receptor 4), which is also widely present in the brain and other organs and tissues, when transferred to microenvironmental cells (in particular, peripheral blood mononuclear cells and glial cells), will increase their production of cytokines in response to bacterial infection [6]. Similarly, LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 2 (an adapter protein in a cytoplasmic complex linking beta-integrins to the actin cytoskeleton) is able to modulate the process of cell migration during tumor development [31].

Furthermore, it was found that the studied MVs contain receptors and their regulators, namely the estrogen receptor and paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta. Taking into account the fact that these MVs are able to transmit their receptors to the membranes of recipient cells [25], we can assume the ability of those cells to respond to signals that were previously inaccessible to them, provided that the cells have ready intracellular signal transduction pathways for these receptors [30, 31].

The specific effects of monocytes/macrophages on the surrounding cells and tissues can also be contributed to by the broad-spectrum signaling molecules identified by us, such as casein kinase II subunit alpha, which regulates cell survival at different levels – it promotes DNA repair, affects the NF- $\kappa$ B, Wnt, PI3K/ACT and JAK-STAT signaling cascades, interacts with chaperones, activates antiapoptotic proteins and inactivates proapoptotic ones, including caspases [29], as well as endothelin-2 isoform 2 preproprotein, which plays a key role in blood vessel homeostasis [3], and BTB/POZ domain-containing protein KCTD20, which activates AKT, a key enzyme of the PI3K/AKT signaling pathway involved in the regulation of cell proliferation, growth and survival [19].

The molecular mechanisms of MV formation suggest that MVs should include components of the actin network adjacent to the cell membrane and other cytoskeletal elements [9]. The data obtained by us allow suggesting that the studied MVs may have an ectosomal nature. Thus, we identified proteins of the actin-myosin system and one regulator of the cytoskeleton dynamics, namely myosin and costars family protein ABRACL, that are involved in MV formation and budding from the cell membrane [24, 32]. Various isoforms of cytoskeletal proteins have not been found in exosomes yet according to the available literature [5, 13].

The performed functional and cluster annotation analyzes altogether revealed the predominant molecular functions of the proteins identified in the studied MVs, and showed possible participation of these proteins in biological processes (Figure 2). It was found that the dominant clusters characterizing the molecular function of the identified proteins are associated with sequence-specific DNA and cytoskeletal protein binding, as well as growth factor activity. The association of the proteins with the actin cytoskeleton is also indicated by the distribution of functional groups by the localization of the identified proteins in the cell and their belonging to a variety of cellular parts. Some of these actin-binding proteins are actively involved in the reorganizing of actin filaments in response to the effects of various growth factors, cytokines and chemoattractants and may play a key role in the development of a number of pathologies in the human body [16]. At the same time, the distribution of the proteins by biological process showed that the most representative clusters comprise proteins involved in the regulation of gene transcription, while the groups of proteins responsible for positive chemotaxis, the spatial organization of differentiating cells, and a cellular response were minor components. The results obtained by us are consistent with the biological nature of the studied MVs and are in line with the data collected by other researchers [12, 17, 18].

To date, a number of good proteomic research strategies have been described that are based on a combination of different approaches and techniques. Unfortunately, protein identification is a rather complex multi-stage process and does not always lead to reproducible results. The scheme proposed in this study can lead to good results with a qualitative description of the protein profile of the MVs released from THP-1 cells. However, the search for the target protein using this approach poses significant difficulties, mainly due to the extremely low yield of the total protein. For a more detailed analysis of the MV proteome using mass spectrometric methods, it would be advisable to include in the study protocol additional preparation steps at the stage of the isolation of the MVs, such as preserving accumulation, ultracentrifugation and im-

munoprecipitation. It is also worth noting that the data obtained by us in this study should also be further verified using the immunoblotting method, in both THP-1 cells and macrophages isolated from a variety of tissues, as well as at different stages of macrophage differentiation.

## Conclusion

Summarizing the data obtained, we can conclude that MVs produced by the THP-1 monocyte-like cell line, along with common proteins, also contain pro-

teins of the immune response and inflammation, cytokines and growth factors, with the help of which these MVs can contribute to the specific effects of monocytes/macrophages on the surrounding cells. Our data on the proteome of the studied MVs will expand the existing knowledge of distant communication of cells and indicate new mechanisms of interaction between monocytes/macrophages and their microenvironment. The presented results will be useful for further proteomic studies of MVs produced by cells involved in an immune response under physiological and inflammatory conditions.

## References

1. Anteby E.Y., Natanson-Yaron S., Hamani Y., Sciaki Y., Goldman-Wohl D., Greenfield C., Ariel I., Yagel S. Fibroblast growth factor-10 and fibroblast growth factor receptors 1-4: expression and peptide localization in human decidua and placenta. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 2005, Vol. 119, no. 1, pp. 27-35.
2. Baig S., Kothandaraman N., Manikandan J., Rong L., Ee K.H., Hill J., Lai C.W., Tan W.Y., Yeoh F., Kale A., Su L.L., Biswas A., Vasoo S., Choolani M. Proteomic analysis of human placental syncytiotrophoblast microvesicles in preeclampsia. *Clin. Proteomics*, 2014, Vol. 11, no. 1, 40. doi: 10.1186/1559-0275-11-40.
3. Battistini B., Chailier P., D'Orléans-Juste P., Brière N., Sirois P. Growth regulatory properties of endothelins. *Peptides*, 1993, Vol. 14, no. 2, pp. 385-399.
4. Bernimoulin M., Waters E.K., Foy M., Steele B.M., Sullivan M., Falet H., Walsh M.T., Barteneva N., Geng J.G., Hartwig J.H., Maguire P.B., Wagner D.D. Differential stimulation of monocytic cells results in distinct populations of microparticles. *J. Thromb. Haemost.*, 2009, Vol. 7, no. 6, pp. 1019-1028.
5. Burbano C., Rojas M., Vasquez G., Castano D. Microparticles that form immune complexes as modulatory structures in autoimmune responses. *Mediators Inflamm.*, 2015, Vol. 2015, 267590. doi: 10.1155/2015/267590.
6. Carpenter S., Carlson T., Dellacasagrande J., Garcia A., Gibbons S., Hertzog P., Lyons A., Lin L.L., Lynch M., Monie T., Murphy C., Seidl K.J., Wells C., Dunne A., O'Neill L.A. TRIL, a functional component of the TLR4 signaling complex, highly expressed in brain. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 6, pp. 3989-3995.
7. Chen C., Li X., Ge G., Liu J., Biju K.C., Laing S.D., Qian Y., Ballard C., He Z., Masliah E., Clark R.A., O'Connor J.C., Li S. GDNF-expressing macrophages mitigate loss of dopamine neurons and improve Parkinsonian symptoms in MitoPark mice. *Sci. Rep.*, 2018, Vol. 8, no. 1, 5460. doi: 10.1038/s41598-018-23795-4.
8. Cianciaruso C., Beltraminelli T., Duval F., Nassiri S., Hamelin R., Mozes A., Gallart-Ayala H., Ceada Torres G., Torchia B., Ries C.H., Ivanisevic J., de Palma M. Molecular profiling and functional analysis of macrophage-derived tumor extracellular vesicles. *Cell Rep.*, 2019, Vol. 27, no. 10, pp. 3062-3080.e11.
9. 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.
10. Cronemberger-Andrade A., Aragão-França L., de Araujo C.F., Rocha V.J., Borges-Silva Mda C., Figueira C.P., Oliveira P.R., de Freitas L.A., Veras P.S., Pontes-de-Carvalho L. Extracellular vesicles from Leishmania-infected macrophages confer an anti-infection cytokine-production profile to naïve macrophages. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2014, Vol. 8, no. 9, e3161. doi: 10.1371/journal.pntd.0003161.
11. Graner M.W. Roles of extracellular vesicles in high-grade gliomas: tiny particles with outsized influence. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 2019, Vol. 20, pp. 331-357.
12. Gui L., Zhang Q., Cai Y., Deng X., Zhang Y., Li C., Guo Q., He X., Huang J. Effects of let-7e on LPS-stimulated THP-1 cells assessed by iTRAQ proteomic analysis. *Proteomics Clin. Appl.*, 2018, Vol. 12, no. 5, e1700012. doi: 10.1002/prca.201700012.
13. Haraszti R.A., Didiot M.C., Sapp E., Leszyk J., Shaffer S.A., Rockwell H.E., Gao F., Narain N.R., DiFiglia M., Kiebish M.A., Aronin N., Khvorova A. High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *J. Extracell. Vesicles*, 2016, Vol. 5, no. 1, 32570. doi: 10.3402/jev.v5.32570.
14. Hare N.J., Chan B., Chan E., Kaufman K.L., Britton W.J., Saunders B.M. Microparticles released from Mycobacterium tuberculosis-infected human macrophages contain increased levels of the type I interferon inducible proteins including ISG15. *Proteomics*, 2015, Vol. 15, no. 17, pp. 3020-3029.
15. Hegab A.E., Ozaki M., Kagawa S., Hamamoto J., Yasuda H., Naoki K., Soejima K., Yin Y., Kinoshita T., Yaguchi T., Kawakami Y., Ornitz D.M., Betsuyaku T. Tumor associated macrophages support the growth of FGF9-induced lung adenocarcinoma by multiple mechanisms. *Lung Cancer*, 2018, Vol. 119, pp. 25-35.
16. Izdebska M., Zielińska W., Grzanka D., Gagat M. The role of actin dynamics and actin-binding proteins expression in epithelial-to-mesenchymal transition and its association with cancer progression and evaluation of possible therapeutic targets. *Biomed. Res. Int.*, 2018, Vol. 2018, 4578373. doi: 10.1155/2018/4578373.

17. Kaewseekhao B., Naranbhai V., Roytrakul S., Namwat W., Paemanee A., Lulitanond V., Chairprasert A., Faksri K. Comparative proteomics of activated THP-1 cells infected with Mycobacterium tuberculosis identifies putative clearance biomarkers for tuberculosis treatment. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 7, e0134168. doi: 10.1371/journal.pone.0134168.
18. Kang J.H., Kim H.T., Choi M.S., Lee W.H., Huh T.L., Park Y.B., Moon B.J., Kwon O.S. Proteome analysis of human monocytic THP-1 cells primed with oxidized low-density lipoproteins. *Proteomics*, 2006, Vol. 6, no. 4, pp. 1261-1273.
19. Kok Y.L., Vongrad V., Shilaih M., Di Giallonardo F., Kuster H., Kouyos R., Günthard H.F., Metzner K.J. Monocyte-derived macrophages exhibit distinct and more restricted HIV-1 integration site repertoire than CD4(+) T cells. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, 24157. doi: 10.1038/srep24157.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. Maas S.L.N., Breakefield X.O., Weaver A.M. Extracellular vesicles: unique intercellular delivery vehicles. *Trends Cell. Biol.*, 2017, Vol. 27, no. 3, pp. 172-188.
24. Mallocci M., Perdomo L., Veerasamy M., Andriantsitohaina R., Simard G., Martinez M.C. Extracellular vesicles: mechanisms in human health and disease. *Antioxid. Redox Signal.*, 2019, Vol. 30, no. 6, pp. 813-856.
25. Markova K.L., Mikhailova V.A., Korenevsky A.V., Milyutina Y.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. *Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 2, pp. 249-268. doi: 10.15789/1563-0625-MPB-1877.
26. Miguet L., Pcaud K., Felden C., Hugel B., Martinez M.C., Freyssinet J.M., Herbrecht R., Potier N., van Dorsselaer A., Mauvieux L. Proteomic analysis of malignant lymphocyte membrane microparticles using double ionization coverage optimization. *Proteomics*, 2006, Vol. 6, no. 1, pp. 153-171.
27. Olingy C.E., Dinh H.Q., Hedrick C.C. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *J. Leukoc. Biol.*, 2019, Vol. 106, no. 2, pp. 309-322.
28. Ornitz D.M., Itoh N. The fibroblast growth factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.*, 2015, Vol. 4, no. 3, pp. 215-266.
29. Palevski D., Levin-Kotler L.P., Kain D., Naftali-Shani N., Landa N., Ben-Mordechai T., Konfino T., Holbova R., Molotski N., Rosin-Arbesfeld R., Lang R.A., Leor J. Loss of macrophage Wnt secretion improves remodeling and function after myocardial infarction in mice. *J. Am. Heart Assoc.*, 2017, Vol. 6, no. 1, e004387. doi: 10.1161/JAHA.116.004387.
30. Pelekanou V., Kampa M., Kiagiadaki F., Deli A., Theodoropoulos P., Agrogiannis G., Patsouris E., Tsapis A., Castanas E., Notas G. Estrogen anti-inflammatory activity on human monocytes is mediated through cross-talk between estrogen receptor ER $\alpha$ 36 and GPR30/GPER1. *J. Leukoc. Biol.*, 2016, Vol. 99, no. 2, pp. 333-347.
31. Poczobutt J.M., De S., Yadav V.K., Nguyen T.T., Li H., Sippel T.R., Weiser-Evans M.C., Nemenoff R.A. Expression profiling of macrophages reveals multiple populations with distinct biological roles in an immunocompetent orthotopic model of lung cancer. *J. Immunol.*, 2016, Vol. 196, no. 6, pp. 2847-2859.
32. Raposo G., Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.*, 2013, Vol. 200, no. 4, pp. 373-383.
33. Reales-Calderón J.A., Vaz C., Monteoliva L., Molero G., Gil C. Candida albicans modifies the protein composition and size distribution of THP-1 macrophage-derived extracellular vesicles. *J. Proteome Res.*, 2017, Vol. 16, no. 1, pp. 87-105.
34. Sáenz-Cuesta M., Irizar H., Castillo-Triviño T., Muñoz-Culla M., Osorio-Querejeta I., Prada A., Sepúlveda L., López-Mato M.P., López de Munain A., Comabella M., Villar L.M., Olascoaga J., Otaegui D. Circulating microparticles reflect treatment effects and clinical status in multiple sclerosis. *Biomark. Med.*, 2014, Vol. 8, no. 5, pp. 653-661.
35. Shi C., Pamer E.G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 11, pp. 762-774.
36. Thery C., Zitvogel L., Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.*, 2002, Vol. 2, no. 8, pp. 569-579.
37. Tőkés-Füzesi M., Ruzsics I., Rideg O., Kustán P., Kovács G.L., Molnár T. Role of microparticles derived from monocytes, endothelial cells and platelets in the exacerbation of COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.*, 2018, Vol. 13, pp. 3749-3757.
38. 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.

39. Walters S.B., Kieckbusch J., Nagalingam G., Swain A., Latham S.L., Grau G.E., Britton W.J., Combes V., Saunders B.M. Microparticles from mycobacteria-infected macrophages promote inflammation and cellular migration. *J. Immunol.* 2013, Vol. 190, no. 2, pp. 669-677.

40. Yao Z., Jia X., Megger D.A., Chen J., Liu Y., Li J., Sitek B., Yuan Z. Label-free proteomic analysis of exosomes secreted from THP-1-derived macrophages treated with IFN- $\alpha$  identifies antiviral proteins enriched in exosomes. *J. Proteome Res.*, 2019, Vol. 18, no. 3, pp. 855-864.

---

**Авторы:**

**Корневский А.В.** — д.б.н., ведущий научный сотрудник, руководитель группы протеомной иммунорегуляции отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

**Милютин Ю.П.** — к.б.н., старший научный сотрудник группы протеомной иммунорегуляции отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

**Березкина М.Э.** — лаборант-исследователь лаборатории межклеточных взаимодействий отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

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

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

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

**Сельков С.А.** — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, руководитель отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

**Соколов Д.И.** — д.б.н., доцент, заведующий лабораторией межклеточных взаимодействий Отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

**Authors:**

**Korenevsky A.V.**, PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Head, Proteomic Immunoregulation Group, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

**Milyutina Yu.P.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Proteomic Immunoregulation Group, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

**Berezkina M.E.**, Research Assistant, Laboratory of Cell Interactions, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

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

**Balabas O.A.**, Leading Specialist, Chemical Analysis and Materials Research Centre, St. Petersburg State University, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

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

**Selkov S.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Head, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

**Sokolov D.I.**, PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Cell Interactions, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

## КЛАСТЕРНЫЙ АНАЛИЗ МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ СЫВОРОТКИ КРОВИ УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

Андросова Л.В.<sup>1</sup>, Симонов А.Н.<sup>1</sup>, Пономарева Н.В.<sup>2</sup>, Ключник Т.П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия

**Резюме.** Определение воспалительных маркеров в крови условно здоровых людей представляет интерес в связи с возможностью выявления заболеваний на ранних (доклинических) стадиях, а также скрытых форм патологических процессов. Уровень воспаления может служить дополнительным критерием при формировании контрольных групп в клинических и биологических исследованиях.

Цель исследования — определить некоторые воспалительные и аутоиммунные маркеры в группе условно здоровых людей и провести кластерный анализ полученных данных.

Обследовано 100 условно здоровых людей (без клинических признаков инфекций, соматических, неврологических или психических заболеваний) в возрасте от 19 до 88 лет. В сыворотке крови определяли уровни IL-10, TNF $\alpha$ , IL-6 и аутоантител к S100b и ОБМ с помощью ELISA, спектрофотометрически определяли ферментативную активность лейкоцитарной эластазы (ЛЭ) и функциональную активность  $\alpha$ 1-протеиназного ингибитора ( $\alpha$ 1-ПИ). Протеазно-ингибиторный индекс (ПИИ) рассчитывали как отношение ЛЭ к  $\alpha$ 1-ПИ. В качестве основного подхода для статистической обработки данных использовали кластерный анализ, а также метод Шапиро–Уилка, Краскела–Уоллиса и ANOVA.

Все обследуемые по иммунологическим показателям были разделены на три кластера. Выделенные кластеры статистически значимо отличались друг от друга по активности ЛЭ, протеазно-ингибиторному индексу (ПИИ) и уровню IL-10 и TNF $\alpha$ .

Показатели одного из этих кластеров (43% обследованных) в наибольшей степени приближены к средним показателям, определенным для общей выборки, что дает основание рассматривать иммунные показатели этого кластера как нормативные, соответствующие «фоновому» состоянию иммунитета у здоровых людей.

Сочетание иммунологических показателей двух других кластеров (30 и 27% обследуемых, соответственно) отражает различные варианты воспалительных реакций. Эти кластеры характеризуются разнонаправленными изменениями активности ЛЭ и протеазно-ингибиторного индекса, относительно нормативных значений, что может свидетельствовать о различных вариантах латентной воспалительной реактивности, реализующейся у пациентов, составивших эти кластеры.

Полученные кластеры не различались по возрасту исследуемых ( $p = 0,3476$ ), что позволяет исключить значимое влияние возраста на определяемые иммунные показатели, и по гендерным признакам ( $p = 0,7233$ ). Выделенные кластеры статистически не различались по функциональной активности  $\alpha$ 1-ПИ и по уровню аутоантител к нейроспецифическому белку S100b и ОБМ.

### Адрес для переписки:

Андросова Любовь Васильевна  
ФГБНУ «Научный центр психического здоровья»  
115522, Россия, Москва, Каширское ш., 34.  
Тел.: 8 (903) 261-14-30.  
E-mail: androsL@mail.ru

### Address for correspondence:

Androsova Lyubov V.  
Mental Health Research Center  
115522, Russian Federation, Moscow,  
Kashirskoye highway, 34.  
Phone: 7 (903) 261-14-30.  
E-mail: androsL@mail.ru

### Образец цитирования:

Л.В. Андросова, А.Н. Симонов, Н.В. Пономарева,  
Т.П. Ключник «Кластерный анализ маркеров  
воспаления сыворотки крови условно здоровых  
людей» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 2.  
С. 293–302.  
doi: 10.15789/1563-0625-CAO-2134

© Андросова Л.В. и соавт., 2021

### For citation:

L.V. Androsova, A.N. Simonov, N.V. Ponomareva,  
T.P. Klyushnik "Cluster analysis of blood serum inflammation  
markers of conditionally healthy people", *Medical Immunology  
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2021, Vol. 23, no. 2,  
pp. 293–302.  
doi: 10.15789/1563-0625-CAO-2134

DOI: 10.15789/1563-0625-CAO-2134

Таким образом, группа условно здоровых людей неоднородна по маркерам воспаления. Воспалительные реакции различной степени выраженности выявлялись примерно в половине случаев. Вероятно, это может указывать на наличие скрытого патологического процесса и требует подробного клинического обследования.

*Ключевые слова:* условно здоровые люди, маркеры воспаления, кластерный анализ

## CLUSTER ANALYSIS OF BLOOD SERUM INFLAMMATION MARKERS OF CONDITIONALLY HEALTHY PEOPLE

Androsova L.V.<sup>a</sup>, Simonov A.N.<sup>a</sup>, Ponomareva N.V.<sup>b</sup>, Klyushnik T.P.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Mental Health Research Center, Moscow, Russian Federation*

<sup>b</sup> *Research Center of Neurology, Moscow, Russian Federation*

**Abstract.** Determination of inflammatory markers in blood of conventionally healthy people is of interest due to opportunity of detecting diseases at early (preclinical) stages, as well as latent forms of pathological processes. The level of inflammation may serve as an additional criterion to forming control groups in clinical and biological studies. The aim of the study is to identify some inflammatory and autoimmune markers in a group of conventionally healthy people and to conduct a cluster analysis of the data obtained. The study involved 100 apparently healthy people (without clinical signs of infections, somatic, neurological or mental diseases) aged 19 to 88 years. The levels of IL-10, TNF $\alpha$ , IL-6 and autoantibodies to S100b and MBP were determined in blood serum using ELISA. Enzymatic activity of leukocyte elastase (LE) and functional activity of the  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor ( $\alpha$ 1-PI) were determined spectrophotometrically. Protease inhibitory index (PII) was calculated as the ratio of LE to  $\alpha$ 1-PI. Cluster analysis, as well as the Shapiro–Wilk, Kruskal–Wallis, and ANOVA methods were used as the main approach to statistical data processing. All the subjects were divided into three clusters, according to their immunological parameters. The selected clusters were statistically significantly different from each other, in terms of LE activity, protease-inhibitory index (PII), as well as IL-10 and TNF $\alpha$  levels. The indices of a distinct cluster (43% of total cohort) are most close to average indices assessed for the general sample, which gives ground to consider the values of immune indicators from this cluster as physiological norm, corresponding to the background immunity state in healthy people. Combination of immunological parameters in two other clusters (30 and 27% of the subjects, respectively) may reflect different variants of inflammatory reactions. These clusters are characterized by multidirectional changes in LE activity and protease-inhibitory index, compared to the standard values, thus suggestive for different variants of latent inflammatory reactivity, which are realized in the patients presented in these clusters. The obtained clusters did not differ by age of the subjects ( $p = 0.3476$ ), which makes it possible to exclude a significant influence of age on the determined immune parameters, and by gender characteristics ( $p = 0.7233$ ). The selected clusters did not differ statistically in the functional activity of  $\alpha$ 1-PI and in the level of autoantibodies to S100b and MBP.

Thus, the group of conditionally healthy people is heterogeneous in terms of inflammation markers. Inflammatory reactions of varying severity were detected in about half of the cases. Probably, this may indicate the presence of a latent pathological process and requires a detailed clinical examination.

*Keywords:* conditionally healthy people, markers of inflammation, cluster analysis

Исследование выполнено в рамках финансирования темы НИР АААА-А18-118041990026-5 по программе Президиума РАН №44 «Фундаментальные механизмы возрастной нейропластичности и разработка новых подходов к диагностике и лечению возраст-зависимых заболеваний мозга».

### Введение

С современных позиций воспаление рассматривается как универсальная реакция организма на различные повреждающие воздействия. При воспалении микробного происхождения

оно играет ограничительную роль и направлено на гибель/элиминацию инфекционного агента. При «стерильном воспалении», когда внешний инфекционный агент отсутствует, повреждение вызывается продуктами деструкции собственных тканей организма. Исследования последних лет показали, что инфекционное воспаление, вызываемое микроорганизмами, в последующем часто становится стерильным, т.е. протекает без выявления вызвавшего его микроорганизма. Примером могут служить синдром системного воспалительного ответа (ССВО) как результат сепсиса; гломерулонефрит, пиурия, эндометриоз, хрони-

ческая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), саркоидоз и др. [13].

Хроническое стерильное воспаление рассматривается как основа прогрессирования многих системных заболеваний человека, протекающих без микробного компонента. Показано, что хроническое стерильное воспаление ассоциировано с нейродегенеративными, неврологическими и психическими заболеваниями, сахарным диабетом 2-го типа, некоторыми видами опухолей, ожирением, атеросклерозом и др. [7, 16, 17, 20].

Развитие воспаления является функцией врожденного иммунитета. В качестве индукторов воспаления выступают либо патоген-ассоциированные молекулярные паттерны – PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), либо молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением – DAMPs (damage-associated molecular patterns). PAMPs представляют собой стереотипные и консервативные в эволюции молекулы микроорганизмов, присущие одновременно большому систематическим группам микробов (липид А липополисахаридов, липотейхоевые кислоты, пептидогликаны, остатки D-маннозы и L-фукозы, формилметиониловые пептиды, флагеллин, двуспиральные и односпиральные РНК вирусов). DAMPs включают в себя внутриклеточные белковые молекулы или их фрагменты, белки внеклеточного матрикса, различные небелковые компоненты, образующиеся при деструкции тканей организма (белки теплового шока, фрагменты гиалуронаны, МНС – ассоциированные белки (белки главного комплекса гистосовместимости), актин цитоскелета, нуклеопротеины, бета-амилоид, внеклеточный АТФ, мочевиная кислота, сульфат гепарина, ДНК и др). Молекулы-индукторы распознаются образ-распознающими рецепторами (pattern recognition receptors, PRR), следствием чего является синтез провоспалительных цитокинов и запуск воспалительных реакций [10, 13, 19].

В связи с универсальным характером воспалительных реакций и их активацией в ответ на разнообразные механические и физические раздражители, представляет значительный интерес определение воспалительных маркеров в крови условно здоровых людей. Этот вопрос имеет медицинский аспект, связанный, в частности, с потенциальной возможностью выявления заболеваний на ранних (доклинических) этапах, а также латентных, скрытых форм течения патологических процессов. Помимо этого, уровень воспаления, предположительно, может служить дополнительным критерием при формировании контрольных групп в клинико-биологических исследованиях, ставящих своей целью сравнение различных биологических параметров в норме и при патологических состояниях.

В связи с вышесказанным **целью настоящего исследования** явилось определение ряда воспалительных и аутоиммунных маркеров в группе условно здоровых людей и проведение кластерного анализа совокупности полученных иммунологических показателей. Определялась концентрация цитокинов – TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10, энзиматическая активность протеолитического фермента лейкоцитарной эластазы (ЛЭ) – маркера активации нейтрофилов, функциональная активность его ингибитора –  $\alpha$ 1-протеиназного ингибитора ( $\alpha$ 1-ПИ), а также уровень аутоантител к антигенам S100b и основному белку миелина (ОБМ).

Выбор указанных воспалительных маркеров определялся тем, что участие цитокинов и нейтрофилов является общей характеристикой инфекционного и стерильного воспаления, а уровень аутоантител к антигенам S100b и ОБМ характеризует активацию приобретенного (специфического звена) иммунитета. Цитокины, являясь типичными индуцибельными медиаторами, регулирующими развитие системных и местных воспалительных реакций с участием различных типов иммунных клеток, осуществляют также связь неспецифических (врожденных) и специфических (приобретенных) иммунных реакций [14]. Циркулирующие в кровотоке цитокины инициируют процесс воспаления и стимулируют секрецию белков острой фазы; активация нейтрофилов и повышение энзиматической активности их протеолитических ферментов, в первую очередь, лейкоцитарной эластазы (ЛЭ), является важнейшей составляющей воспалительных реакций. В качестве ингибитора ЛЭ выступает острофазный белок – альфа-1 протеазный ингибитор, синтезируемый печенью. Показано, что соотношение протеаз и их ингибиторов в значительной мере определяет течение и исход воспалительной реакции [3, 12].

## Материалы и методы

Обследованы 100 условно здоровых людей в возрасте от 19 до 88 лет (средний возраст  $45,9 \pm 17,9$  лет, 41 мужчин и 59 женщин) в ФГБНУ «Научном центре неврологии», где они проходили неврологическое и ЭЭГ обследование. Критериями исключения было наличие неврологической или психической патологии, включая сердечно-сосудистые, эндогенные заболевания, эпилепсию, наличие психиатрических или неврологических заболеваний в анамнезе, а также острой воспалительной, или аутоиммунной патологии, выявленной в течение 1-2-х месяцев, предшествующих обследованию.

Иммунологические показатели определяли в сыворотке периферической крови, забор которой осуществляли из вены в сухую пробирку в тот

же день, когда проводилось нейрофизиологическое обследование. Форменные элементы осаждали центрифугированием при 750 g в течение 15 минут при 22 °С, затем отбирали сыворотку, которая использовалась для анализа либо сразу после получения, либо хранилась при +2 – +8 °С не более суток или в замороженном состоянии при температуре от -18 до -24 °С в течение месяца до проведения анализа.

Интерлейкины: IL-10 (пг/мл), TNF $\alpha$  (пг/мл), IL-6 (пг/мл) определяли иммуноферментным методом с использованием наборов АО «Вектор-Бест».

Энзиматическую активность лейкоцитарной эластазы (ЛЭ) определяли ферментативным спектрофотометрическим методом с использованием специфического субстрата N-tert-бутокси-карбонил-аланин- $\beta$ -нитрофенилового эфира (BOC-Ala-ONp), и оценивали в нмоль/мин  $\times$  мл (чувствительность метода 40 нмоль/мин  $\times$  мл) [5].

Функциональную активность  $\alpha$ 1-протеазного ингибитора ( $\alpha$ 1-ПИ) определяли спектрофотометрическим методом и оценивали в ИЕ/мл (ингибиторные единицы/мл) (чувствительность метода 5 ИЕ/мл) [11].

Вычислялся также протеазно-ингибиторный индекс (ПИИ), представляющий собой соотношение активности ЛЭ к функциональной активности  $\alpha$ 1-ПИ, характеризующий направленность воспалительного процесса.

Уровень аутоантител (аАТ) к нейроантигенам S100b и основному белку миелина (ОБМ) в сыворотке крови определяли методом стандартного твердофазного иммуноферментного анализа (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ELISA) и оценивали в единицах оптической плотности (ед. опт. пл).

Выбранные иммунные показатели характеризуют состояние как клеточного, так и гуморального звена иммунитета

#### Статистическая обработка

В качестве основного подхода использовали кластерный анализ, а также метод Шапиро–Уилка и проверка однородности распределений кластеров при помощи дисперсионного анализа (ДА) в случае нормального распределения, и по методу Краскела–Уоллиса для показателей имеющих отличное от нормального распределение. Использовали уровень достоверности:  $p < 0,05$ .

Кластерный анализ [6, 15, 18] представляет собой общее название множества математических методов (порядка 100), направленных на формирование отдаленных друг от друга групп относительно близких между собой объектов по данным о расстояниях или связях (мерах близости) между ними в ситуации, когда отсутствует априорная информация относительно принадлежности объектов к группам. Важное условие корректного

использования кластерного анализа состоит в том, что переменные или признаки (в данном исследовании – иммунологические показатели) должны измеряться в сравнимых шкалах. Из-за неоднородности единиц измерения признаков становится невозможно корректно рассчитать расстояния между точками. Эта проблема решается при помощи предварительной стандартизации переменных. Наиболее распространенный способ стандартизации – вычисление Z-вклада или стандартизованного вклада по формуле 1.

$$Z_i = \frac{x_i - \bar{x}}{\sigma}, \quad (1)$$

где  $x_i$  – значение данного наблюдения;  $\bar{x}$  – среднее;  $\sigma$  – стандартное отклонение.

В данном исследовании использовали два метода кластеризации: иерархический агломеративный метод, результаты которого оформлены в виде дендограммы и итеративный алгоритм k-средних. Для оценки числа кластеров в выборке здоровых людей использовали пакет NbClust(...) из статистической программы R.

В качестве классифицирующих признаков использовали определяемые маркеры воспаления (энзиматическую активность ЛЭ, функциональную активность  $\alpha$ 1-ПИ, протеазно-ингибиторный индекс (ПИИ)), уровень аАТ к S100b и ОБМ, а также возраст обследуемых.

## Результаты и обсуждение

В таблице 1 приведены средние показатели анализируемых иммунных маркеров для группы условно здоровых людей. Принимая во внимание репрезентативность выборки ( $n = 100$ ), эти показатели, вероятно, следует рассматривать как нормативные. Вместе с тем, обращает внимание широкий разброс значений определяемых иммунных маркеров и наличие значений, выходящих за пределы нормативного диапазона (среднее  $\pm$  стандартное отклонение).

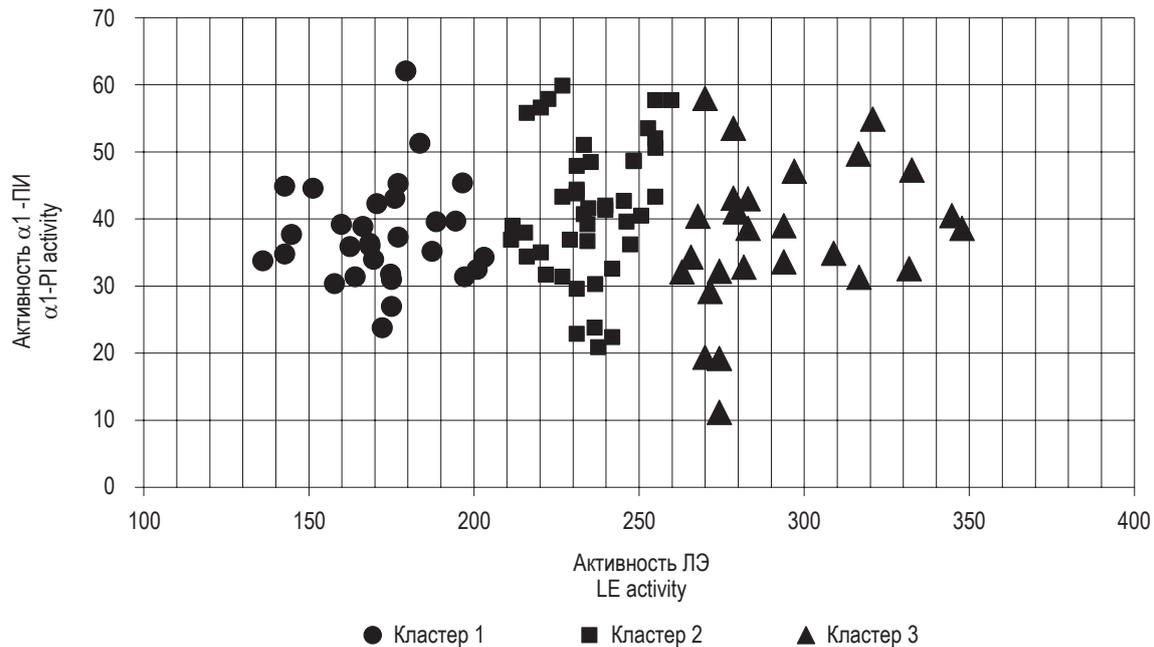
Широкий разброс полученных данных послужил основанием для проведения кластерного анализа. Возраст обследуемых был также включен в качестве кластеризующего признака в связи с тем, что этот показатель может оказывать влияние на уровень иммунных маркеров.

Поскольку экспериментальные иммунологические параметры существенно отличаются по измерительным шкалам, предварительно они были стандартизованы в соответствии с формулой 1.

#### Кластерный анализ воспалительных маркеров здоровых людей

Оценка числа кластеров при помощи пакета NbClust() показала, что наиболее вероятное число кластеров равно 3.





**Рисунок 2. Распределение кластеров в координатах активности ЛЭ и α1-ПИ**

Примечание. По оси абсцисс – активность ЛЭ в нмоль/мин\*мл, по оси ординат – функциональная активность α1-ПИ в ИЕ/мл.  
● – кластер 1, ■ – кластер 2, ▲ – кластер 3.

Figure 2. Distribution of clusters in the coordinates of LE and α1-Pi activity

Note. On the abscissa, LE activity in nmol/min\*ml; on the ordinate axis, functional activity of α1-Pi in IU/ml. ●, cluster 1; ■, cluster 2; ▲, cluster 3.

На рисунке 2 приведена диаграмма распределения полученных кластеров (1, 2 и 3) в пространстве показателей ЛЭ и α1-ПИ. Эта двумерная диаграмма, как пример, наилучшим образом отображает полученные кластеры.

Приведенные рисунки свидетельствуют, что выборка условно здоровых людей по совокупности иммунологических показателей отчетливо разделяется на три кластера (рис. 2).

В таблице 2 приведены основные статистические характеристики кластеров, результаты проверки нормальности распределений (метод Шапиро–Уилка) и проверка однородности распределений кластеров при помощи дисперсионного анализа (ДА) – в случае нормального распределения (ЛЭ, α1-ПИ и ОБМ) и по методу Краскала–Уоллиса – для показателей, имеющих отличное от нормального распределение (S100b, ПИИ, IL-10, TNFα и IL-6).

## Обсуждение

Из приведенных в таблице данных следует, что такие иммунные показатели, как активность ЛЭ, протеазно-ингибиторный индекс, уровень IL-10 и TNFα статистически значимо различаются в полученных кластерах. При этом показатели второго кластера в наибольшей степени приближены к средним показателям, определенным для общей

выборки (таблица 1), что дает основание рассматривать именно иммунные показатели этого кластера как нормативные, соответствующие «фоновому» состоянию иммунитета у здоровых людей. Этот кластер составили 43 обследованных. Отметим, что несмотря на широкий диапазон возраста в общей группе обследованных, полученные кластеры не различались по этому параметру (Kruskal–Wallis test:  $H(2, N = 100) = 2,113621$ ,  $p = 0,3476$ ), что позволяет исключить значимое влияние возраста (в рамках указанного диапазона) на определяемые иммунные показатели. Эти группы не отличались по гендерным признакам (Kruskal–Wallis test:  $H(2, N = 100) = 0,6478717$ ,  $p = 0,7233$ ). Выделенные кластеры статистически не различались также по функциональной активности α1-ПИ и по уровню аутоантител к антигенам S100b и ОБМ.

При анализе иммунологических показателей двух других кластеров (первого и третьего) можно предположить, что их совокупность отражает иммунную дисрегуляцию и наличие латентных воспалительных реакций. Основанием для такого предположения служат изменения в активности ЛЭ, дисбаланс в протеазно-ингибиторной системе, а также отклонения в уровне некоторых цитокинов.

Наиболее яркие различия полученных кластеров касаются энзиматической активности ЛЭ,

ТАБЛИЦА 2. ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛАСТЕРОВ

TABLE 2. CLUSTER CHARACTERISTICS

Показатели Parameters	Активность ЛЭ, нмоль/мин × мл LE activity, nmol/min × ml	Активность α1-ПИ, ИЕ/мл Activity of α1-PI, IU/ml	аАТ к S100b, ед. опт. пл aAB to S100b, unit of OD	аАТ к ОБМ, ед. опт. пл aAB to MBP, unit of OD	ПИИ PII	IL-10, пг/мл IL-10, pg/ml	TNFα, пг/мл TNFα, pg/ml	IL-6, пг/мл IL-6, pg/ml
<b>Кластер 1 / Cluster 1</b>								
Среднее Mean	172,06	37,70	0,79	0,82	4,73	3,51	10,47	3,97
Медиана Median	173,45	36,20	0,74	0,76	4,65	0,00	2,60	0,00
Стандартное отклонение Standard deviation	17,71	7,59	0,21	0,19	1,03	9,68	32,91	10,29
Минимум Minimum	136,00	23,80	0,40	0,45	2,89	0,00	0,00	0,00
Максимум Maximum	203,00	62,10	1,35	1,30	7,24	49,50	175,00	55,10
Количество Number (n)	30	30	30	30	30	30	30	29
<b>Кластер 2 / Cluster 2</b>								
Среднее Mean	235,31	41,57	0,77	0,79	6,05	3,27	5,65	2,44
Медиана Median	234,40	41,40	0,75	0,78	5,72	0,00	3,35	3,10
Стандартное отклонение Standard deviation	12,86	10,25	0,18	0,18	1,77	4,76	11,01	1,71
Минимум Minimum	211,20	20,90	0,40	0,40	3,79	0,00	0,00	0,00
Максимум Maximum	259,80	59,90	1,08	1,34	11,37	16,60	60,60	5,40
Количество Number (n)	43	43	43	43	43	36	36	33
<b>Кластер 3 / Cluster 3</b>								
Среднее Mean	292,55	37,73	0,71	0,76	8,67	5,69	5,80	2,13
Медиана Median	281,70	38,60	0,67	0,68	7,75	4,40	2,80	3,00
Стандартное отклонение Standard deviation	25,46	10,78	0,18	0,18	3,87	5,98	14,59	1,85
Минимум Minimum	263,00	11,20	0,45	0,51	4,66	0,00	0,00	0,00
Максимум Maximum	347,80	58,00	1,22	1,12	24,49	17,20	74,90	4,70
Количество Number (n)	27	27	27	27	27	25	26	25
Шапиро–Уилка, p Shapiro–Wilk, p	0,12	0,33	0,02	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00
ДА, p ANOVA, p	0,00	0,15		0,40				
Kruskal–Wallis_prob			0,12		0,00	0,02	0,04	0,68

являющейся маркером активации нейтрофилов, а также соотношений в протеазно-ингибиторной системе, вовлеченной в развитие воспалительных реакций. Первый и третий кластеры характеризуются разнонаправленными изменениями активности ЛЭ и протеазно-ингибиторного индекса, относительно нормативных значений, что может свидетельствовать о различных вариантах латентной воспалительной реактивности, реализующейся у пациентов, составивших эти кластеры (30 и 27 человек соответственно). Необходимо отметить, что подобные изменения активности ЛЭ, а также ПИИ различной направленности по отношению к контролю, характеризуют различные этапы течения шизофрении, аффективных психозов, нейродегенеративных заболеваний (болезнь Альцгеймера, Паркинсона, синдром мягкого когнитивного снижения и др.) [7, 8, 9], а также таких заболеваний как саркоидоз легких и хроническая сердечно-сосудистая недостаточность [2, 4].

Что касается цитокинов, их изменения не являются столь значительными для 1 и 3 кластеров по сравнению с нормативными и далеки от уровня, характерного для системных воспалительных реакций [13, 14]. Помимо этого, даже в рамках выделенных кластеров отмечается широкая вариабельность их значений. Вероятно, это связано с низким содержанием цитокинов в сыворотке крови, а также значительными методическими сложностями их определения иммуноферментными методами. Так, сыворотка крови здоровых людей может содержать гетерофильные антитела, способные перекрестно связываться с компонентами иммуноферментной системы, способствуя ложноположительным реакциям, а также ингибиторные молекулы [1].

## Заключение

Таким образом можно заключить, что обследованная в настоящей работе группа условно здоровых людей является неоднородной по уровню ряда анализируемых воспалительных маркеров. С помощью кластерного анализа она разделяется на три подгруппы (кластера), значимо различающиеся по активности ЛЭ, протеазно-ингибиторному индексу и концентрации некоторых цитокинов. Один из этих кластеров, в который входит 43% обследованных, может быть определен как оптимальный для иммунологической нормы. Иммунологические показатели этого кластера характеризуют физиологическое, «фоновое» состояние иммунитета. Совокупность иммунологических показателей двух других кластеров позволяет предположить наличие у лиц, составивших эти кластеры (30 и 27 человек соответственно), различных вариантов латентных воспалительных реакций. Эти варианты определяются разнонаправленными изменениями активности ЛЭ и ПИИ по отношению к соответствующим нормативным показателям. Результаты исследования свидетельствуют, что эти иммунные показатели, характеризующие преимущественно активацию нейтрофилов, могут являться наиболее значимыми для детекции возможных латентных воспалительных реакций.

## Благодарности

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов и выражают благодарность научному сотруднику ФГБНУ НЦПЗ И.Н. Отман за постановку иммуноферментного анализа по определению аутоантител к S-100b и ОБМ.

## Список литературы / References

1. Арсентьева Н.А., Тотолян Арег А. Методические сложности при определении содержания некоторых цитокинов в периферической крови практически здоровых лиц // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 5. С. 763-774. [Arsentieva N.A., Totolian Areg A. Methodological issues of determining concentrations of some cytokines in peripheral blood from healthy individuals. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 5, pp. 763-774. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-763-774.
2. Белова Л.А., Арабидзе Г.Г., Кухарчук В.В., Чихладзе Н.М., Огородникова О.Г., Шапкина Л.С. Активность химотрипсиноподобных протеиназ у больных ишемической болезнью сердца, артериальной гипертензией, неспецифическим аортоартериитом // Терапевтический архив, 2000. № 11. С. 36-39. [Belova L.A., Arabidze G.G., Kukharchuk V.V., Chikhladze N.M., Ogorodnikova O.G., Shapkina L.S. Activity of chymotrypsin-like proteinases in patients with ischemic heart disease, arterial hypertension, nonspecific aortoarteritis. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2000, no. 11, pp. 36-39. (In Russ.)]
3. Белова Л.А., Оглоблина О.Г., Саталкин А.А., Дюгеев А.Н., Фомин М.Д., Кашина Л.Г., Кухарчук В.В. Дисбаланс протеиназно-ингибиторной системы при акушерском сепсисе и септическом шоке // Клиническая лабораторная диагностика, 2003. № 7. С. 13-16. [Belova L.A., Ogloblin O.G., Satalkin A.A., Dugeev A.N., Fomin M.D., Kashina L.G., Kukharchuk V.V. Imbalance of the proteinase-inhibitory system in obstetric sepsis and septic shock. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2003, no. 7, pp 13-16. (In Russ.)]

4. Волель Б., Макух Е., Лебедева М., Попова Е., Шоломова В., Андросова Л., Мухин Н., Бекетов В., Бровко М., Ключник Т., Клинико-лабораторные маркеры астенического синдрома у больных саркоидозом // *Врач*, 2016. № 7. С. 74-76. [Volel B., Makukh E., Lebedeva M., Popova E., Sholomova V., Androsova L., Mukhin N., Beketov V., Brovko M., Klyushnik T. Clinical and laboratory markers of asthenic syndrome in patients with sarcoidosis. *Vrach = Doctor*, 2016, no. 7, pp. 74-76. (In Russ.)]
5. Доценко В.Л., Нешкова Е.А., Яровая Г.А. Выявление лейкоцитарной эластазы человека из комплекса с плазменным  $\alpha 1$ -протеиназным ингибитором по ее энзиматической активности с синтетическим субстратом // *Вопросы медицинской химии*, 1994. Т. 40, № 3. С. 20-25. [Dotsenko V.L., Neshkova E.A., Yarovaya G.A. Detection of leukocyte elastase from complex with plasma  $\alpha 1$ -proteinase inhibitor by its enzymatic activity with a synthetic substrate. *Voprosy meditsinskoy khimii = Problems of Medical Chemistry*, 1994, Vol. 40, no. 3, pp. 20-25. (In Russ.)]
6. Дюран Б., Оделл П. Кластерный анализ. Пер. с англ. М.: Статистика, 1977. 128 с. [Dyuran B., Odell P. Cluster Analysis]. Moscow: Statistika, 1977. 128 p.
7. Ключник Т.П., Андросова Л.В., Михайлова Н.М., Колыхалов И.В., Зозуля С.А., Дупин А.М. Системные воспалительные маркеры при возрастном когнитивном снижении и болезни Альцгеймера // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*, 2017. Т. 117, № 7. С. 74-79. [Klyushnik T.P., Androsova L.V., Mikhailova N.M., Kolykhalov I.V., Zozulya S.A., Dupin A.M. Systemic inflammatory markers in age-related cognitive decline and Alzheimer's disease. *Zhurnal nevrologii i psikhiatrii im. S.S. Korsakova = S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2017, Vol. 117, no. 7, pp. 74-79. (In Russ.)]
8. Ключник Т.П., Андросова Л.В., Зозуля С.А., Отман И.Н., Никитина В.Б., Ветлугина Т.П. Сравнительный анализ воспалительных маркеров при эндогенных и непсихотических психических расстройствах // *Сибирский вестник психиатрии и наркологии*, 2018. Т. 2, № 99. С. 64-69. [Klyushnik T.P., Androsova L.V., Zozulya S.A., Otman I.N., Nikitina V.B., Vetlugina T.P. Comparative analysis of inflammatory markers in endogenous and non-psychotic mental disorders. *Sibirskiy vestnik psikhiatrii i narkologii = Siberian Bulletin of Psychiatry and Narcology*, 2018, Vol. 2, no. 99, pp. 64-69. (In Russ.)]
9. Ключник Т.П., Симонов А.Н., Андросова Л.В., Пономарева Н.В., Иллариошкин С.Н. Кластерный анализ иммунологических показателей сыворотки крови пациентов с болезнью Паркинсона // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*, 2019. Т. 13, № 3. С. 5-10. [Klyushnik T.P., Simonov A.N., Androsova L.V., Ponomareva N.V., Illarioshkin S.N. Cluster analysis of immunological serum markers in patients with Parkinson's disease. *Annaly klinicheskoy i eksperimentalnoy nevrologii = Annals of Clinical and Experimental Neurology*, 2019, Vol. 13, no. 3, pp. 5-10. (In Russ.)]
10. Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунология образраспознающих рецепторов (Интегральная иммунология). М.: Либроком, 2009. 256 с. [Lebedev K.A., Ponyakina I.D. Immunology of the image recognition receptors (Integral immunology)]. Moscow: Librokom, 2009. 256 p.
11. Нартикова В.Ф., Пасхина Т.С. Унифицированный метод определения активности альфа-1-антитрипсина и альфа-2-макроглобулина в сыворотке (плазме) крови человека // *Вопросы медицинской химии*, 1979. Т. 25, № 4. С. 494-499. [Nartikova V.F., Pashkina T.S. A unified method for determining the alpha-1-antitrypsin and alpha-2-macroglobulin activity in human blood serum (plasma). *Voprosy meditsinskoy khimii = Problems of Medical Chemistry*, 1979, Vol. 25, no. 4, pp. 494-499. (In Russ.)]
12. Парамонова Н.С., Гурина Л.Н., Волкова О.А., Карчевский А.А., Синица Л.Н. Состояние эластаза-ингибиторной системы у детей в норме и при отдельных патологических состояниях: монография. Под ред. Н.С. Парамоновой. Гродно: ГРГМУ, 2017. 132 с. [Paramonova N.S., Gurina L.N., Volkova O.A., Karchevsky A.A., Sinitza L.N. The state of the elastase-inhibitory system in children is normal and in certain pathological conditions: Monograph. Ed. N.S. Paramonova.] Grodno: State Medical University, 2017. 132 p.
13. Поташнев М.П. Иммунные механизмы стерильного воспаления // *Иммунология*, 2015. Т. 36, № 5. С. 312-318. [Potapnev M.P. Immune mechanisms of sterile inflammation. *Immunologiya = Immunologiya*, 2015, Vol. 36, no. 5, pp. 312-318. (In Russ.)]
14. Симбирцев А.С., Тотолян А.А. Цитокины в лабораторной диагностике // *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*, 2015. № 2. С. 82-98. [Simbirtsev A.S., Totolyan A.A. Cytokines in laboratory diagnostics. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie = Infectious Diseases: News, Opinions, Education*, 2015, no. 2, pp. 82-98. (In Russ.)]
15. Azzalini A., Menardi G. Clustering via nonparametric density estimation: the R package pdfCluster. *Journal of statistical software, Foundation For Open Access Statistics*, 2014, Vol. 57, Iss. 11. Available at: <http://hdl.handle.net/10.18637/jss.v057.i11>.
16. Deng X., Yang G., Zheng X., Yang Y., Qin H., Liu Z.X., Deng H., Liu S.M. Plasma mtDNA copy numbers are associated with GSTK1 expression and inflammation in type 2 diabetes. *Diabet. Med.*, 2020, Vol. 37, no. 11, pp. 1874-1878.
17. Guzzardi M.A., Iozzo P. Fatty heart, cardiac damage, and inflammation. *Rev. Diabet. Stud.*, 2011, Vol. 8, no. 3, pp. 403-417.

18. Matioli L.C., Santos S.R., Kleina M., Leite E.A. A new algorithm for clustering based on kernel density estimation. *J. Appl. Stat.*, 2018, Vol. 45, no. 2, pp. 347-366.

19. Seong S-Y., Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 4, no. 6, pp. 469-478.

20. Singh N., Baby D., Rajguru J.P., Patil P.B., Thakkannavar S.S., Pujari V.B. Inflammation and cancer. *Ann. Afr. Med.*, 2019, Vol. 18, no. 3, pp. 121-126.

---

**Авторы:**

**Андросова Л.В.** — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

**Симонов А.Н.** — к.б.н., руководитель лаборатории доказательной медицины и биostatистики ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

**Пономарева Н.В.** — д.м.н., руководитель лаборатории возрастной физиологии мозга и нейрокибернетики, отдел исследований мозга ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия

**Клюшник Т.П.** — д.м.н., профессор, руководитель лаборатории нейроиммунологии, директор ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

**Authors:**

**Androsova L.V.**, PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Neuroimmunology, Mental Health Research Center, Moscow, Russian Federation

**Simonov A.N.**, PhD (Biology), Head, Laboratory of Evidence-based Medicine and Biostatistics, Mental Health Research Center, Moscow, Russian Federation

**Ponomareva N.V.**, PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Age-related Brain Physiology and Neurocybernetics, Brain Research Department, Research Center of Neurology, Moscow, Russian Federation

**Klyushnik T.P.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Neuroimmunology, Director, Mental Health Research Center, Moscow, Russian Federation

---

Поступила 23.09.2020  
Принята к печати 09.01.2021

Received 23.09.2020  
Accepted 09.01.2021

## **ИНФОРМАТИВНОСТЬ СЫВОРОТОЧНЫХ ЦИТОКИНОВ И ИХ ЗНАЧЕНИЕ В ФОРМИРОВАНИИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ В ПОЖИЛОМ ВОЗРАСТЕ**

**Агарков Н.М.<sup>1,2</sup>, Коломиец В.И.<sup>3</sup>, Корнеева С.И.<sup>3</sup>, Москалева Е.О.<sup>2</sup>,  
Макконен К.Ф.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», г. Курск, Россия

<sup>2</sup> ФГАУО ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», г. Курск, Россия

**Резюме.** Одной из основных проблем общественного здравоохранения во всем мире является метаболический синдром (МС), приводящий к значительным трудопотерям, увеличению расходов на лечение и реабилитацию больных. Цель исследования – выявление информативных сывороточных интерлейкинов на основе определения показателей отношения шансов у больных пожилого возраста с МС и АГ. Обследовано в клинических условиях 86 больных МС и АГ в возрасте 60-75 лет (основная группа). Критериями включения являлись: возраст 60-75 лет, наличие МС, первичная АГ – II-III степени, отсутствие острого инфаркта миокарда, злокачественных новообразований, нарушений мозгового кровообращения, почечной недостаточности за последние 6 месяцев. Диагностика МС и АГ проводилась в соответствии с Рекомендациями экспертов Всероссийского научного общества кардиологов по диагностике и лечению МС. Впервые проведенное нами исследование большого спектра сывороточных интерлейкинов у пациентов пожилого возраста с МС и АГ позволило установить изменения противоположной направленности в содержании провоспалительных и противовоспалительных цитокинов. Сочетание АГ с МС у пожилых сопровождается существенным повышением большинства провоспалительных интерлейкинов и, напротив, достоверным снижением продукции противовоспалительных цитокинов. Это однозначно указывает, что в иницировании МС с АГ в пожилом возрасте важное значение имеют иммунологические регуляторные системы. Провоспалительные и противовоспалительные сывороточные интерлейкины активно вовлечены в развитие МС с АГ в пожилом возрасте и сопровождаются выраженным дисбалансом. Указанные иммунологические реакции могут являться первопричинной МС в сочетании с АГ. Высокий риск развития данной патологии связан как с изменением продукции провоспалительных (IL-8, IL-1 $\beta$ ), так и провоспалительных (IL-4, IL-10) интерлейкинов сыворотки крови с преобладанием патологического вклада первых. Перечисленные интерлейкины следует считать ведущими диагностическими маркерами МС с АГ у

### **Адрес для переписки:**

Агарков Николай Михайлович  
ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный  
университет»  
305040, Россия, г. Курск, ул. 50 лет Октября, 94.  
Тел.: 8 (910) 740-96-13.  
E-mail: vitalaxen@mail.ru

### **Address for correspondence:**

Agarkov Nikolai M.  
Southwestern State University  
300540, Russian Federation, Kursk, 50 let Oktyabrya str., 94.  
Phone: 7 (910) 740-96-13.  
E-mail: vitalaxen@mail.ru

### **Образец цитирования:**

Н.М. Агарков, В.И. Коломиец, С.И. Корнеева, Е.О. Москалева, К.Ф. Макконен «Информативность сывороточных цитокинов и их значение в формировании метаболического синдрома с артериальной гипертензией в пожилом возрасте» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 2. С. 303-310. doi: 10.15789/1563-0625-ISO-2146

© Агарков Н.М. и соавт., 2021

### **For citation:**

N.M. Agarkov, V.I. Kolomiets, S.I. Korneeva, E.O. Moskaeva, K.F. Makkonen “Informative significance of serum cytokines and their importance for development of metabolic syndrome with arterial hypertension in elderly persons”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 2, pp. 303-310. doi: 10.15789/1563-0625-ISO-2146

DOI: 10.15789/1563-0625-ISO-2146

пожилых. Использование сывороточных интерлейкинов и дискриминантного метода позволяет с высокой безошибочной вероятностью классифицировать пожилых больных с МС и АГ от аналогичного возраста пациентов без этой патологии.

*Ключевые слова:* сывороточные интерлейкины, метаболический синдром, артериальная гипертензия, пожилые

## INFORMATIVE SIGNIFICANCE OF SERUM CYTOKINES AND THEIR IMPORTANCE FOR DEVELOPMENT OF METABOLIC SYNDROME WITH ARTERIAL HYPERTENSION IN ELDERLY PERSONS

Agarkov N.M.<sup>a, b</sup>, Kolomiets V.I.<sup>c</sup>, Korneeva S.I.<sup>c</sup>, Moskaleva E.O.<sup>b</sup>, Makkonen K.F.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Southwestern State University, Kursk, Russian Federation

<sup>b</sup> Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation

<sup>c</sup> Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation

**Abstract.** Metabolic syndrome (MS) is among the main public health challenges worldwide, leading to significant labor losses, increased costs for treatment and rehabilitation of the patients. The aim of the present study was to identify the informative serum interleukins, by determining the odds ratio in elderly patients with MS and hypertension. The main group of 86 patients with MS and arterial hypertension (AH) aged 60-75 years was examined under clinical conditions. The inclusion criteria were as follows: age of 60-75 years, presence of MS, primary hypertension (grade II-III), absence of acute myocardial infarction, malignant neoplasms, disorders of cerebral circulation, kidney failure over last 6 months. Diagnostics of MS and hypertension was carried out in accordance with Expert Guidelines from the Russian Research Society of Cardiology on the MS Diagnosis and Treatment. Our first study of a large range of serum interleukins in elderly patients with MS and hypertension allowed us to reveal the inversely directed changes in pro- and anti-inflammatory cytokine contents. Combined AH/MS in elderly persons is accomplished by sufficient increase of the most proinflammatory cytokines, and *vice versa*, by significant decrease in anti-inflammatory cytokines in blood serum. This finding clearly points to importance of immunological regulatory systems for initiation of AH with MS at older age. Pro- and anti-inflammatory serum interleukins are actively involved into the AH/MS development in elderly accompanied by their pronounced imbalance. The mentioned immune reactions could underlie the MS/AH condition. High risk of this disorder is connected with changed production of proinflammatory cytokines (IL-8, IL-1 $\beta$ ), like as anti-inflammatory serum interleukins (IL-4, IL-10), with predominance of the former. The above interleukins should be considered dominant diagnostic markers of AH/MS in elderly persons. Measurement of serum interleukins and discriminant-based approach allows highly reliable differentiation of elderly patients with AH/MS from similar individuals without this disorder.

*Keywords:* serum interleukins, metabolic syndrome, hypertension, elderly

### Введение

Высокая распространенность метаболического синдрома (МС) доминирует в старших возрастных группах и сопровождается существенными затратами государства на лечение данных больных как в амбулаторных, так и стационарных учреждениях из-за взаимного влияния сочетанной патологии и полиморбидности [14].

Проведенные к настоящему времени клинические и эпидемиологические исследования по проблеме МС свидетельствуют о том, что рассматриваемая патология является возрастассоциированной и неуклонно повышается ее распространенность по мере старения населения, происходящего, прежде всего, в индустриальных странах [13]. Среди взрослого населения частота

МС в среднем составляет 24% и характеризуется достоверными гендерными различиями, показывающими превышение в 2,4 раза распространенность среди женщин [13].

Старение населения и нарушение деятельности органов и систем сопровождаются постепенным ростом частоты МС в возрастных группах мужчин и женщин от 50 лет и старше. Среди последних у каждого пятого человека в соответствии с общепринятыми критериями диагностируется МС. В группе пожилого населения уровень МС соответствует экстремуму [3], и негативная тенденция наблюдается и в последующих возрастных категориях — старческом возрасте и у долгожителей. Из-за выраженности нарушений со стороны сердечно-сосудистой и эндокринной систем МС у представителей пожилого и старческого возраста протекает с развитием серьезных и частых фатальных осложнений [14].

Показано, что прогрессирование сердечно-сосудистой патологии происходит при участии системных цитокинов [12]. Нарушения иммунорегуляторных процессов, сопровождающихся гиперэкспрессией провоспалительных цитокинов и подавлением синтеза противовоспалительных, вызывают дестабилизацию воспалительных реакций в сердечно-сосудистой системе [12]. В связи с этим считается, что увеличение продукции провоспалительных цитокинов и, прежде всего, интерлейкина 6 (IL-6), интерлейкина 1 (IL-1) и фактора некроза опухоли  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), обуславливают не только ведущие звенья патогенеза сердечно-сосудистой патологии, но и позволяют прогнозировать динамику заболевания, включая развитие различных осложнений.

Однако, несмотря на это, при изучении иммунологических аспектов МС с артериальной гипертензией (АГ) у пациентов 60-74 года не уделяется должного внимания исследованию провоспалительных цитокинов крови и их роли в инициировании обсуждаемой патологии. Происходящие изменения в продукции системных противовоспалительных цитокинов у пожилых пациентов с МС и АГ остаются неизвестными. Для объективной оценки дисбаланса системного цитокинового статуса у пациентов 60-74 года с сочетанным МС и АГ редко применяются математические критерии и выделение приоритетных для диагностики интерлейкинов осуществляется субъективно, что снижает научную и практическую значимость таких результатов.

**Цель исследования** — выявление информативных сывороточных интерлейкинов на основе определения показателей отношения шансов у больных пожилого возраста с МС и АГ.

## Материалы и методы

Исследование проводилось в стационарных условиях у 86 пожилых пациентов с верифицированным диагнозом МС и АГ, составивших основную группу. Выявление данных заболеваний выполнялось с учетом критериев, изложенных в Рекомендациях экспертов Всероссийского научного общества кардиологов [5]. При постановке диагноза МС учитывались также критерии Международной Диабетической Федерации [6], среди которых ведущим считалось наличие центрального ожирения. Дополнительно учитывались два из 4 нижеуказанных патологических нарушений: гипергликемия в плазме натощак или обнаруженный ранее сахарный диабет 2-го типа, артериальная гипертензия, уменьшение в крови уровня липопротеидов высокой плотности, высокое содержание триглицеридов. Критериями включения в основную группу пациентов служили: пожилой возраст, наличие МС, первичная АГ II-III степени, отсутствие на момент обследования и в прошедшие полгода мозгового инсульта, злокачественных опухолей, острого инфаркта миокарда, почечной недостаточности.

Контрольная группа представлена 35 лицами аналогичного возраста и пола, не имеющих АГ и МС.

Сравниваемые группы не имели достоверных различий по среднему возрасту — в основной группе он составил  $69,3 \pm 2,7$  лет, а в контроле —  $68,9 \pm 3,5$  лет ( $p > 0,05$ ).

Среди сопутствующей патологии в основной и контрольной группах часто регистрировались остеоартроз и остеоартрит (18,2 и 8,4%), хронический пиелонефрит (13,5 и 6,0%) и тромбозы нижних конечностей (17,6 и 18,0%).

Определение цитокинов в сыворотке крови осуществляли посредством иммуноферментного метода и набора «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург).

Среди широкого спектра изученных цитокинов выполнялось выделение диагностически значимых по формуле расчета отношения шансов (ОШ):  $ОШ = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  — анализируемый параметр имеется в основной группе пациентов,  $b$  — этот параметр отсутствует в основной группе,  $c$  — анализируемый цитокин выявлен в контрольной группе,  $d$  — анализируемый цитокин отсутствует в контрольной группе [7].

Достоверность рассчитанных показателей ОШ для исследованных цитокинов проверялись на основе полученных доверительных интервалов. При этом достоверно значимые интерлейкины крови использовались в качестве информативных иммунологических показателей для

верификации МС, сочетанного с АГ, а недосто-  
верные ОШ не рассматривались.

При статистической обработке полученных  
результатов применялся статистический при-  
кладной пакет Statistica 6.0 и непараметрический  
критерий Вилкоксона.

При классификации больных МС и АГ пожи-  
лого возраста и больных аналогичного возраста  
без МС и АГ использовался дискриминантный  
анализ, предусматривающий статистические ме-  
тоды классификации различных совокупностей  
при наличии обучающих выборок по исследо-  
ванным сывороточным интерлейкинам. Выпол-  
нение процедуры классификации больных ос-  
новной и контрольной групп осуществлялось в  
соответствии с рекомендациями Айвазяна С.А.  
и др. [7].

Пациенты с МС и АГ относились ко второму  
классу (G<sub>2</sub>:1), а больные пожилого возраста без

указанной выше патологии – к первому классу  
(G<sub>1</sub>:0). Качество классификации рассматривае-  
мых групп оценивалось по расстоянию Махала-  
нобиса.

## Результаты и обсуждение

Изменения провоспалительных интерлейки-  
нов в крови у пациентов пожилого возраста с на-  
личием МС и АГ характеризуются однонаправ-  
ленностью (табл. 1). Наибольшие отклонения в  
основной группе по отношению к контрольной  
выявлены для сывороточного IL-8, продукция  
которого повысилась почти в 10 раз (p < 0,001).  
Среди других провоспалительных интерлейки-  
нов у больных с анализируемой патологией до-  
стоверно возросло содержание IL-1β. Развитие  
МС с АГ в пожилом возрасте, наряду с вышеу-  
казанными нарушениями системного цитоки-  
нового профиля, сопровождалось статистически

**ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ В ОСНОВНОЙ И КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППАХ (M±m)**

TABLE 1. SERUM INTERLEUKIN CONTENT IN THE MAIN AND CONTROL GROUPS (M±m)

Название интерлейкина, единица измерения Interleukin name, unit of measurement	Больные с МС и АГ в возраст 60-75 лет Patients with MS and hypertension aged 60-75 years	Лица без МС и АГ 60- 75 лет Persons without MS and hypertension 60-75 years old	p
IL-1β, пг/мл IL-1β, pg/ml	72,4±2,8	10,3±1,2	< 0,001
IL-2, пг/мл IL-2, pg/ml	64,7±2,4	15,8±1,9	< 0,001
IL-6, пг/мл IL-6, pg/ml	204,5±3,6	63,7±3,3	< 0,001
IL-8, пг/мл IL-8, pg/ml	49,6±3,1	5,0±1,6	< 0,001
TNFα, пг/мл TNFα, pg/ml	14,8±1,3	6,8±1,7	< 0,001
Интерферон-γ, пг/мл Interferon-γ, pg/ml	28,2±1,5	13,4±1,1	< 0,001
Интерферон-α, пг/мл Interferon-α, pg/ml	17,5±1,2	26,9±1,2	< 0,001
IL-4, пг/мл IL-4, pg/ml	1,1±0,1	4,4±0,3	< 0,001
IL-10, пг/мл IL-10, pg/ml	5,2±0,3	19,5±1,2	< 0,001
IL-18, пг/мл IL-18, pg/ml	76,7±4,2	76,7±4,2	< 0,001

значимым подъемом IL-2 и IL-6. Уровень TNF $\alpha$  и интерферона- $\alpha$  повысились практически в равной степени существенно по сравнению с лицами контрольной группы ( $p < 0,001$ ). Напротив, среди пациентов пожилого возраста с МС в сочетании с АГ наблюдалось достоверное снижение концентрации противовоспалительных цитокинов – IL-4 и IL-10. Кроме того, установлено снижение IL-18 интерферона- $\alpha$  в сыворотке крови 60-74 лет с наличием МС с АГ ( $p < 0,001$ ).

В ранее выполненном исследовании цитокинового профиля крови у больных старческого возраста АГ и сахарным диабетом установлено повышение IL-6 по сравнению с больными с изолированной АГ [8]. Концентрация IL-6 у пациентов с АГ достоверно выше, чем у здоровых лиц, и в среднем составляет  $5,8 \pm 0,6$  пг/мл и  $1,3 \pm 0,08$  пг/мл [9]. Аналогично изменилось и содержание IL-18 с достоверным подъемом при АГ и сахарном диабете против больных изолированной АГ [8]. У пожилых женщин с АГ и диабетом наблюдается изменение соотношения IL-10 и IL-17 в сыворотке крови [11].

В отличие от выявленных нами значительных отклонений в содержании системных цитокинов у пожилых больных МС с АГ, при изолированной АГ содержание IL-4, IL-10, IL-6 и TNF $\alpha$  другими исследователями не обнаружено [10]. Однако содержание провоспалительных цитокинов (TNF $\alpha$  и IL-6) существенно возросло у пациентов с АГ I и II степени с гипертрофией левого желудочка, а также у больных с АГ I и II степени с гипертрофией левого желудочка и развившимся лимфоцитозом ( $p < 0,05$ ). При данных патологических состояниях содержание IL-1 не изменилось и соответствовало референсному уровню [12]. Однако в названных группах пациентов изменения противовоспалительных цитокинов – IL-4 и IL-10 – неоднозначны. Так, содержание IL-4 не выходило за пределы референсных значений, тогда как уровень IL-10 снизился у больных с АГ I-II степени с гипертрофией левого желудочка [13].

Считается, что степень дисбаланса между провоспалительными и противовоспалительными цитокинами в значительной степени определяет тяжесть АГ [4]. У больных с рефрактерной АГ в сравнении с пациентами с контролируемой АГ выявлено достоверное увеличение IL-6, TNF $\alpha$  и снижение интерферона- $\gamma$  [2].

Впервые проведенное нами исследование большого спектра сывороточных интерлейкинов у пациентов пожилого возраста с МС и АГ позволило установить противоположной направленности изменения в содержании провоспалительных

и противовоспалительных цитокинов. Сочетание АГ с МС у пожилых сопровождается существенным повышением большинства провоспалительных интерлейкинов и, напротив, достоверным снижением продукции противовоспалительных цитокинов. Это однозначно указывает, что в иницировании МС с АГ в пожилом возрасте важное значение имеют иммунологические регуляторные системы. Гиперэкспрессия провоспалительных цитокинов при изолированной АГ потенцирует прогрессирование нарушений сосудистого тонуса [1]. Полученные нами результаты и значения ОШ для изученных интерлейкинов крови у больных пожилого возраста с МС и АГ свидетельствуют о высоком потенциальном риске IL-8 в развитии обсуждаемой патологии с достоверным доверительным интервалом (табл. 2). Величины ОШ других системных цитокинов (IL-18, TNF $\alpha$ , интерферона- $\gamma$ ) существенно ниже аналогичного параметра, выявленного для IL-8. Высокие величины ОШ свойственны также IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, что указывает на их значимую роль в развитии МС с АГ у пожилых пациентов. Важным результатом выполненной оценки информативности системных цитокинов следует считать, что высокий риск формирования МС в сочетании с АГ связан как с провоспалительными (IL-8, IL-1 $\beta$ ), так и противовоспалительными (IL-4, IL-10) интерлейкинами.

Величина относительного риска других сывороточных интерлейкинов в развитии МС с АГ в пожилом возрасте существенно ниже.

Классификация пациентов основной и контрольной групп, проведенная посредством дискриминантного метода по интерлейкинам сыворотки крови, свидетельствует о хорошем качестве классификации (табл. 3). Процент ошибочно классифицированных представителей первого класса (пожилые без МС и АГ) и отнесенных их во второй класс (пожилые с МС и АГ) составляет 8,7%. Ошибочно отнесены к первому классу в 8,2% случаев пациенты второго класса при выполнении процедуры классификации по сывороточным цитокинам.

Это высокий процент безошибочной классификации изучаемых групп больных по показателям сывороточных интерлейкинов. Полученные результаты дискриминантного анализа показывают, что по содержанию интерлейкинов в крови с высокой безошибочной вероятностью можно классифицировать пожилых больных с МС и АГ от больных аналогичного возраста без данной патологии. Только интерферон- $\gamma$  дает ошибочную классификацию сравниваемых групп и не может использоваться в клинической практике.

**ТАБЛИЦА 2. ОТНОШЕНИЕ ШАНСОВ ДЛЯ СЫВОРОТОЧНЫХ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ В ДИАГНОСТИКЕ МС С АГ У ПОЖИЛЫХ**  
TABLE 2. ODDS RATIO FOR SERUM INTERLEUKINS IN THE DIAGNOSIS OF MS WITH HYPERTENSION IN THE ELDERLY

Название интерлейкина, единица измерения Interleukin name, unit of measurement	Отношение шансов Odds ratio	Доверительный интервал Confidence interval	p
<b>IL-1<math>\beta</math></b> , пг/мл IL-1 $\beta$ , pg/ml	4,965	4,327-5,485	< 0,0001
<b>IL-2</b> , пг/мл IL-2, pg/ml	2,754	2,544-3,286	< 0,0003
<b>IL-6</b> , пг/мл IL-6, pg/ml	2,082	1,821-2,548	< 0,0028
<b>IL-8</b> , пг/мл IL-8, pg/ml	7,281	6,864-7,8250	< 0,0001
<b>TNF<math>\alpha</math></b> , пг/мл TNF $\alpha$ , pg/ml	1,828	1,541-2,347	< 0,0064
<b>Интерферон-<math>\gamma</math></b> , пг/мл Interferon- $\gamma$ , pg/ml	1,603	1,286-1,825	< 0,0032
<b>Интерферон-<math>\alpha</math></b> , пг/мл Interferon- $\alpha$ , pg/ml	1,765	1,315-1,942	< 0,0054
<b>IL-4</b> , пг/мл IL-4, pg/ml	4,287	4,012-4,645	< 0,0001
<b>IL-10</b> , пг/мл IL-10, pg/ml	3,642	3,104-3,948	< 0,0001
<b>IL-18</b> , пг/мл IL-18, pg/ml	1,856	1,613-2,285	< 0,0068

**ТАБЛИЦА 3. РАССТОЯНИЕ МАХАЛАНОВИСА МЕЖДУ ИССЛЕДОВАННЫМИ ГРУППАМИ БОЛЬНЫХ ПО СЫВОРОТОЧНЫМ ИНТЕРЛЕЙКИНАМ**

TABLE 3. MAHALANOBIS DISTANCE BETWEEN THE STUDIED GROUPS OF PATIENTS BY SERUM INTERLEUKINS

Интерлейкин крови Blood interleukin	Код признака Attribute code	Исследуемый признак Observed	G_1:0	G_2:1
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	1	G_1:0	3,8760	4,2513
<b>IL-2</b>	2	G_1:0	4,5824	3,8540
<b>IL-6</b>	3	G_1:0	2,1264	2,5613
<b>IL-8</b>	4	G_1:0	1,2092	1,3184
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	5	G_1:0	0,8706	0,7522
<b>Интерферон-<math>\gamma</math></b> Interferon- $\gamma$	6*	G_2:1	3,2845	4,1085
<b>Интерферон-<math>\alpha</math></b> Interferon- $\alpha$	7	G_2:1	4,6724	4,0513
<b>IL-4</b>	8	G_2:1	6,9857	2,3548
<b>IL-10</b>	9	G_2:1	5,0862	0,9854
<b>IL-18</b>	10	G_2:1	7,9413	0,6578

Примечание. \* – признак, по которому ошибочно классифицированы группы больных.

Note. \*, a sign by which groups of patients are mistakenly classified.

## Заключение

Провоспалительные и противовоспалительные сывороточные интерлейкины активно вовлечены в развитие МС с АГ в пожилом возрасте и сопровождаются выраженным дисбалансом. Выявленные нарушения иммунологических реакций могут являться первопричинной МС в сочетании с АГ. Высокий риск развития данной обусловлен как изменением продукции провоспалительных (IL-8, IL-1 $\beta$ ), так и противовоспали-

тельных (IL-4, IL-10) интерлейкинов сыворотки крови с преобладанием патологического вклада первых. Перечисленные интерлейкины следует считать ведущими диагностическими [3] маркерами МС с АГ у пожилых. Использование сывороточных интерлейкинов и дискриминантного метода позволяет с высокой безошибочной вероятностью классифицировать пожилых больных с МС и АГ от аналогичного возраста пациентов без этой патологии.

## Список литературы / References

1. Адаменко Г.П., Головки Е.С., Скребло Е.И., Тихон Т.В. Маркеры внутрисосудистого воспаления и профиль цитокинов при артериальной гипертензии // Проблемы здоровья и экологии, 2014. Т. 40, № 2. С. 40-44. [Adamenko G.P., Golovko E.S., Skrebo E.I., Tikhon T.V. Markers of intravascular inflammation and cytokine profile in hypertension. *Problemi zdoroviya i ekologii = Health and Environmental Problems*, 2014, Vol. 40, no. 2, pp. 40-44. (In Russ.)]
2. Адаменко Г.П., Скребло Е.И., Головки Е.С., Тихон Т.В. Взаимосвязь лабораторных показателей гемостазиологического статуса, маркеров цитокинов с лимфоцитозом периферической крови при артериальной гипертензии с гипертрофией миокарда левого желудка // Кардиология в Беларуси, 2015. Т. 6, № 43. С. 73-83. [Adamenko G.P., Skrebo E.I., Golovko E.S., Tikhon T.V. Correlation of laboratory parameters of hemostatic status, cytokine markers with peripheral blood lymphocytosis in arterial hypertension with left stomach myocardial hypertrophy. *Kardiologiya v Belarusi = Cardiology in Belarus*, 2015, Vol. 6, no. 43, pp. 73-83. (In Russ.)]
3. Айвазян С.А., Енюков И.С., Мешалкин Л.Д. Прикладная статистика: основы моделирования и первичная обработка данных. М.: Финансы и статистика, 1983. 471 с. [Ayvazyan S.A., Enyukov I.S., Meshalkin L.D. Applied statistics: Fundamentals of modeling and primary data processing]. Moscow: Finance and Statistics, 1983. 471 p.
4. Бочарова К.А. Изучение вклада гиперэкспрессии провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в патогенез артериальной гипертензии // Научные ведомости Белгородского государственного университета, 2011. Т. 117, № 22. С. 33-36. [Bocharova K.A. Study of the contribution of overexpression of proinflammatory and antiinflammatory cytokines to the pathogenesis of hypertension. *Nauchnie vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta = Scientific Bulletin of Belgorod State University*, 2011, Vol. 117, no. 22, pp. 33-36. (In Russ.)]
5. Вострикова Н.В., Федоров Д.В., Климова Е.Е., Бишевский К.М. Прогностическая значимость маркеров воспаления (с-реактивный белок и интерлейкин-6) при артериальной гипертензии // Бюллетень медицинской науки, 2019. Т. 13, № 1. С. 44-46. [Vostrikova N.V., Fedorov D.V., Klimova E.E., Bishevsky K.M. Prognostic significance of inflammatory markers (c-reactive protein and interleukin-6) in arterial hypertension. *Bulleten meditsinskoj nauki = Bulletin of Medical Science*, 2019, Vol. 13, no. 1, pp. 44-46. (In Russ.)]
6. Драгунов Д.О., Соколова А.В., Артутюнов Г.П. и др. Взаимосвязь уровня ИЛ-18, ИЛ-6 и уровня потребления натрия у пациентов с гипертонической болезнью и сахарным диабетом // Кардиология, 2017. Т. 57, № S1. С. 335-339. [Dragunov D.O., Sokolova A.V., Artutyunov G.P. et al. Relationship of IL-18, IL-6 level and sodium intake level in patients with hypertension and diabetes mellitus. *Kardiologiya = Cardiology*, 2017, Vol. 57, no. S1, pp. 335-339. (In Russ.)]
7. Красильников А.В., Азин А.Л. Метаболический синдром: патогенез и гериатрические аспекты проблемы // Практическая медицина, 2011. Т. 54, № 6. С. 31-35. [Krasilnikov A.V., Azin A.L. Metabolic syndrome: pathogenesis and geriatric aspects of the problem. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2011, Vol. 54, no. 6, pp. 31-35. (In Russ.)]
8. Международная федерация диабета (IDF): Консенсус по критериям метаболического синдрома // Ожирение и метаболизм, 2005. № 3. С. 47-49. [International diabetes Federation (IDF): consensus on metabolic syndrome criteria. *Ozhireniye i metabolizm = Obesity and Metabolism*, 2005, no. 3, pp. 47-49. (In Russ.)]
9. Рекомендации экспертов всероссийского научного общества кардиологов по диагностике и лечению метаболического синдрома. Второй пересмотр // Практическая медицина, 2010. Т. 44, № 5. С. 81-101. [Recommendations of experts of the all-Russian scientific society of cardiologists on the diagnosis and treatment of metabolic syndrome. Second revision. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2010, Vol. 44, no. 5, pp. 81-101. (In Russ.)]
10. Рыжак Г.А., Желтышева Ж.А. Особенности метаболического синдрома у женщин пожилого возраста с ишемической болезнью сердца и артериальной гипертензией // Успехи геронтологии, 2012. Т. 25, № 1.

С. 48-50. [Ryzhak G.A., Zheltysheva Z.A. Features of metabolic syndrome in elderly women with coronary heart disease and arterial hypertension. *Uspekhi gerontologii = Advances of Gerontology*, 2012, Vol. 25, no. 1, pp. 48-50. (In Russ.)]

11. Сафроненко А.В., Макляков Ю.С., Сухорукова Н.В., Криштопа А.В. Комплексный подход к фармакотерапии рефрактерной артериальной гипертензии // Журнал фундаментальной медицины и биологии, 2014. № 4. С. 10-14. [Safronenko A.V., Maklyakov Yu.S., Sukhorukova N.V., Krishtopa A.V. Complex approach to pharmacotherapy of refractory arterial hypertension. *Zhurnal fundamentalnoy meditsiny i biologii = Journal of Fundamental Medicine and Biology*, 2014, no. 3, pp. 10-14. (In Russ.)]

12. Сергеева В.В., Родионова А.Ю., Михайлов А.А., Бобылева Т.А., Паценко М.Б., Лиферов Р.А. Принципы антигипертензивной терапии при метаболическом синдроме // Клиническая медицина, 2013. Т. 91, № 6. С. 91. [Sergeeva V.V., Rodionova A.Yu., Mikhailov A.A., Bobileva T.A., Patsenko M.B., Liferov R.A. Principles of antihypertensive therapy in metabolic syndrome. *Klinicheskaya meditsina = Clinical Medicine*, 2013, Vol. 91, no. 6, pp. 91. (In Russ.)]

13. Ribeiro I.S., Pereira Í.S., Santos D.P., Association between body composition and inflammation: a central role of IL-17 and IL-10 in diabetic and hypertensive elderly women. *Exp. Gerontol.*, 2019, Vol. 127, pp. 110734.

14. Rodriguez-Iturbe B., Pons H., Johnson R.J. Role of the immune system in hypertension. *Physiol. Rev.*, 2017, Vol. 97, no. 3, pp. 1127-1164.

---

**Авторы:**

**Агарков Н.М.** — д.м.н., профессор кафедры биомедицинской инженерии ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», г. Курск; старший научный сотрудник лаборатории «Проблемы старения» ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Россия

**Коломиец В.И.** — клинический ординатор кафедры терапии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», г. Курск, Россия

**Корнеева С.И.** — к.м.н., доцент кафедры терапии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», г. Курск, Россия

**Москалева Е.О.** — ординатор ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Россия

**Макконен К.Ф.** — д.м.н., профессор кафедры факультетской терапии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Россия

---

**Authors:**

**Agarkov N.M.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Biomedical Engineering, Southwestern State University, Kursk; Senior Research Associate, Laboratory "Problems of Aging", Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation

**Kolomiets V.I.**, Resident, Department of Therapy, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation

**Korneeva S.I.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Therapy, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation

**Moskaleva E.O.**, Resident, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation

**Makkonen K.F.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Faculty Therapy, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation

---

Поступила 22.10.2020  
Принята к печати 10.01.2021

---

Received 22.10.2020  
Accepted 10.01.2021

## **ЦИТОКИНЫ В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ COVID-19 В ОСТРОЙ ФАЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ И ФАЗЕ ПОЛНОГО ВЫЗДОРОВЛЕНИЯ**

**Арсентьева Н.А.<sup>1</sup>, Любимова Н.Е.<sup>1</sup>, Бацунов О.К.<sup>1,2</sup>, Коробова З.Р.<sup>1</sup>,  
Станевич О.В.<sup>2,3</sup>, Лебедева А.А.<sup>2</sup>, Воробьев Е.А.<sup>2</sup>, Воробьева С.В.<sup>2</sup>,  
Куликов А.Н.<sup>2</sup>, Лиознов Д.А.<sup>3</sup>, Шарапова М.А.<sup>2</sup>, Певцов Д.Э.<sup>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> ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** COVID-19 – инфекция, вызванная новым коронавирусом SARS-CoV-2, связана с рядом патофизиологических механизмов, которые мобилизуют широкий спектр биомолекул, в основном цитокинов. Целью настоящего исследования стала оценка уровней широкого спектра цитокинов в плазме крови больных COVID-19 в острой фазе заболевания и фазе полного выздоровления. Были исследованы образцы плазмы периферической крови 56 больных COVID-19, 69 реконвалесцентов и 10 практически здоровых лиц. Методом мультиплексного анализа по технологии xMAP определяли концентрации 46 молекул: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A/CTLA8, IL-17-E/IL-25, IL-17F, IL-18, IL-22, IL-27, IFN $\alpha$ 2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ /Lymphotoxin- $\alpha$  (LTA), CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL7/MCP-3, CCL11/Eotaxin, CCL22/MDC, CXCL1/GRO $\alpha$ , CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CX3CL1/Fractalkine, IL-1ra, IL-10, EGF, FGF-2/FGF-basic, Flt3 Ligand, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, TGF- $\alpha$ , VEGF-A.

В плазме крови больных COVID-19, находящихся в острой фазе заболевания по сравнению с контрольной группой, обнаружены достоверно повышенные уровни для 18 цитокинов: IL-6, IL-7, IL-15, IL-27, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ /Lymphotoxin- $\alpha$  (LTA), CCL2/MCP-1, CCL7/MCP-3, CXCL1/GRO $\alpha$ , CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10, CXCL9/MIG, IL-1ra, IL-10, M-CSF, GM-CSF, VEGF-A. В группе реконвалесцентов, по сравнению с больными COVID-19, у которых заболевание протекало со средней и тяжелой/крайне тяжелой формами течения, обнаружено достоверное снижение содержания практически всех исследованных нами цитокинов. Причем в плазме крови реконвалесцентов выявлены достовер-

### **Адрес для переписки:**

Арсентьева Наталья Александровна  
ФБУН «Санкт-Петербургский  
научно-исследовательский институт эпидемиологии  
и микробиологии имени Пастера»  
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.  
Тел.: 8 (904) 646-57-58.  
E-mail: arsentieva\_n.a@bk.ru

### **Address for correspondence:**

Arsentieva Natalia A.  
St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and  
Microbiology  
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14.  
Phone: 7 (904) 646-57-58.  
E-mail: arsentieva\_n.a@bk.ru

### **Образец цитирования:**

Н.А. Арсентьева, Н.Е. Любимова, О.К. Бацунов,  
З.Р. Коробова, О.В. Станевич, А.А. Лебедева,  
Е.А. Воробьев, С.В. Воробьева, А.Н. Куликов,  
Д.А. Лиознов, М.А. Шарапова, Д.Э. Певцов,  
Арег А. Тотолян «Цитокины в плазме крови больных  
COVID-19 в острой фазе заболевания и фазе полного  
выздоровления» // Медицинская иммунология, 2021.  
Т. 23, № 2. С. 311-326.  
doi: 10.15789/1563-0625-PCI-2312

© Арсентьева Н.А. и соавт., 2021

### **For citation:**

N.A. Arsentieva, N.E. Liubimova, O.K. Batsunov,  
Z.R. Korobova, O.V. Stanevich, A.A. Lebedeva,  
E.A. Vorobyov, S.V. Vorobyova, A.N. Kulikov, D.A. Lioznov,  
M.A. Sharapova, D.E. Pevtsov, Areg A. Totolian "Plasma  
cytokines in patients with COVID-19 during acute phase  
of the disease and following complete recovery", *Medical  
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2021,  
Vol. 23, no. 2, pp. 311-326.  
doi: 10.15789/1563-0625-PCI-2312

DOI: 10.15789/1563-0625-PCI-2312

но сниженные уровни 8 цитокинов по сравнению со значениями контрольной группы: IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-9, IL-12 p40, IL-18, CCL22/MDC, Flt3 Ligand, TGF- $\alpha$ .

Иммунологическая реакция, вызванная заражением SARS-CoV-2, вовлекает многочисленные цитокины, преимущественно провоспалительного характера. Нами впервые показано, что фаза реконвалесценции характеризуется значительно сниженным уровнем цитокинов, которые регулируют дифференцировку клеток, гемопоэз, в особенности лимфоцитарное звено (Т-лимфоциты, NK-клетки). В острую фазу заболевания уровень этих цитокинов не меняется. Значительное снижение в фазу реконвалесценции по сравнению с острой фазой выявлено для подавляющего большинства цитокинов в плазме крови. Наоборот, острая фаза заболевания сопровождается значительно повышенным уровнем провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в плазме крови.

*Ключевые слова:* COVID-19, SARS-CoV-2, цитокины, хемокины, реконвалесценция, мультиплексный анализ

## PLASMA CYTOKINES IN PATIENTS WITH COVID-19 DURING ACUTE PHASE OF THE DISEASE AND FOLLOWING COMPLETE RECOVERY

**Arsentieva N.A.<sup>a</sup>, Liubimova N.E.<sup>a</sup>, Batsunov O.K.<sup>a,b</sup>, Korobova Z.R.<sup>a</sup>, Stanevich O.V.<sup>b,c</sup>, Lebedeva A.A.<sup>b</sup>, Vorobyov E.A.<sup>b</sup>, Vorobyova S.V.<sup>b</sup>, Kulikov A.N.<sup>b</sup>, Lioznov D.A.<sup>c</sup>, Sharapova M.A.<sup>b</sup>, Pevtsov D.E.<sup>b</sup>, Totolian Areg A.<sup>a,b</sup>**

<sup>a</sup> St. Petersburg 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> A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** COVID-19, an infection caused by the new coronavirus SARS-CoV-2, is associated with a number of pathophysiological mechanisms, mobilizing a wide spectrum of biomolecules, mainly, cytokines. The purpose of this study was to evaluate levels of multiple cytokines in blood plasma from the patients with COVID-19 during acute phase of the disease, and upon complete recovery. Samples of peripheral blood plasma of 56 patients with COVID-19, 69 convalescents and 10 healthy individuals were examined. Concentrations of 46 molecules, such as IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A/CTLA8, IL-17-E/IL-25, IL-17F, IL-18, IL-22, IL-27, IFN $\alpha$ 2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ /Lymphotoxin- $\alpha$  (LTA), CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL7/MCP-3, CCL11/Eotaxin, CCL22/MDC, CXCL1/GRO $\alpha$ , CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CX3CL1/Fractalkine, IL-1ra, IL-10, EGF, FGF-2/FGF-basic, Flt3 Ligand, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, TGF- $\alpha$ , VEGF-A were measured via xMAP multiplexing technology. Significantly increased levels of 18 cytokines were found in blood plasma from COVID-19 patients during acute phase of the disease (as compared to control group), i.e., IL-6, IL-7, IL-15, IL-27, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ /Lymphotoxin- $\alpha$  (LTA), CCL2/MCP-1, CCL7/MCP-3, CXCL1/GRO $\alpha$ , CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10, CXCL9/MIG, IL-1ra, IL-10, M-CSF, GM-CSF, VEGF-A. We found a significant decrease of nearly all the mentioned cytokines in recovered patients, in comparison with those who had moderate, severe/extremely severe disease. Moreover, we revealed a significantly decreased level of 8 cytokines in plasma from convalescents, as compared with control group, i.e., IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-9, IL-12 p40, IL-18, CCL22/MDC, Flt3 Ligand, TGF- $\alpha$ . Immune response caused by SARS-CoV-2 infection involves multiple cytokines, mostly, with pro-inflammatory effects. We have shown for the first time that the convalescence phase is characterized by significantly lower levels of cytokines which regulate cellular differentiation and hematopoiesis (in particular, lymphocytes, T-cells and NK-cells). Over acute phase of the disease, the levels of these cytokines did not change. We revealed a significant decrease of most plasma cytokines upon recovery as compared to acute phase. On the contrary, acute phase of the disease is accompanied by significant increase of both pro- and anti-inflammatory cytokines in blood plasma.

*Keywords:* COVID-19, SARS-CoV-2, cytokines, chemokines, convalescence, multiplex analysis

## Введение

Вспышка новой коронавирусной инфекции, названной COVID-19, началась в декабре 2019 года и перешла в масштаб пандемии в марте 2020. Для COVID-19 характерна летальность около 2% и высокая контагиозность [28]. Источником инфекции является SARS-CoV-2, оболочечный одноцепочечный РНК-вирус рода Betacoronavirus [6]. Схожий с другими коронавирусами, в частности с SARS-CoV, новый коронавирус в качестве входной точки использует ангиотензинпревращающий фермент 2 (angiotensin-converting enzyme 2 – ACE2), через который с помощью преактивированного белка пепломера он внедряется в клетки верхних дыхательных путей с дальнейшим распространением его в ткани легких [14]. Вирус SARS-CoV-2 попадает в организм через слизистую оболочку носа, гортани и бронхов, проникает в периферическую кровь и поражает не только легкие, но и пищеварительный тракт, сердце, почки, клетки которых экспрессируют ACE2. Вирус SARS-CoV-2 связывается поверхностными шипиками S-белка с протеином ACE2, расположенным на клеточной мембране, затем происходит репликация вируса и высвобождение новых вирионов из инфицированной клетки. Вирионы поражают целевые органы и индуцируют развитие местного и системного воспалительного ответа [1, 3].

Клиническую картину новой коронавирусной инфекции можно охарактеризовать как острое респираторное заболевание, однако течение болезни варьирует у разных пациентов от асимптоматического до крайне тяжелого, в частности пневмонии с острым респираторным дистресс-синдромом [18]. Такое разнообразие проявлений может представлять трудность в эпидемиологическом плане, поскольку пациенты без проявлений заболевания способствуют распространению вируса в популяции. Однозначного ответа на вопрос, чем обусловлена вариативность клинической картины у разных пациентов, до сих пор не существует. Выдвигается множество теорий относительно патогенеза инфекции SARS-CoV-2, однако уже сейчас понятно, что в основе разнообразия клинических проявлений лежит индивидуальная иммунная реактивность организма.

Цитокины представляют собой регуляторные пептиды, продуцируемые клетками организма. К системе цитокинов в настоящее время относят около 200 полипептидных веществ [2]. Все они имеют ряд общих биохимических и функциональных характеристик, среди которых важнейшими считаются следующие: плеiotропность и взаимозаменяемость биологического действия, отсутствие антигенной специфичности, проведение сигнала путем взаимодействия со специ-

фическими клеточными рецепторами, формирование цитокиновой сети. В иммунопатогенезе SARS-CoV-2 у многих пациентов описывается развитие так называемого «цитокинового шторма» – патологического гипервоспаления с высвобождением цитокинов [3, 20]. Высвобождение цитокинов в ответ на инфекцию может привести к легким или тяжелым клиническим проявлениям. Предполагается существование связи между тяжестью заболевания, репликацией вируса и цитокиновым штормом [26]. Таким образом, **целью настоящего исследования** стала оценка уровня широкого спектра цитокинов в плазме крови больных COVID-19 в острой фазе заболевания и фазе полного выздоровления.

## Материалы и методы

С мая по июль 2020 года было обследовано 135 человек, сформировавших 3 группы: больные COVID-19 (n = 56), реконвалесценты (n = 69), контрольная группа (n = 10). На проведение данного исследования было получено согласие локального этического комитета Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. От каждого участника, включенного в исследование, было получено информированное письменное согласие.

В группу больных COVID-19 входило 56 человек обоего пола (50%/50%) в возрасте от 27 до 89 лет. Все больные находились на стационарном лечении в центре по лечению новой коронавирусной инфекции COVID-19 ПСПбГМУ им. академика И.П. Павлова. У больных был подтвержденный диагноз «новая коронавирусная инфекция» (U07.1 по МКБ-10) на основании положительного результата ПЦР с обнаружением РНК SARS-CoV-2. Больные находились в острой фазе заболевания. У 1,8% (1 человека) наблюдалось легкое течение заболевания, у 50% больных (28 человек) – средняя тяжесть течения, у 48,2% (27 человек) было тяжелое и крайне тяжелое течение заболевания. У троих человек (5,4%) заболевание закончилось летальным исходом, среди них у одного была средняя тяжесть, а у двоих тяжелое течение заболевания. У всех больных было поражение легких. У всех пациентов в плазме крови определяли наличие специфических антител классов IgM и IgG против вируса SARS-CoV-2 методом ИФА (GA, Германия). У 80% пациентов (45 человек) обнаружены специфические антитела класса IgM против вируса SARS-CoV-2. У 75% пациентов (42 человек) обнаружены суммарные специфические антитела класса IgG против вируса SARS-CoV-2. Венозную кровь забирали у пациентов при поступлении в стационар.

Группа реконвалесцентов состояла из 69 человек, переболевших COVID-19, обоего пола (52% мужчин / 48% женщин) в возрасте от 19 до 61 года. Переболевшие лица являлись донорами плазмы в Центре переливания крови ПСПбГМУ им. академика И.П. Павлова и соответствовали критериям отбора для сдачи крови (например, отсутствие беременности в течение последних шести недель, никогда не было диагностировано ВИЧ, ВГВ или ВГС, отсутствовали хронические заболевания в стадии обострения). У всех лиц этой группы ранее был подтвержден диагноз «новая коронавирусная инфекция» на основании положительного результата ПЦР с обнаружением РНК SARS-CoV-2. На момент заболевания у 43,5% больных (30 человек) наблюдалась легкая форма заболевания, у 46,4% (32 человек) – заболевание средней тяжести, у 10,1% (7 человек) – тяжелое и крайне тяжелое течение заболевания. На момент обследования у выздоровевших отсутствовали симптомы новой коронавирусной инфекции, а также был отрицательный тест ПЦР на выявление РНК SARS-CoV-2. После снятия диагноза (двух отрицательных тестов ПЦР на выявление РНК SARS-CoV-2) прошло от 30 до 100 дней. У всех пациентов в плазме крови определяли наличие специфических антител класса IgG против вируса SARS-CoV-2 методом ИФА (GA, Германия). 7,2% переболевших (5 человек) были серонегативными по суммарным специфическим антителам класса IgG против вируса SARS-CoV-2. У 85,5% (59 человек) обнаружены антитела класса IgG против белка спайк гликопротеин 1 (S1) вируса SARS-CoV-2, у 30,3% (20 человек) – против белка спайк гликопротеин 2 (S2) и у 91,3% (63 человек) обнаружены антителам класса IgG против белка нуклеокапсида (N) вируса SARS-CoV-2.

Контрольная группа включала в себя 10 условно здоровых жителей Санкт-Петербурга обоего пола (50%/50%) в возрасте от 24 до 69 лет. У обследованных лиц отсутствовали острые воспалительные заболевания и не наблюдались хронические заболевания в стадии обострения, а также был отрицательный тест ПЦР на выявление РНК SARS-CoV-2 и отсутствовали в плазме крови специфические антитела класса IgG против вируса SARS-CoV-2.

Материалом исследования служила периферическая кровь. Образцы крови забирали в вакуумные пробирки с антикоагулянтом  $K_2$ ЭДТА и центрифугировали при 350g в течение 10 минут. Плазму отбирали в криопробирки, замораживали и хранили при  $-80^{\circ}C$  до проведения анализа.

В плазме крови определяли концентрации 46 молекул: интерлейкинов и некоторых провоспалительных цитокинов (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3,

IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A/CTLA8, IL-17-E/IL-25, IL-17F, IL-18, IL-22, IL-27, IFN $\alpha$ 2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ /Lymphotoxin- $\alpha$ (LTA)); хемокинов (CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL7/MCP-3, CCL11/Eotaxin, CCL22/MDC, CXCL1/GRO $\alpha$ , CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CX3CL1/Fractalkine), противовоспалительных цитокинов (IL-1ra, IL-10) и ростовых факторов (EGF, FGF-2/FGF-basic, Flt3 Ligand, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, TGF- $\alpha$ , VEGF-A). Исследование проводили с помощью мультиплексного анализа по технологии xMAP (Luminex, США) с использованием наборов с магнитными частицами Milliplex HCYTA-60K-PX48 (Merck-Millipore) согласно инструкции фирмы-производителя. Регистрацию и анализ данных проводили на приборе Luminex MAGPIX (Luminex, США).

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism5. Поскольку полученные данные не подчинялись нормальному распределению, для анализа выборок использовали методы непараметрической статистики. Для межгрупповых сравнений применяли критерий Краскела–Уоллиса и Манна–Уитни. Достоверными считали различия при уровне значимости  $p < 0,05$ . Результаты представлены в виде медианы (Me) и межквартильного размаха ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ ). Для корреляционного анализа применяли коэффициент корреляции Спирмена.

## Результаты

### Уровни цитокинов у больных COVID-19 в острой фазе заболевания

Результаты определения концентрации цитокинов представлены в таблице 1.

В плазме крови больных COVID-19, находящихся в острой фазе заболевания, по сравнению с контрольной группой достоверно повышенные уровни обнаружены для 18 цитокинов из 46 анализируемых. Среди них провоспалительные цитокины: IL-6, повышенный в 16,7 раза ( $p < 0,0001$ ), IL-7 в 1,6 раза ( $p < 0,005$ ), IL-15 в 2,1 раза ( $p = 0,0007$ ), IL-27 в 2,1 раза, IFN $\gamma$  в 2,2 раза ( $p = 0,0001$ ), TNF $\alpha$  в 3 раза ( $p < 0,0001$ ) и TNF $\beta$ /Lymphotoxin- $\alpha$ (LTA) в 2 раза ( $p < 0,05$ ); СС-хемокины: CCL2/MCP-1 в 3,1 раза ( $p < 0,0001$ ) и CCL7/MCP-3 в 4,4 раза ( $p < 0,001$ ); СХС-хемокины: CXCL1/GRO $\alpha$  в 2,3 раза ( $p < 0,001$ ), CXCL8/IL-8 в 2 раза ( $p = 0,0002$ ), IFN $\gamma$ -зависимые хемокины: CXCL10/IP-10 в 98,8 раза ( $p < 0,001$ ) и CXCL9/MIG в 5,8 раза ( $p < 0,001$ ). Повышенные уровни противовоспалительных цитокинов: IL-1ra – в 4,2 раза ( $p < 0,0001$ ) и IL-10 в 4,9 раза ( $p < 0,0001$ ). Ростовые факторы: M-CSF, повы-

**ТАБЛИЦА 1. УРОВНИ ЦИТОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ COVID-19, НАХОДЯЩИХСЯ В ОСТРОЙ ФАЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ, И РЕКОНВАЛЕСЦЕНТОВ, НАХОДЯЩИХСЯ В ФАЗЕ ПОЛНОГО ВЫЗДОРОВЛЕНИЯ, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 1. PLASMA CYTOKINE CONTENT IN PATIENTS WITH COVID-19 IN ACUTE PHASE AND CONVALESCENTS PHASE, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

Цитокин, пг/мл Cytokine, pg/ml	Группы обследованных лиц Groups of examined individuals			p		
	COVID-19 острая фаза COVID-19 acute phase (n = 56)	COVID-19 реконва- лесценты COVID-19 convalescent (n = 69)	Здоровые до- норы (ЗД) Healthy donors (HD) (n = 10)	COVID-19 острая фаза/ COVID-19 реконва- лесценты COVID-19 acute phase/ COVID-19 convalescent	COVID-19 острая фаза/ ЗД COVID-19 acute phase/HD	COVID-19 реконва- лесценты/ ЗД COVID-19 convalescent/ HD
<b>Интерлейкины и некоторые провоспалительные цитокины</b> Interleukins and some proinflammatory cytokines						
IL-1α	25,5 (18,2-40,9)	9,9 (5,2-17,6)	23,7 (12,5-35,2)	< 0,0001	ns	0,0063
IL-1β	21,5 (15,7-30,7)	9,6 (5,9-17,2)	18,6 (11,1-23,1)	< 0,0001	ns	ns
IL-2	3,5 (2,4-3,5)	0,8 (0,3-1,9)	3,1 (2,5-4,3)	< 0,0001	ns	< 0,0001
IL-3	5,7 (2,6-9,9)	2,4 (1,3-4,5)	4,6 (1,5-6,8)	< 0,0001	ns	ns
IL-4	5,9 (3,3-7,4)	2,0 (1,2-2,8)	3,6 (2,0-3,8)	< 0,0001	ns	ns
IL-5	10,2 (6,9-14,1)	5,5 (3,3-7,8)	8,3 (5,2-13,6)	< 0,0001	ns	ns
IL-6	36,5 (17,8-66,7)	1,3 (0,8-1,7)	2,2 (1,6-3,2)	< 0,0001	< 0,0001	ns
IL-7	26,8 (18,7-40,5)	8,9 (6,2-13,7)	17,2 (9,9-19,9)	< 0,0001	< 0,05	ns
IL-9	36,7 (24,9-42,8)	15,0 (9,8-27,5)	30,8 (23,2-38,9)	< 0,0001	ns	0,0079
IL-12 p40	149,6 (118,1-209,9)	63,91 (47,03-85,90)	114,1 (100,8-144,4)	< 0,0001	ns	< 0,0001
IL-12 p70	9,4 (6,3-15,8)	4,6 (2,0-8,1)	8,1 (4,6-14,5)	< 0,0001	ns	ns
IL-13	45,8 (27,2-64,6)	24,4 (8,9-38,7)	30,0 (8,9-41,8)	< 0,0001	ns	ns
IL-15	38,9 (29,9-46,8)	11,5 (7,7-17,4)	18,3 (14,7-30,6)	< 0,0001	0,0007	ns
IL-17A	24,8 (14,5-33,2)	12,7 (6,9-20,8)	21,2 (12,9-23,8)	< 0,0001	ns	ns
IL-17E/IL-25	982,3 (644,5-1136,0)	525,0 (400,2-872,5)	702,7 (509,6-1070,0)	< 0,0001	ns	ns
IL-17F	21,3 (11,3-36,6)	3,9 (0,0-14,1)	9,5 (3,5-30,8)	< 0,0001	ns	ns
IL-18	138,2 (92,1-195,9)	33,9 (21,23-52,44)	95,9 (68,3-157,1)	< 0,0001	ns	< 0,0001
IL-22	77,6 (65,9-88,3)	49,0 (26,4-59,6)	70,4 (50,8-76,2)	< 0,0001	ns	ns

Таблица 1 (продолжение)  
Table 1 (continued)

Цитокин, пг/мл Cytokine, pg/ml	Группы обследованных лиц Groups of examined individuals			p		
	COVID-19 острая фаза COVID-19 acute phase (n = 56)	COVID-19 реконва- лесценты COVID-19 convalescent (n = 69)	Здоровые до- норы (ЗД) Healthy donors (HD) (n = 10)	COVID-19 острая фаза/ COVID-19 реконва- лесценты COVID-19 acute phase/ COVID-19 convalescent	COVID-19 острая фаза/ ЗД COVID-19 acute phase/HD	COVID-19 реконва- лесценты/ ЗД COVID-19 convalescent/ HD
IL-27	4408,0 (2655,0-6549,0)	1422,0 (1095,0-1825,0)	2062,0 (1522,0-2495,0)	< 0,0001	0,0006	ns
IFN $\alpha$ 2	88,2 (46,7-121,4)	41,2 (23,0-72,0)	72,0 (38,3-86,9)	< 0,0001	ns	ns
IFN $\gamma$	58,9 (40,2-101,5)	14,6 (7,5-23,8)	26,7 (21,8-36,1)	< 0,0001	0,0001	ns
TNF $\alpha$	172,3 (116,4-172,3)	42,5 (26,36-54,30)	58,2 (38,5-79,8)	< 0,0001	< 0,0001	ns
TNF $\beta$ / Lympho- toxin- $\alpha$ (LTA)	24,2 (13,6-30,4)	12,3 (6,8-19,8)	11,7 (4,4-13,6)	< 0,0001	< 0,05	ns
<b>СС-хемокины</b> CC-chemokines						
CCL2/MCP-1	723,4 (500,9-1093,0)	207,3 (153,0-303,0)	234,7 (189,5-383,8)	< 0,0001	< 0,0001	ns
CCL3/MIP-1 $\alpha$	49,5 (29,8-60,4)	21,2 (0,0-38,9)	36,0 (14,6-48,9)	< 0,0001	ns	ns
CCL4/MIP-1 $\beta$	26,3 (19,5-32,3)	16,7 (12,6-19,9)	18,7 (15,4-30,7)	< 0,0001	ns	ns
CCL7/MCP-3	33,1 (0,0-47,7)	0 (0-0)	7,5 (0,0-23,4)	< 0,0001	< 0,001	ns
CCL11/Ео- taxin	143,0 (109,2-188,6)	91,8 (60,1-124,0)	112,2 (95,9-197,9)	< 0,0001	ns	ns
CCL22/MDC	872,7 (556,7 – 1173,0)	653,5 (545,4-965,4)	1155,0 (1049,0-1326,0)	< 0,05	< 0,05	< 0,0001
<b>СХС-хемокины</b> CXC-chemokines						
CXCL1/ GRO $\alpha$	84,9 (55,8-144,9)	43,6 (24,4-83,7)	36,8 (17,0264,1)	< 0,0001	< 0,001	ns
CXCL8/IL-8	18,7 (15,5-25,0)	5,7 (3,7-7,9)	9,3 (6,5-12,2)	< 0,0001	0,0002	ns
CXCL9/MIG	7677,0 (3864,0-15227,0)	1135,0 (842,1-1699,0)	1312,0 (1182,0-2072,0)	< 0,0001	< 0,001	ns
CXCL10/ IP-10	34270,0 (10578,0-308117,0)	229,0 (156,8-354,3)	346,8 (268,4-439,2)	< 0,0001	< 0,001	ns
<b>СХ3С-хемокин</b> CXC3C-Chemokine						
CX3CL1/ Fractalkine	294,3 (202,3-395,8)	226 (152,6-286,1)	274,8 (176,4-360,5)	0,0001	ns	ns

Таблица 1 (окончание)  
Table 1 (continued)

Цитокин, пг/мл Cytokine, pg/ml	Группы обследованных лиц Groups of examined individuals			p		
	COVID-19 острая фаза COVID-19 acute phase (n = 56)	COVID-19 реконва- лесценты COVID-19 convalescent (n = 69)	Здоровые до- норы (ЗД) Healthy donors (HD) (n = 10)	COVID-19 острая фаза/ COVID-19 реконва- лесценты COVID-19 acute phase/ COVID-19 convalescent	COVID-19 острая фаза/ ЗД COVID-19 acute phase/HD	COVID-19 реконва- лесценты/ ЗД COVID-19 convalescent/ HD
<b>Противовоспалительные цитокины</b> Anti-inflammatory cytokines						
IL-1ra	58,5 (34,0-99,0)	9,5 (6,3-16,2)	13,8 (7,3-21,6)	< 0,0001	< 0,0001	ns
IL-10	51,8 (31,2-25,0)	6,4 (4,3-10,6)	10,6 (7,4-15,4)	< 0,0001	< 0,0001	ns
<b>Ростовые факторы</b> Growth factors						
EGF	247,5 (122,8-388,8)	174,2 (94,61-293,00)	233,8 (171,0-403,9)	ns	ns	ns
FGF-2/FGF- basic	135,1 (112,1-184,0)	106,8 (79,0-147,3)	106,8 (94,6-150,9)	0,0007	ns	ns
Flt3 Ligand	29,5 (22,1-40,9)	13,7 (9,2-18,6)	29,4 (17,5-33,9)	< 0,0001	ns	0,0007
G-CSF	146,2 (82,3-187,0)	22,2 (4,5-56,2)	68,4 (43,2-100,7)	< 0,0001	ns	ns
M-CSF	633,4 (409,2-889,0)	111,0 (59,9-178,5)	157,6 (116,2-231,0)	< 0,0001	< 0,0001	ns
GM-CSF	65,8 (42,7-81,9)	23,5 (14,7-36,9)	27,9 (20,2-61,1)	< 0,0001	0,0077	ns
PDGF-AA	7229,0 (5458,0-9318,0)	4661,0 (3440,0-5830,0)	6833,0 (5123,0-8155,0)	< 0,0001	ns	ns
PDGF-AB/ BB	38323,0 (29253,0-42536,0)	27361,0 (21452,0-34347,0)	37269,0 (29916,0-42128,0)	< 0,0001	ns	ns
TGF-α	9,0 (6,3-11,9)	2,5 (1,5-4,2)	5,4 (4,0-8,9)	< 0,0001	ns	< 0,05
VEGF-A	313,8 (184,0-620,4)	106,6 (69,3-162,1)	128,9 (114,8-192,3)	< 0,0001	< 0,05	ns

шенный в 4 раза ( $p < 0,0001$ ), GM-CSF в 2,3 раза ( $p = 0,0077$ ), VEGF-A в 2,4 раза ( $p < 0,05$ ).

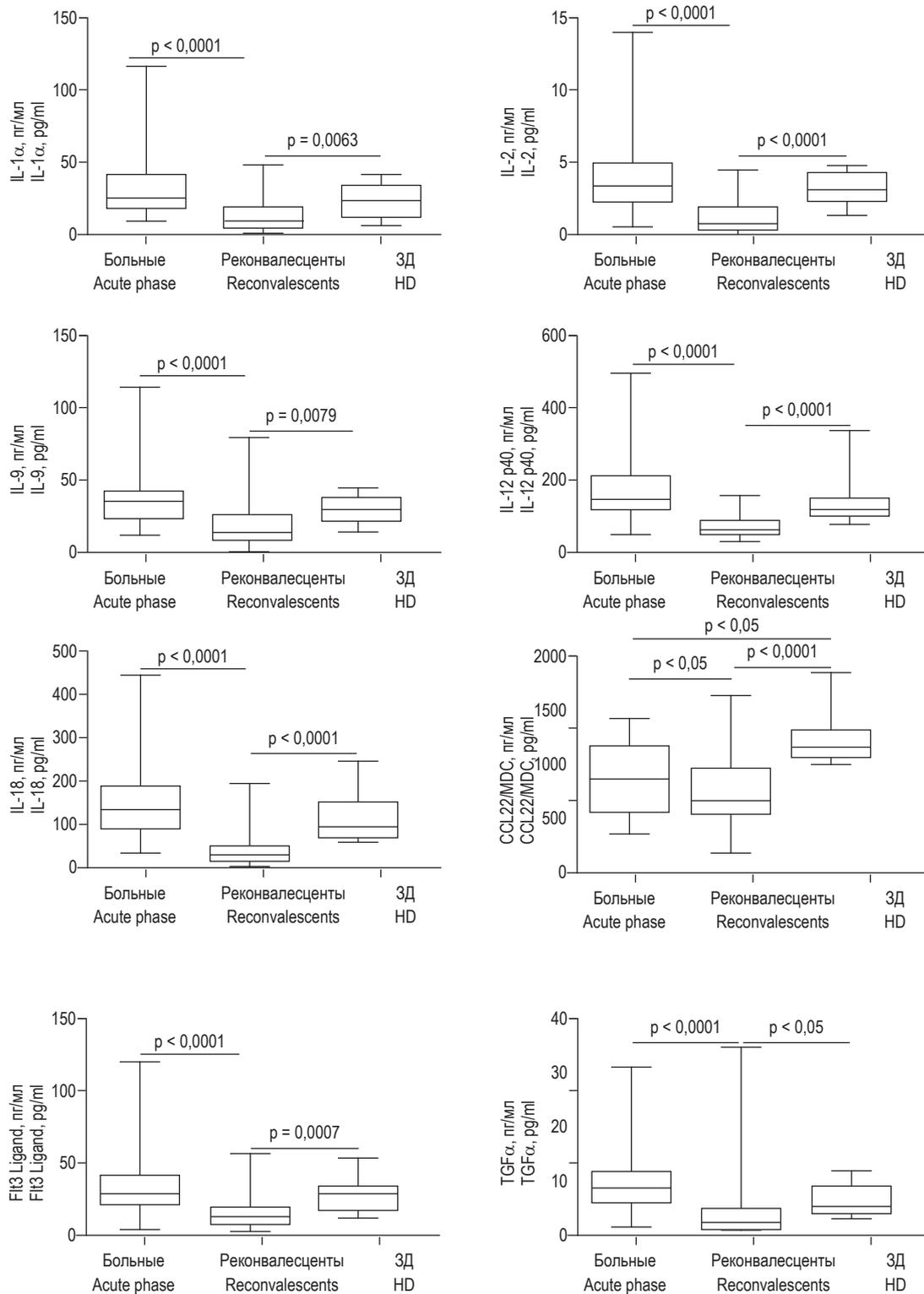
Корреляционной связи между концентрациями цитокинов в плазме крови больных COVID-19, находящихся в острой фазе заболевания, и тяжестью течения заболевания, не выявлено.

#### Уровни цитокинов у переболевших COVID-19

Из 46 исследованных цитокинов, в плазме крови реконвалесцентов обнаружен достоверно сниженный уровень 8 цитокинов по сравнению со значениями контрольной группы (рис. 1). Среди них провоспалительные цитокины: IL-1α, сниженный в 2,4 раза ( $p = 0,0063$ ), IL-2 снижен

в 3,9 раза ( $p < 0,0001$ ), IL-9 в 2 раза ( $p = 0,0079$ ), IL-12 p40 – в 1,8 раза ( $p < 0,0001$ ) и IL-18 в 2,8 раза ( $p < 0,0001$ ); СС-хемокин: CCL22/MDC, сниженный в 1,8 раза ( $p < 0,0001$ ); а также факторы роста: Flt3 Ligand, сниженный в 2,1 раза ( $p = 0,0007$ ) и TGF-α в 2,1 раза ( $p < 0,05$ ).

В зависимости от тяжести заболевания в группе реконвалесцентов по сравнению с больными COVID-19, у которых заболевание протекало со средней и тяжелой / крайне тяжелой формами течения, характерно достоверно сниженное содержание интерлейкинов и некоторых провоспалительных цитокинов: IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3,



**Рисунок 1. Межгрупповые различия уровня цитокинов в плазме крови реконвалесцентов, находящихся в фазе полного выздоровления (n = 69), больных COVID-19, находящихся в острой фазе заболевания (n = 56), и здоровых доноров (ЗД, n = 10)**

**Примечание.** Данные были проанализированы с применением критерия Краскела–Уоллиса. Результаты представлены в виде медианы, межквартильного размаха, минимального и максимального значения.

Figure 1. Differences in the cytokines plasma level in COVID-19 convalescents (n = 69), COVID-19 in the acute phase (n = 56) and healthy donors (HD, n = 10)

Note. Data were analyzed using the Kruskal–Wallis test. Results are presented as median, interquartile range, minimum and maximum values.

**ТАБЛИЦА 2. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ COVID-19, НАХОДЯЩИХСЯ В ОСТРОЙ ФАЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ, И РЕКОНВАЛЕСЦЕНТОВ, НАХОДЯЩИХСЯ В ФАЗЕ ПОЛНОГО ВЫЗДОРОВЛЕНИЯ, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ ТЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 2. PLASMA CYTOKINE CONTENT IN PATIENTS WITH COVID-19 IN ACUTE PHASE AND CONVALESCENTS PHASE IN DEPEND ON DISEASE SEVERITY, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

Цитокин, пг/мл Cytokine, pg/ml	Средняя тяжесть течения заболевания Moderate disease severity			Тяжелая и крайне тяжелая форма течения заболевания Severe and extremely severe disease severity		
	COVID-19 острая фаза COVID-19 acute phase (n = 28)	COVID-19 реконвалес- центы COVID-19 convalescent (n = 32)	p	COVID-19 острая фаза COVID-19 acute phase (n = 27)	COVID-19 реконвалесцен- ты COVID-19 convalescent (n = 7)	p
<b>Интерлейкины и некоторые провоспалительные цитокины</b> Interleukins and some proinflammatory cytokines						
IL-1α	29,63 (21,86-39,23)	9,94 (6,605-15,070)	< 0,0001	22,47 (17,57-45,78)	7,29 (2,34-12,53)	< 0,001
IL-1β	25,79 (16,43-30,85)	11,15 (5,985-14,190)	< 0,0001	18,63 (14,19-30,51)	8,01 (3,00-11,15)	0,0003
IL-2	3,92 (2,095-5,120)	1,01 (0,32-1,93)	< 0,0001	3,07 (2,38-4,21)	0,495 (0,26-1,01)	0,0003
IL-3	7,08 (3,495-10,520)	2,45 (1,28-4,02)	< 0,0001	4,02 (2,365-7,680)	1,94 (0,95-2,97)	0,0004
IL-4	4,98 (3,04-7,15)	1,99 (1,18-2,78)	< 0,0001	6,0 (3,82-7,40)	1,18 (1,18-2,25)	0,0003
IL-5	11,13 (7,733-14,450)	5,53 (2,78-7,15)	< 0,0001	9,48 (5,30-13,73)	3,69 (3,23-6,92)	0,0086
IL-6	43,18 (14,14-69,05)	1,07 (0,71-1,44)	< 0,0001	42,15 (23,19-85,57)	1,07 (0,83-2,20)	< 0,0001
IL-7	24,23 (18,39-30,91)	9,64 (6,755-13,500)	< 0,0001	32,53 (22,75-58,94)	10,99 (4,18-13,67)	0,0087
IL-9	36,71 (29,98-42,80)	15,01 (9,80-27,54)	< 0,0001	36,71 (22,24-42,14)	12,41 (6,51-19,84)	0,0013
IL-12 p40	149,6 (127,3-198,5)	63,91 (44,17-79,09)	< 0,0001	156,1 (100,7-233,8)	58,33 (35,50-69,46)	0,0007
IL-12 p70	12,04 (6,568-18,220)	4,61 (2,02-7,22)	0,0001	7,22 (6,35-11,60)	2,88 (1,17-8,97)	0,0238
IL-13	54,44 (29,34-63,44)	27,25 (5,22-32,73)	0,0001	40,65 (24,43-63,73)	18,55 (0,80-32,75)	0,0276
IL-15	39,93 (32,91-46,83)	11,54 (7,20-17,36)	< 0,0001	39,43 (31,8-46,5)	9,61 (5,76-16,39)	< 0,0001
IL-17A	27,55 (15,77-35,07)	10,84 (6,95-18,75)	< 0,0001	21,22 (14,46-29,08)	6,95 (4,83-12,68)	0,0031
IL-17E/IL-25	982,3 (644,5-1136,0)	525,0 (400,2-816,6)	0,0002	844,6 (622,4-1077,0)	400,2 (335,2-525,0)	0,0008
IL-17F	24,04 (16,58-40,19)	3,95 (0,00-9,52)	< 0,0001	14,09 (9,52-31,23)	3,95 (2,04-20,43)	ns
IL-18	124,6 (85,17-172,60)	35,91 (23,18-52,44)	< 0,0001	191,3 (106,0-276,2)	57,81 (29,69-100,90)	0,0023
IL-22	81,08 (65,96-89,88)	49,03 (5,90-59,58)	< 0,0001	76,25 (65,96-87,67)	38,86 (28,90-73,38)	0,0256

Таблица 2 (продолжение)  
Table 2 (continued)

Цитокин, пг/мл Cytokine, pg/ml	Средняя тяжесть течения заболевания Moderate disease severity			Тяжелая и крайне тяжелая форма течения заболевания Severe and extremely severe disease severity		
	COVID-19 острая фаза COVID-19 acute phase (n = 28)	COVID-19 реконвалес- центы COVID-19 convalescent (n = 32)	p	COVID-19 острая фаза COVID-19 acute phase (n = 27)	COVID-19 реконвалесцен- ты COVID-19 convalescent (n = 7)	p
IL-27	4446 (2673-7405)	1422 (1142-1803)	< 0,0001	4536 (1990-6915)	1401 (1081-1682)	0,015
IFN $\alpha$ 2	103,6 (54,64-129,50)	41,23 (23,00-59,79)	< 0,0001	69,65 (46,75-102,50)	29,44 (15,97-46,75)	0,0045
IFN $\gamma$	61,93 (44,58-107,40)	14,57 (7,46-22,80)	< 0,0001	58,31 (35,70-94,93)	14,57 (7,46-26,66)	0,0007
TNF $\alpha$	174,7 (127,3-216,9)	42,51 (23,6-50,4)	< 0,0001	192,3 (149,7-259,1)	39,86 (18,00-60,76)	0,0002
TNF $\beta$ / Lymphotoxin- $\alpha$ (LTA)	24,19 (13,08-27,70)	12,27 (3,83-19,85)	0,0199	17,15 (14,71-34,60)	6,83 (4,65-16,60)	ns
<b>СС-хемокины</b> CC-chemokines						
CCL2/MCP-1	618,9 (489,2-1010,0)	207,3 (172,6-284,8)	< 0,0001	866,5 (657-1261)	256,3 (237,4-373,9)	0,0002
CCL3/MIP-1 $\alpha$	57,99 (42,51-60,79)	29,82 (0,00-36,15)	< 0,0001	43,72 (29,82-55,48)	14,61 (14,61-36,15)	0,033
CCL4/MIP-1 $\beta$	26,28 (19,13-32,08)	16,42 (13,23-21,05)	0,0001	26,98 (21,14-33,97)	19,55 (12,31-23,71)	0,0219
CCL7/MCP-3	33,12 (17,84-41,51)	0 (0-0)	< 0,0001	47,7 (31,82-64,79)	0 (0-0)	0,0003
CCL11/ Eotaxin	148,0 (108,7-188,8)	91,84 (57,25-163,40)	0,0021	144,2 (115,2-194,9)	84,56 (68,97-112,90)	0,01
CCL22/MDC	1118,0 (613,9-1279,0)	731,1 (575,8-999,6)	ns	856,0 (555,1-1040,0)	701,0 (552,1-810,9)	ns
<b>СХС-хемокины</b> CXC-chemokines						
CXCL1/GRO $\alpha$	69,59 (51,88-122,10)	43,58 (28,47-92,89)	0,0262	127,4 (72,3-206,4)	25,28 (13,94-92,75)	0,002
CXCL8/IL-8	18,75 (16,30-24,56)	5,73 (3,755-7,755)	< 0,0001	21,16 (11,48-27,61)	3,54 (2,26-7,07)	0,0002
CXCL9/MIG	7296 (3802-15060)	980,8 (773,8-1377,0)	< 0,0001	9158 (5904-16863)	1443 (842,1-1942,0)	0,0012
<b>СХЗС-хемокин</b> CXC3C-chemokine						
CX3CL1/ Fractalkine	368 (259,3-415,8)	184,3 (148,3-263,2)	< 0,0001	251,2 (193,4-356,0)	184,3 (135,0-297,1)	ns
<b>Противовоспалительные цитокины</b> Anti-inflammatory cytokines						
IL-1ra	71,71 (35,38-101,00)	8,44 (5,30-19,66)	< 0,0001	59,16 (36,74-109,80)	7,35 (4,06-18,60)	< 0,0001
IL-10	49,17 (30,23-73,04)	5,69 (3,64-10,61)	< 0,0001	70,02 (34,55-94,42)	5,0 (2,96-9,90)	0,0006

Таблица 2 (окончание)  
Table 2 (continued)

Цитокин, пг/мл Cytokine, pg/ml	Средняя тяжесть течения заболевания Moderate disease severity			Тяжелая и крайне тяжелая форма течения заболевания Severe and extremely severe disease severity		
	COVID-19 острая фаза COVID-19 acute phase (n = 28)	COVID-19 реконвалес- центы COVID-19 convalescent (n = 32)	p	COVID-19 острая фаза COVID-19 acute phase (n = 27)	COVID-19 реконвалесцен- ты COVID-19 convalescent (n = 7)	p
<b>Ростовые факторы</b> Growth factors						
<b>EGF</b>	223,6 (93,0-339,4)	190,0 (92,09-359,10)	ns	481,7 (211,0-846,6)	116,3 (63,35-131,80)	0,0014
<b>FGF-2/ FGF-basic</b>	127,6 (105,5-152,7)	106,8 (79,0-147,3)	ns	142,4 (117,3-232,0)	106,8 (67,01-122,50)	0,0192
<b>Flt3 Ligand</b>	28,86 (21,88-35,48)	14,74 (9,915-18,250)	< 0,0001	31,73 (24,49-48,21)	11,54 (4,92-25,13)	0,0046
<b>G-CSF</b>	160,3 (110,3-186,1)	25,72 (12,56-35,84)	< 0,0001	131,8 (80,38-181,50)	12,11 (4,52-63,04)	0,0006
<b>M-CSF</b>	633,4 (411,9-868,4)	183,8 (59,91-121,30)	< 0,0001	677,0 (449,5-931,6)	59,91 (49,83-299,80)	0,0037
<b>GM-CSF</b>	71,08 (51,86-84,63)	25,72 (12,56-35,84)	< 0,0001	61,72 (41,52-73,42)	14,72 (10,42-34,70)	0,0007
<b>PDGF-AA</b>	6239 (5308-8896)	5458 (3792-7042)	0,021	8269 (5677-10505)	4134 (3332-5418)	0,0049
<b>PDGF-AB/BB</b>	39246 (29945-42442)	29990 (23799-35824)	0,0046	39385 (33552-45254)	27301 (22652-34353)	0,0037
<b>TGF-α</b>	10,2 (6,195-12,000)	2,53 (1,315-3,560)	< 0,0001	7,81 (6,28-12,26)	1,84 (1,14-3,90)	< 0,0001
<b>VEGF-A</b>	293,8 (171,3-500,1)	106,6 (67,09-176,80)	< 0,0001	481,7 (211,0-846,6)	116,3 (63,35-131,80)	0,0014

IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A/CTLA8, IL-17-E/IL-25, IL-18, IL-22, IL-27, IFNα2, IFNγ, TNFα; хемокинов (CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1α, CCL4/MIP-1β, CCL7/MCP-3, CCL11/Eotaxin, CXCL1/GROα, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, противовоспалительных цитокинов: IL-1ra, IL-10 и ростовых факторов: Flt3 Ligand, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, TGF-α, VEGF-A (табл. 2). Кроме того, при средней тяжести течения заболевания в плазме крови реконвалесцентов обнаружены сниженные уровни IL-17F в 6 раз (p < 0,0001) и TNFβ/Lymphotoxin-α (LTA) в 2 раза (p = 0,0199), а при тяжелой и крайне тяжелой формах течения сниженные уровни ростовых факторов EGF в 4 раза (p = 0,0014) и FGF-2/FGF-basic (p = 0,0192). Концентрации цитокинов в плазме крови реконвалесцентов, для которых было показано наибольшее снижение значений: IL-6, сниженный в 40 раз (p < 0,0001), CCL7/MCP-3 в плазме крови реконвалесцентов не выявлен, CXCL9/MIG сни-

женный более чем в 6 раз (p < 0,0001; p = 0,0012) и CXCL10/IP-10, сниженный в группе со средней тяжестью в 225 раз (p < 0,0001), в тяжелой и крайне тяжелой формой течения в 138 раз (p = 0,0007).

Достоверных различий в концентрациях цитокинов плазмы крови реконвалесцентов в группах со средней и тяжелой / крайне тяжелой формами заболевания не выявлено. Значимой корреляционной связи между концентрациями цитокинов в плазме переболевших COVID-19, находящихся в фазе полного выздоровления, и тяжестью течения заболевания не обнаружено.

Достоверных различий в содержании цитокинов в группе реконвалесцентов, у которых в крови присутствуют суммарные антитела IgG против вируса SARS-Cov2, и серонегативными пациентами не выявлено.

Значимой корреляционной связи между уровнями цитокинов в плазме крови реконвалесцентов и количеством лейкоцитов и лимфоцитов в периферической крови не обнаружено.

## Обсуждение

Результаты нашего исследования свидетельствуют об увеличении уровня ряда цитокинов, среди которых провоспалительные цитокины IL-6, TNF $\alpha$  и TNF $\beta$ ; противовоспалительный цитокин IL-1ra; цитокины Т-хелперов 1-го типа (Th1): IL-15 и IFN $\gamma$ ; цитокины Т-хелперов 2-го типа (Th2): IL-10, IL-27; фактор роста эндотелия сосудов – VEGF-A; факторы роста гемопоэтических клеток: IL-7, M-CSF и GM-CSF; СС-хемокины: CCL2/MCP-1 и CCL7/MCP-3; СХС-хемокины: CXCL1/GRO $\alpha$ , CXCL8/IL-8, IFN $\gamma$ -зависимые хемокины: CXCL9/MIG и CXCL10/IP-10 в плазме крови больных COVID-19, находящихся в острой фазе заболевания, что подтверждает результаты, которые ранее были получены другими исследователями [7, 11, 12]. Нами показаны повышенные уровни IFN $\gamma$  и IFN $\gamma$ -зависимых хемокинов CXCL9/MIG и CXCL10/IP-10, выявлена прямая корреляционная зависимость между содержанием IFN $\gamma$  и концентрацией CXCL9/MIG ( $r = 0,35$ ;  $p = 0,013$ ) и CXCL10/IP-10 ( $r = 0,67$ ;  $p < 0,0001$ ), что подтверждают данные литературы [13]. Однако обнаруженные в работе Laing A.G. и соавторов различия в концентрации CXCL10/IP-10 в зависимости от тяжести течения заболевания в нашем исследовании не подтвердились.

У троих больных COVID-19, находящихся в острой фазе заболевания, болезнь закончилась летальным исходом, при этом у одного пациента наблюдалось течение заболевания средней тяжести, а у двоих тяжелое. Мы сравнили концентрации исследованных цитокинов в плазме крови больных COVID-19 с летальным исходом заболевания со значениями в группе больных COVID-19 со средней и тяжелой формами течения заболевания, которые позднее выздоровели. У всех трех пациентов было повышенное содержание цитокинов IL-10, IL-18, TNF $\alpha$  и хемокинов CXCL9/MIG и CXCL10/IP-10. Таким образом, обнаруженные нами изменения концентрации цитокинов свидетельствуют о том, что уровни цитокинов потенциально могут служить предикторами исхода заболевания, однако требуются дальнейшие исследования с большей выборкой.

В нашем исследовании была выявлена достоверная положительная корреляционная связь между уровнями цитокинов GM-CSF, CXCL1/GRO $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$  и уровнем вирус-нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 у пациентов с COVID-19 в острой фазе. В работе Wang K. и соавторов была проанализирована 48-плексная панель для определения цитокинов Bio-Plex Human Cytokine Screening Panel производства Bio-Rad и выявлены положительные корреляции между уровнем вирус-нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 у пациентов с COVID-19 в

острой фазе и концентрациями цитокинов SCF, TRAIL, M-CSF [27].

В то же время существуют скудные данные о выздоровевших пациентах, перенесших COVID-19, и содержании цитокинов в их плазме. В результате нашего исследования было показано, что в плазме крови реконвалесцентов выявлены достоверно сниженные концентрации практически всех исследованных нами цитокинов, по сравнению с больными COVID-19, находящихся в острой фазе заболевания: интерлейкинов и некоторых провоспалительных цитокинов (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A/CTLA8, IL-17-E/IL-25, IL-17F, IL-18, IL-22, IL-27, IFN $\alpha$ 2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ /Lymphotoxin- $\alpha$  (LTA)); противовоспалительных цитокинов (IL-1ra, IL-10); ростовых факторов (FGF-2/FGF-basic, Flt3 Ligand, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, TGF- $\alpha$ , VEGF-A); хемокинов (CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL7/MCP-3, CCL11/Eotaxin, CCL22/MDC, CXCL1/GRO $\alpha$ , CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CX3CL1/Fractalkine). В работе Nasichaolu и соавторов было проведено исследование цитокинов в плазме крови реконвалесцентов через две недели после выздоровления [10]. Исследователи обнаружили повышенные уровни следующих цитокинов: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  в плазме крови реконвалесцентов по сравнению со здоровыми донорами. Эти данные частично совпадают с нашими результатами, полученными у больных COVID-19, находящихся в острой фазе заболевания, у которых обнаружены повышенные уровни IL-6, IL-10, TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$ . С другой стороны, нами получены противоположные результаты о концентрации этих цитокинов в плазме крови реконвалесцентов, исследование которых проводилось на 30-100-й день после выздоровления. Таким образом, через две недели после выздоровления уровни цитокинов еще повышены, а спустя 30-100 дней зафиксированы достоверно сниженные концентрации цитокинов.

Результаты нашего исследования свидетельствуют о сниженном уровне некоторых цитокинов в плазме крови реконвалесцентов по сравнению со здоровыми лицами. Так, сниженный уровень провоспалительных цитокинов IL-1 $\alpha$  и IL-18 скорее всего свидетельствует об истощении ресурсов клеток, продуцирующих эти цитокины. Биологическое значение этого явления требует дальнейшего изучения.

Стоит отметить, что в плазме крови реконвалесцентов достоверно снижены концентрации цитокинов, ответственных за гемопоэз, в частно-

сти лимфопоэза и Т-клеточную дифференцировку по сравнению со здоровыми лицами.

Например, в крови реконвалесцентов показано достоверное снижение концентрации IL-18. Этот цитокин регулирует дифференцировку как Th1, так и Th2 [16]. IL-18, действуя совместно с IL-12, концентрация которого в плазме крови реконвалесцентов также снижена, стимулирует наивные Т-, CD8<sup>+</sup> и NK-клетки к пролиферации и синтезу IFN $\gamma$  [21]. Кроме того, IL-18 способствует дифференцировке Th1 и увеличению цитотоксичности NK-клеток, индуцируя экспрессию Fas-лиганда и способствуя уничтожению инфицированных клеток путем Fas-опосредованного апоптоза [22]. IL-18 совместно с IL-2 (концентрация которого также снижена в плазме крови реконвалесцентов) и без участия IL-12 может индуцировать продукцию Th2-цитокинов, а также NK-клеток и естественных киллерных Т-клеток [24]. Таким образом, IL-18 является уникальным цитокином, способным стимулировать различные субпопуляции Т- и NK-клеток.

Ключевая функция IL-12 заключается в регуляции дифференцировки Th1- и Th17-лимфоцитов [17]. IL-12 также индуцирует продукцию IFN $\gamma$  Т-лимфоцитами и NK-клетками по механизму положительной обратной связи [24].

В плазме крови реконвалесцентов установлен сниженный уровень IL-2, который является одним из основных факторов роста Т-клеток, необходимый для пролиферации Т-клеток и генерации эффекторных клеток и клеток памяти. Важнейшей функцией IL-2 является контроль иммунных реакций и поддержание собственной толерантности, а его отсутствие приводит к дефектному контролю эффекторных клеток и развитию аутоиммунных заболеваний [4]. Помимо Т-лимфоцитов, IL-2 способствует пролиферации В-лимфоцитов и NK-клеток [23]. Следовательно, IL-2 участвует в профилактике аутоиммунных заболеваний и необходим для контроля иммунных реакций и поддержания самотолерантности [29]. Также в плазме крови реконвалесцентов обнаружена сниженная концентрация IL-9, ответственного за лимфопоэз, одного из важнейших факторов роста Т-лимфоцитов. Таким образом, у лиц, перенесших COVID-19, через 30-100 дней после выздоровления наблюдается сниженный уровень цитокинов в циркуляции, ответственных за дифференцировку Т-лимфоцитов и NK-клеток.

К тому же в нашем исследовании установлен сниженный уровень Flt3 Ligand (Fms-like tyrosine kinase 3 ligand) у реконвалесцентов. Этот цитокин является одним из ключевых факторов гемопоэза, а также основным фактором роста для дендритных клеток [19]. Flt3 Ligand служит индикатором клеточности костного мозга. Показано,

что он имеет реципрокную связь с количеством лейкоцитов при апластической анемии и химиотерапевтически индуцированной нейтропении [9]. В нашем исследовании корреляционной связи между уровнем FLT-3L и содержанием лейкоцитов и лимфоцитов в крови реконвалесцентов не обнаружено.

Снижение концентрации TGF- $\alpha$  в плазме крови реконвалесцентов также свидетельствует о нарушении процессов клеточной дифференцировки. TGF- $\alpha$  – член семейства эпидермальных факторов роста (EGF), он является митогенным полипептидом. Белок TGF- $\alpha$  при связывании с рецептором EGFR может инициировать множественные события клеточной пролиферации [15]. TGF- $\alpha$  участвует в процессах репарации, ангиогенеза и эмбриогенеза. Было также показано, что TGF- $\alpha$  стимулирует пролиферацию нервных клеток в поврежденном мозге взрослого человека [7].

Нами установлено снижение концентрации хемокина CCL22/MDC в плазме крови переболевших COVID-19 в фазе полного выздоровления по сравнению со здоровыми лицами. CCL22/MDC – макрофагальный хемокин конститутивно экспрессируется макрофагами, зрелыми дендритными клетками и В-клетками, а повышенная экспрессия CCL22/MDC была отмечена Т-лимфоцитами, которые одновременно продуцируют Th2-цитокины IL-4, IL-5 и IL-6, а также в моноцитах, стимулированных Th2-цитокинами IL-4 и IL-13 [5]. Кроме того, эпителиальные клетки кишечника человека продуцируют CCL22/MDC, который может подавлять воспаление слизистой оболочки. Таким образом, снижение этого конститутивного хемокина может свидетельствовать о нарушении работы кишечника у выздоровевших.

## Заключение

Иммунологическая реакция, вызванная заражением SARS-CoV-2, вовлекает многочисленные цитокины, преимущественно провоспалительного характера. В настоящем исследовании впервые показано, что фаза реконвалесценции характеризуется значительно сниженным уровнем цитокинов, регулирующих клеточную дифференцировку, гемопоэз, в особенности лимфоцитарное звено (Т-лимфоциты, NK-клетки). В острую фазу заболевания уровень этих цитокинов не меняется. Значительное снижение в фазу реконвалесценции по сравнению с острой фазой выявлено для подавляющего большинства цитокинов в плазме крови. Наоборот, острая фаза заболевания сопровождается значительно повышенным уровнем цитокинов в плазме крови (провоспалительных и противовоспалительных).

## Список литературы / References

1. Абатуров А.Е., Агафонова Е.А., Кривуша Е.Л., Никулина А.А. Патогенез COVID-19 // Здоровье ребенка, 2020. Т. 15, № 2. С. 133-144. [Abaturov A.E., Agafonova E.A., Krivusha E.L., Nikulina A.A.. Pathogenesis of COVID-19. *Zdorovye rebenka = Child's Health*, 2020, Vol. 15, no. 2, pp. 133-144. (In Russ.)]
2. Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и функции // Цитокины и воспаление, 2004. Т. 3, № 2. С. 16-22. [Simbirtsev A.S. Cytokines: classification and functions. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2004, Vol. 3, no. 2, pp. 16-22. (In Russ.)]
3. Смирнов В.С., Тотолян Арег А. Некоторые возможности иммунотерапии при коронавирусной инфекции // Инфекция и иммунитет, 2020. Т. 10, № 3. С. 446-458. [Smirnov V.S., Totolian Areg A. Some opportunities for immunotherapy in coronavirus infection. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, Vol. 10, no. 3, pp. 446-458. (In Russ.)]
4. Abbas A.K., Trotta E.R., Simeonov D., Marson A., Bluestone J.A. Revisiting IL-2: biology and therapeutic prospects. *J. Sci. Immunol.*, 2018, Vol. 3, no. 25, eaat1482. doi: 10.1126/sciimmunol.aat1482.
5. Andrew D.P., Chang M.S., McNinch J., Wathen S.T., Rihaneck M., Tseng J., Spellberg J.P., Elias C.G. 3<sup>rd</sup>. STCP-1 (MDC) CC chemokine acts specifically on chronically activated Th2 lymphocytes and is produced by monocytes on stimulation with Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J. Immunol.*, 1998, Vol. 161, no. 9, pp. 5027-5038.
6. Breaching N.J., Fletcher T.E., Fowler R. COVID-19. *BMJ Best Practices*. Available at: <https://bestpractice.bmj.com/topics/en-gb/3000168/pdf/3000168/COVID-19.pdf>.
7. Costela-Ruiz V.J., Illescas-Montes R., Puerta-Puerta J.M., Ruiz C., Melguizo-Rodríguez L. SARS-CoV-2 infection: the role of cytokines in COVID-19 disease. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2020, no. 54, pp. 62-75.
8. Fallon J., Reid S., Kinyamu R., Opole I., Opole R., Baratta J., Korc M., Endo T.L., Duong A., Nguyen G., Karkehabadhi M., Twardzik D., Patel S., Loughlin S. *In vivo* induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, Vol. 97, no. 26, pp. 14686-14691.
9. Haidar J.H., Bazarbachi A., Mahfouz R., Haidar H.A., Jaafar H., Daher R. Serum Flt3 ligand variation as a predictive indicator of hematopoietic stem cell mobilization. *J. Hematother. Stem Cell Res.*, 2002, Vol. 11, no. 3, pp. 533-538.
10. Hasichaolu, Zhang X., Li X., Li X., Li D. Circulating cytokines and lymphocyte subsets in patients who have recovered from COVID-19. *BioMed Res. Int.*, 2020, Vol. 2020, 7570981. doi: 10.1155/2020/7570981.
11. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *J. Lancet*. 2020, no. 395, pp. 497-506.
12. Kox M., Waalders N.J.B., Kooistra E.J., Gerretsen J., Pickkers P. Cytokine levels in critically ill patients with COVID-19 and other conditions. *JAMA*, 2020, Vol. 3, no. 324 (15), pp. 1565-1567.
13. Laing A.G., Lorenc A., Del Molino Del Barrio I., Das A., Fish M., Monin L. et al. A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. *J. Nat. Med.*, 2020, Vol. 26, no. 10, pp. 1623-1635.
14. Li W., Moore M.J., Vasilieva N., Sui J., Wong S.K., Berne M.A., Somasundaran M., Sullivan J.L., Luzuriaga K., Greenough T.C., Choe H., Farzan M. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, 2003, Vol. 426, no. 6965, pp. 450-454.
15. McInnes C., Wang J., Al Moustafa A.E., Yansouni C., O'Connor-McCourt M., Sykes B.D. Structure-based minimization of transforming growth factor-alpha (TGF-alpha) through NMR analysis of the receptor-bound ligand. Design, solution structure, and activity of TGF-alpha 8-50. *J. Biol. Chem.*, 1998, Vol. 273, no. 42, pp. 27357-27363.
16. Nakanishi K., Yoshimoto T., Tsutsui H., Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 2001, Vol. 19, pp. 423-474.
17. O'Shea J.J., Paul W.E. Regulation of T(H)1 differentiation – controlling the controllers. *Nat. Immunol.*, 2002, no. 3, pp. 506-508.
18. Parasher A. COVID-19: Current understanding of its pathophysiology, clinical presentation and treatment. *Postgrad. Med. J.*, 2020, postgradmedj-2020-138577. doi: 10.1136/postgradmedj-2020-138577.
19. Restifo N.P., Dudley M.E., Rosenberg S.A. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *J. Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, no. 4, pp. 269-281.
20. Rodriguez L., Brodin P. Unraveling the immune response in severe COVID-19. *J. Clin. Immunol.*, 2020, Vol. 40, no. 7, pp. 958-959.
21. Takeda K., Tsutsui H., Yoshimoto T., Adachi O., Yoshida N., Kishimoto T., Akira S. Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *J. Immunology*. 2008, Vol. 180, no. 3, pp. 383-390.
22. Tsutsui, H., Matsui, K., Kawada, N., Hyodo, Y., Hayashi, N., Okamura, H., Nakanishi, K. IL-18 accounts for both TNF-alpha and Fas ligand mediated hepatotoxic pathways in endotoxin induced liver injury in mice. *J. Immunol.*, 1997, Vol. 159, no. 8, pp. 3961-3967.
23. Turner M.D., Nedjai B., Hurst T., Pennington D.J. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim. Biophys. Acta*. 2014, Vol. 1843, no. 11, pp. 2563-2582.
24. Vecchié A., Bonaventura A., Toldo S., Dagna L., Dinarello C.A., Abbate A. IL-18 and infections: is there a role for targeted therapies? *J. Cell. Physiol.*, 2021, Vol. 236, no. 3, pp. 1638-1657.

25. Vignali D.A.A., Kuchroo V.K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat. Immunol.*, 2012, no. 13, pp. 722-728.
26. Wang J., Jiang M., Chen X., Montaner L.J. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. *J. Leukoc. Biol.*, 2020, Vol. 108, no. 1, pp. 17-41.
27. Wang K., Long Q.X., Deng H.J., Hu J., Gao Q.Z., Zhang G.J., He C.L., Huang L.Y., Hu J.L., Chen J., Tang N., Huang A.L. Longitudinal dynamics of the neutralizing antibody response to SARS-CoV-2 infection. *J. Clin. Infect. Dis.*, 2020, c11143. doi: 10.1093/cid/ciaa1143.
28. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. Available at: <https://covid19.who.int/>.
29. Yuan X., Cheng G., Malek T.R. The importance of regulatory T-cell heterogeneity in maintaining self-tolerance. *J. Immunol. Rev.*, 2014, Vol. 203, no. 1, pp. 103-114.

**Авторы:**

**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

**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

**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

**Коробова З.Р.** — лаборант-исследователь лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

**Станевич О.В.** — врач-инфекционист отдела эпидемиологии клиник ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ; аспирант ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Лебедева А.А.** — врач-терапевт СОСМП ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Воробьев Е.А.** — врач-нефролог, ассистент кафедры нефрологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Authors:**

**Arsentieva N.A.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

**Liubimova N.E.**, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

**Batsunov O.K.**, Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg 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

**Korobova Z.R.**, Laboratory Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, PhD student, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

**Stanevich O.V.**, Clinical Infectologist, Epidemiology Department, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University; Postgraduate Student, A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

**Lebedeva A.A.**, Physician, Emergency Department, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Vorobyov E.A.**, Clinical Nephrologist, Assistant Professor, Nephrology Department, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Воробьева С.В.** — врач-терапевт, ассистент кафедры пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Куликов А.Н.** — д.м.н., профессор ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Лизнов Д.А.** — д.м.н., исполняющий обязанности директора ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Шарапова М.А.** — врач-трансфузиолог, Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии имени Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Певцов Д.Э.** — руководитель отделения переливания крови, врач-трансфузиолог, Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии имени Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**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

**Vorobyova S.V.**, Physician, Assistant Professor, Department of Internal Diseases, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Kulikov A.N.**, PhD, MD (Medicine), Professor, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Lioznov D.A.**, PhD, MD (Medicine), Acting Director, A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

**Sharapova M.A.**, Blood Bank Physician, R. Gorbacheva Memorial Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Pevtsov D.E.**, Head, Transfusiology Department, R. Gorbacheva Memorial Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Totolian Areg A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Director, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Head, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 22.03.2021  
Принята к печати 22.03.2021

Received 22.03.2021  
Accepted 22.03.2021

## ЭКСПАНСИЯ МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С АНКИЛОЗИРУЮЩИМ СПОНДИЛИТОМ

Моренкова А.Ю., Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Баторов Е.В.,  
Сизиков А.Э., Чумасова О.А., Сулутьян А.Э., Останин А.А.,  
Черных Е.Р.

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

**Резюме.** Экспансия миелоидных супрессорных клеток (МС) вследствие нарушения дифференцировки миелоидных предшественников в условиях воспаления описана при ряде аутоиммунных заболеваний, включая ревматоидный артрит, системную красную волчанку и сахарный диабет 1-го типа. Учитывая, что при анкилозирующем спондилите (АС) повышенная концентрация провоспалительных медиаторов может также вызывать нарушения миелопоэза, изучение роли МС при данной патологии представляется актуальной задачей. Целью настоящей работы явилось исследование количественного содержания субпопуляций МС у больных с различными клиническими фенотипами и активностью АС. В исследование были рекрутированы 37 пациентов, включая 10 больных, не имеющих поражения периферического скелета (центральная форма) и 27 пациентов с одновременным поражением позвоночника и периферических суставов (периферическая форма). Контрольную группу составили 32 сопоставимых по полу и возрасту донора. Оценку гранулоцитарных (Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD33<sup>+</sup>CD66b<sup>+</sup>; Г-МС), моноцитарных (CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low/-</sup>; М-МС) и МС ранних стадий дифференцировки (Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD33<sup>+</sup>CD66b<sup>-</sup>; Р-МС) проводили методом проточной цитометрии с использованием соответствующих антител (BD Biosciences, США) в популяции мононуклеарных клеток периферической крови методом проточной цитофлуориметрии. В целом по группе: пациенты с АС характеризовались повышенным относительным и абсолютным количеством М-МС ( $p = 0,00002$  и  $p = 0,00003$  соответственно) и Г-МС ( $p = 0,0002$  и  $p = 0,0006$  соответственно). Пол пациентов, возраст и экспрессия HLA-B27 не оказывали значимого влияния на содержание этих клеток в периферической крови. Увеличение медианных значений М-МС выявлялось как у пациентов с центральной (Me 5,0 (3,2-6,3) против 2,4 (1,7-3,5) %;  $p = 0,001$ ), так и периферической формой (Me 5,0 (3,0-7,0) против 2,4 (1,7-3,5) %;  $p = 0,0002$ ) АС. В то же время экспансия Г-МС наблюдалась только у пациентов с вовлечением периферических суставов (Me 0,16 (0,07-0,3) % против 0,05 (0,04-0,09) %;  $p = 0,0001$ ). Относительное содержание Р-МС, М-МС и Г-МС при центральной форме АС находилось в прямой корреляционной зависимости с активностью заболевания ( $R = 0,58$ ,  $p = 0,02$ ;  $R = 0,73$ ,  $p = 0,08$  и  $R = 0,65$ ,  $p = 0,04$  соответственно). При периферической форме АС такой взаимосвязи не прослеживалось. Полученные данные свидетельствуют о причастности МС к патогенезу и фенотипической

### Адрес для переписки:

Моренкова Анастасия Юрьевна  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
фундаментальной и клинической иммунологии»  
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.  
Тел.: 8 (383) 236-03-29.  
Факс: 8 (383) 222-70-28.  
E-mail: anastasia.inozemceva@gmail.com

### Address for correspondence:

Morenkova Anastasia Yu.  
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology  
630099, Russian Federation, Novosibirsk,  
Yadrintsevskaya str., 14.  
Phone: 7 (383) 236-03-29.  
Fax: 7 (383) 222-70-28.  
E-mail: anastasia.inozemceva@gmail.com

### Образец цитирования:

А.Ю. Моренкова, М.А. Тихонова, Т.В. Тыринова,  
Е.В. Баторов, А.Э. Сизиков, О.А. Чумасова,  
А.Э. Сулутьян, А.А. Останин, Е.Р. Черных «Экспансия  
миелоидных супрессорных клеток в периферической  
крови пациентов с анкилозирующим спондилитом» //  
Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 2. С. 327-338.  
doi: 10.15789/1563-0625-EOM-2143  
© Моренкова А.Ю. и соавт., 2021

### For citation:

A. Yu. Morenkova, M. A. Tikhonova, T. V. Tyrinova,  
E. V. Batorov, A. E. Sizikov, O. A. Chumasova, A. E. Sulutyan,  
A. A. Ostanin, E. R. Chernykh "Expansion of myeloid-  
derived suppressor cells in the peripheral blood of patients  
with ankylosing spondylitis", Medical Immunology (Russia)/  
Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 2,  
pp. 327-338. doi: 10.15789/1563-0625-EOM-2143  
DOI: 10.15789/1563-0625-EOM-2143

разнородности АС. При этом обнаруженная прямая корреляционная связь между содержанием МС и активностью заболевания позволяет предполагать снижение супрессорной активности и/или появление провоспалительной активности у МС, что требует дальнейших исследований.

*Ключевые слова:* миелоидные супрессорные клетки ранних стадий дифференцировки, моноцитарные миелоидные супрессорные клетки, гранулоцитарные миелоидные супрессорные клетки, воспаление, аутоиммунные заболевания, анкилозирующий спондилит

## EXPANSION OF MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS IN THE PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS

Morenkova A.Yu., Tikhonova M.A., Tyrinova T.V., Batorov E.V., Sizikov A.E., Chumasova O.A., Sulutyan A.E., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

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

**Abstract.** Expansion of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) due to impaired differentiation of myeloid progenitor cells under conditions of inflammation was described in a number of autoimmune diseases, including rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, and type 1 diabetes mellitus. Studying the role of MDSCs in ankylosing spondylitis is an important issue, given that increased concentration of pro-inflammatory mediators in this pathology can also cause myelopoiesis disorders. The aim of present work was to study the quantitative content of MDSC subpopulations in patients with different clinical phenotypes and activity of AS. 37 patients, including 10 patients without peripheral skeletal lesions (axial form) and 27 patients with simultaneous lesions of spine and peripheral joints (peripheral form) were recruited into the study. The control group consisted of 32 age/sex-related healthy donors. Evaluation of granulocytic (Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD33<sup>+</sup>CD66b<sup>+</sup>; G-MDSC), monocytic (CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low/-</sup>; M-MDSC) and early-stage MDSCs (Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD33<sup>+</sup>CD66b<sup>-</sup>; E-MDSC) was performed using corresponding antibodies (BD Biosciences, USA) in the population of peripheral blood mononuclear cells by flow cytometry. In general, the AS patients were characterized by an increased relative and absolute amount of M-MDSC ( $p = 0.00002$  and  $p = 0.00003$ , respectively) and G-MDSC ( $p = 0.0002$  and  $p = 0.0006$ , respectively). Patient gender, age, and HLA-B27 expression did not significantly affect the content of these cells in peripheral blood. An increase in the median values of M-MDSC was detected both in patients with axial (Me 5.0 (3.2-6.3) versus 2.4 (1.7-3.5) %;  $p = 0.001$ ) and peripheral form (Me 5.0 (3.0-7.0) versus 2.4 (1.7-3.5) %;  $p = 0.0002$ ) AS. At the same time, the G-MDSC expansion was observed only in patients with involvement of peripheral joints (Me 0.16 (0.07-0.3) % versus 0.05 (0.04-0.09) %;  $p = 0.0001$ ). The relative contents of E-MDSC, M-MDSC and G-MDSC in the axial form of AS was in direct correlation with the activity of the disease ( $R = 0.58$ ,  $p = 0.02$ ;  $R = 0.73$ ,  $p = 0.08$  and  $R = 0.65$ ,  $p = 0.04$ , respectively). This relationship was not observed in peripheral form of AS. The data obtained suggest a potential involvement of MDSCs in pathogenesis and phenotypic heterogeneity of AS. Simultaneously, the revealed direct correlation between the MDSC contents and the disease activity suggests a decrease in suppressive activity and/or appearance of pro-inflammatory activity in MDSC, thus requiring further research in the field.

*Keywords:* early-stage myeloid-derived suppressor cells, monocytic myeloid-derived suppressor cells, granulocytic myeloid-derived suppressor cells, inflammation, autoimmune diseases, ankylosing spondylitis

### Введение

Миелоидные супрессорные клетки (МС) представляют гетерогенную популяцию незрелых клеток миелоидного происхождения, способных подавлять реакции врожденного и при-

обретенного иммунитета [9]. По мнению ряда исследователей, МС генерируются в костном мозге из незрелых миелоидных клеток, которые при физиологических условиях быстро дифференцируются в зрелые гранулоциты, макрофаги или дендритные клетки, тогда как при патоло-

гии блокирование дифференцировки миелоидных предшественников приводит к накоплению МС [3]. У человека популяция МС включает гранулоцитарные (полиморфноядерные), моноцитарные и ранние МС (Г-МС, М-МС и Р-МС соответственно), которые различаются по морфологическим признакам, экспрессии мембранных маркеров и механизмам супрессорной активности [9]. Так, для М-МС более характерна продукция активных форм азота, нарушающих активацию ИЛ-2-Р-опосредованных сигнальных путей, и иммуносупрессорного цитокина TGF- $\beta$ . В свою очередь, Г-МС высоко экспрессируют аргиназу-1, снижающую в микроокружении концентрацию аргинина и L-цистеина, необходимых для функционирования Т-лимфоцитов, и являются активными продуцентами активных форм кислорода, ингибирующих синтез  $\zeta$ -цепи Т-клеточного рецептора.

Впервые возрастание субпопуляций МС было зарегистрировано при опухолевом росте. Исследования в этом направлении выявили важную роль МС в развитии иммуносупрессии и опухолевой прогрессии [8]. Позже экспансия МС была выявлена и при других заболеваниях неопухолевой природы, сопровождающихся воспалением, в частности при аутоиммунной патологии. Так, возрастание численности МС было продемонстрировано в моделях коллаген-индуцированного артрита у мышей [15], а также при ревматоидном артрите [5], системной красной волчанке [13], сахарном диабете 1-го типа у человека [12]. Характерно, что данные о функциональной активности МС при указанных патологиях оказались весьма неоднозначны, включая сообщения о сохранной супрессорной активности МС [5], снижении этой функции [12] или ее полном отсутствии [15]. Более того, согласно ряду исследований МС обладали провоспалительной активностью, и их количество прямо коррелировало с активностью аутоиммунного процесса [12].

Анкилозирующий спондилит (АС) среди аутоиммунных заболеваний занимает особое место в связи с выраженным аутовоспалительным компонентом. Это хроническое иммуноопосредованное заболевание, поражающее осевой скелет (и реже суставы), патогенез которого тесно связан с активацией оси ИЛ-23/ИЛ-17 [11]. Исследования в экспериментальных моделях ревматоидного артрита у мышей выявили способность МС индуцировать поляризацию Th17 и при адоптивном переносе усиливать прогрессию заболевания [15]. Кроме того, пул МС может являться источником макрофагов и дендритных клеток [10], которые через продукцию ИЛ-23 способны активировать Th17 лимфоциты. Тем не менее содержание раз-

личных субпопуляций МС и их патогенетическая значимость при АС, остаются практически неисследованными.

Учитывая вышесказанное, **целью настоящей работы** явилось исследование количественного содержания субпопуляций МС у больных с различными клиническими вариантами и активностью АС.

## Материалы и методы

В исследование были включены 37 пациентов с АС (23 мужчины и 14 женщин в возрасте от 19 до 59 лет) и 32 сопоставимых по полу и возрасту здоровых донора (21 мужчина и 11 женщин в возрасте от 21 до 64 лет). Диагностика АС проводилась в соответствии с модифицированными Нью-Йоркскими критериями 1984 года.

Мононуклеарные клетки (МНК) из периферической крови выделяли стандартно методом центрифугирования цельной гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколла-верографина ( $\rho = 1,078$ ). Лизис эритроцитов по необходимости проводили раствором BD Pharm LyseTM в соответствии с инструкцией производителя (BD Biosciences, США). Относительное содержание гранулоцитарных МС (Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD33<sup>+</sup>CD66b<sup>+</sup>), моноцитарных МС (CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low/-</sup>) и МС ранних стадий дифференцировки (Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD33<sup>+</sup>CD66b<sup>-</sup>) оценивали методом проточной цитометрии с использованием анти-Lineage Cocktail 1 (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56; FITC, BD Biosciences), анти-CD14 (FITC, BD Biosciences), анти-CD33 (PE-Cy 5, BD Biosciences, США), анти-CD66b (APC, BioLegend, США), анти-HLA-DR (FITC, Сорбент, Россия; PE, PerCP/Cy 5.5, BD Biosciences) моноклональных антител. Оценку МС проводили по общепринятой методике в соответствии с рекомендациями Bronte и соавт. [1] с использованием параметров прямого и бокового светорассеяния, при этом в область гейтирования включали регион МНК (лимфоциты и моноциты). При оценке Р-МС и Г-МС стратегия гейтирования включала последовательные этапы выделения: а) региона МНК (по прямому и боковому светорассеянию), б) из МНК – гейта клеток, не несущих линейные маркеры (Lin<sup>-</sup>), в) из области (Lin<sup>-</sup>) клеток гейта CD33<sup>+</sup> клеток (по характеристикам бокового светорассеяния и экспрессии CD33), г) из гейта CD33<sup>+</sup> клеток – области HLA-DR<sup>-</sup>CD66b<sup>-</sup> клеток (Р-МС) и HLA-DR<sup>-</sup>CD66b<sup>+</sup> клеток (Г-МС). Для анализа количества М-МС в регионе МНК изучали популяцию CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low/-</sup> клеток.

Анализ проводили после накопления не менее 100 000 событий в регионе Lin<sup>-</sup> клеток, или – при оценке субпопуляции М-МС – не менее 50 000

событий в регионе CD14<sup>+</sup> клеток. Относительное содержание субпопуляций МС представлено в виде процента от общего количества МНК. Абсолютное количество МС рассчитывали исходя из данных общего анализа крови по формуле:

$[(\text{лимфоциты [кл/мкл]} + \text{моноциты [кл/мкл]}) \times \% \text{ субпопуляции МС}] / 100\%$ .

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0. Данные представлены в виде медианных значений (Me) и квартиль-

ного диапазона ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ) %. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический критерий: U-критерий Манна–Уитни. Корреляционный анализ проводили с помощью ранговой корреляции Спирмена (Rs). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты

Основные характеристики больных, включенных в исследование, представлены в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ

TABLE 1. BASELINE CHARACTERISTICS OF PATIENTS

Параметры Parameters	Общая группа Total group	Центральная форма АС Axial AS (1)	Периферическая форма АС Peripheral AS (2)	p* (1-2)
Количество (n) Number (n)	37	10	27	
Пол (муж/жен), % Sex (male/female), %	62/38	80/20	56/44	0,3
Возраст (лет), Me (min-max) Age (years), Me (min-max)	40 (19-59)	37,5 (23-59)	41 (19-59)	0,7
Длительность заболевания (лет), Me (min-max) Disease duration (years), Me (min-max)	12 (1-33)	18 (1-33)	11 (1-31)	0,5
Стадии (развернутая/поздняя), % Stages (advanced/late), %	59,5/40,5	60/40	59,3/40,7	1,0
HLA-B27 (+/-), %	70,3/29,7	90/10	63/37	0,22
ASDAS-СОЭ, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ) ASDAS-ESR, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )	2,7 (1,9-3,8)	2,0 (1,8-3,5)	2,95 (2,0-4,2)	0,3
ASDAS-СРБ, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ) ASDAS-CRP, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )	2,8 (1,9-3,8)	1,95 (1,8-3,3)	2,8 (1,9-4,0)	0,2
BASDAI, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )	3,9 (2,3-5,9)	2,75 (2,0-4,5)	4,3 (2,3-6,2)	0,1
BASFI, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )	3,6 (1,5-5,9)	2,95 (1,4-4,5)	3,8 (1,5-6,3)	0,4
Увеит (+/-), % Uveitis (+/-), %	40,5/59,5	20/80	48,2/51,8	0,2
Терапия: 1-я линия**/2-я линия***, % Therapy: 1 <sup>st</sup> line**/2 <sup>nd</sup> line***, %	59,5/40,5	40/60	66,7/33,3	0,3

Примечание. \* p – достоверность различий между подгруппами больных; \*\* – нестероидные противовоспалительные препараты +/- синтетические базисные противовоспалительные препараты; \*\*\* – нестероидные противовоспалительные препараты + генно-инженерные биологические препараты +/- синтетические базисные противовоспалительные препараты.

Note. \* p, significance of differences between subgroups of patients; \*\*, non-steroidal anti-inflammatory drugs +/- conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drugs; \*\*\*, non-steroidal anti-inflammatory drugs + biologic disease-modifying antirheumatic drugs +/- conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drugs.

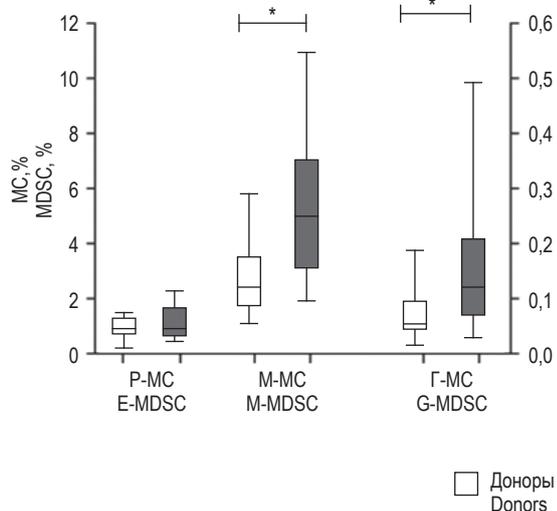
Как видно, группа больных АС состояла из 10 пациентов, не имеющих поражения периферического скелета (центральная форма), и 27 больных с одновременным поражением позвоночника и периферических суставов (периферическая форма). Пациенты указанных подгрупп не отличались по полу, возрасту, длительности заболевания, стадии, доле HLA-B27-позитивных случаев, частоте встречаемости увеита, активности заболевания и функциональным нарушениям. Значимых различий в проводимой терапии между группами также не выявлялось. Тем не менее отмечалась тенденция к более частому назначению генно-инженерной биологической терапии (ГИБТ) в группе больных с центральной формой и более частому назначению базисных противовоспалительных препаратов (метотрексат, сульфасалазин) у больных периферической формой.

Исследование субпопуляций МС (рис. 1А) выявило 2-кратное увеличение относительного количества гранулоцитарных и моноцитарных МС у больных АС при отсутствии изменений Р-МС по сравнению со здоровыми донорами. Учитывая более высокое абсолютное количество МНК

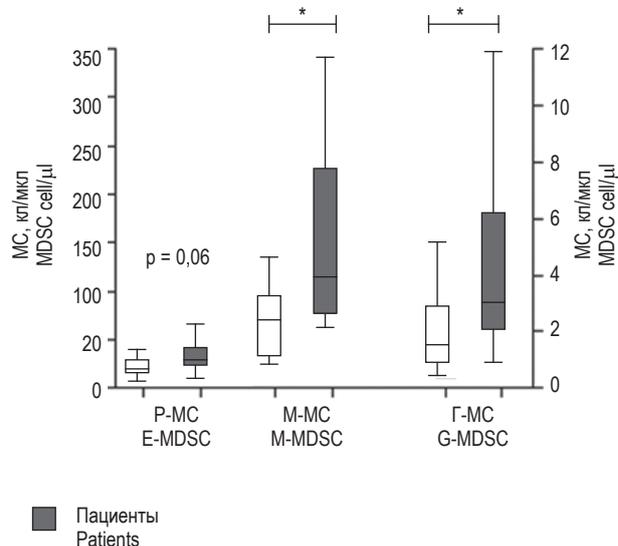
у больных (Me 2,8 (2,4-3,2) против 2,5 (2,2-2,8)  $\times 10^3$ кл/мкл,  $p = 0,03$ ), абсолютное содержание Г-МС и М-МС было также значительно повышенным (рис. 1Б). Повышение абсолютного количества Р-МС было умеренно выраженным и проявлялось на уровне тренда.

На следующем этапе был проведен анализ взаимосвязи количества МС с такими факторами, как пол, возраст, генетическая предрасположенность и тип терапии у больных АС. Поскольку пациенты с центральной и периферической формой АС по данным показателям были сопоставимы (табл. 1), анализ проводился в общей группе пациентов (табл. 2). Относительное содержание Р-МС, Г-МС и М-МС у мужчин и женщин значительно не различалось. Также мы не выявили различий в содержании МС в зависимости от возраста. Показатели относительного и абсолютного содержания МС в подгруппах моложе и старше 40 лет (медиана возраста) были схожи. При сравнении пациентов, позитивных и негативных по HLA-B27 антигену, относительное и абсолютное содержание Г-МС и М-МС не различалось между оппозиционными подгруппами.

А (А)



Б (Б)



**Рисунок 1. Субпопуляционный состав миелоидных супрессорных клеток у здоровых доноров и больных анкилозирующим спондилитом**

**Примечание.** Представлены данные относительного (А) и абсолютного (Б) содержания ранних (Р-МС), моноцитарных (М-МС) и гранулоцитарных (Г-МС) миелоидных супрессорных клеток у здоровых доноров и больных анкилозирующим спондилитом. Здесь и далее данные приведены в виде медианы (Me), интерквартильного диапазона и диапазона значений 10-90 перцентилей. \*  $p_0 < 0,05$  – достоверность различий между показателями.

Figure 1. Myeloid-derived suppressor cell subpopulations in healthy donors and patients with ankylosing spondylitis

Note. The data on the frequency (A) and absolute (B) count of early (E-MDSC), monocytic (M-MDSC) and granulocytic (G-MDSC) myeloid-derived suppressor cells in healthy donors and patients with ankylosing spondylitis are presented. Hereinafter, the data are presented as median (Me), interquartile range and 10-90% percentiles. \*  $p_0 < 0.05$ , significance of differences between parameters.

**ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ С УЧЕТОМ КЛИНИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПАЦИЕНТОВ С АНКИЛОЗИРУЮЩИМ СПОНДИЛИТОМ, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

**TABLE 2. CONTENT OF MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELL SUBPOPULATIONS IN PERIPHERAL BLOOD ACCORDING TO THE CLINICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

Параметры Parameters		P-МС E-MDSC		Г-МС G-MDSC		M-МС M-MDSC	
		%	кл/мкл cell/ $\mu$ l	%	кл/мкл cell/ $\mu$ l	%	кл/мкл cell/ $\mu$ l
Пол Sex	Мужчины Male	0,95 (0,6-1,6)	31,3 (17,3-40,5)	0,12 (0,06-0,21)	2,8 (1,5-6,2)	5,0 (3,2-6,7)	139,6 (73,4-217,3)
	Женщины Female	0,93 (0,7-1,9)	26,6 (23,9-42,9)	0,13 (0,07-0,17)	3,5 (2,2-5,2)	4,8 (3,0-7,8)	111,9 (74,6-249,5)
	p*	0,9	0,95	0,95	0,6	0,9	0,9
Возраст Age	< 40 лет < 40 years	0,96 (0,7-1,1)	28,2 (23,9-32,3)	0,12 (0,06-0,17)	2,8 (1,7-6,2)	5,0 (3,0-6,3)	112,9 (106,0-153,4)
	≥ 40 лет ≥ 40 years	0,93 (0,6-2,1)	30,3 (17,7-49,3)	0,13 (0,07-0,23)	3,5 (2,2-6,1)	5,3 (3,0-8,9)	132,2 (72,7-259,1)
	p	0,9	0,5	0,9	0,7	0,6	0,6
HLA-B27	(-)	0,98 (0,7-2,1)	28,3 (24,0-33,5)	0,15 (0,06-0,24)	3,6 (2,1-6,2)	3,0 (2,0-5,6)	108,0 (62,5-112,9)
	(+)	0,9 (0,6-1,6)	29,8 (19,6-41,5)	0,12 (0,07-0,19)	2,9 (2,0-6,1)	5,0 (3,0-7,0)	139,9 (93,3-223,4)
	p	0,8	0,9	0,9	0,9	0,1	0,1
Терапия Therapy	1-я линия** 1 <sup>st</sup> line**	0,97 (0,7-1,5)	28,4 (13,5-35,8)	0,11 (0,07-0,24)	2,9 (1,97-6,20)	4,5 (2,8-7,0)	111,9 (71,9-153,3)
	2-я линия*** 2 <sup>nd</sup> line***	0,8 (0,6-1,9)	24,9 (21,8-46,4)	0,14 (0,05-0,17)	3,5 (2,0-6,2)	5,0 (3,2-10,0)	174,3 (108,0-268,8)
	p	0,7	0,8	0,9	0,9	0,3	0,8

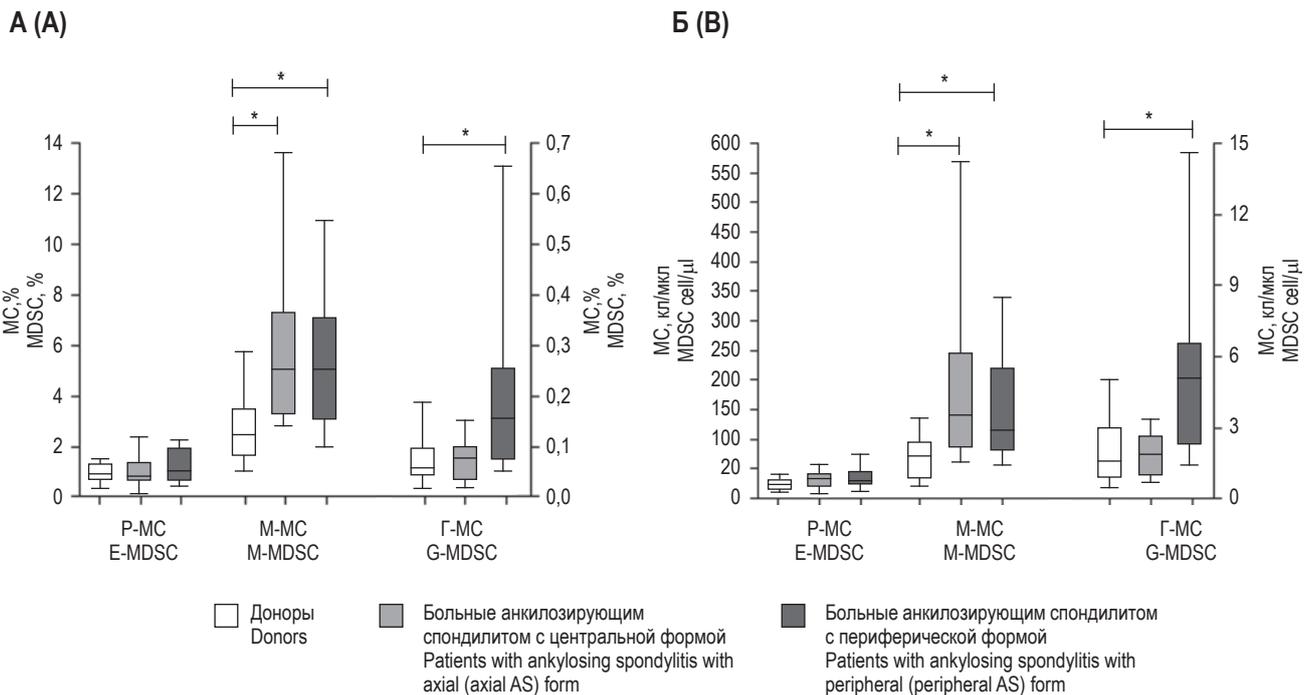
Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ГИБП в два раза чаще использовались в группе больных с центральной формой АС, поэтому мы изучили влияние лечения на содержание МС. Показатели относительного и абсолютного содержания МС не отличались в подгруппах пациентов, получающих препараты 1-й и 2-й линий.

Сравнительный анализ МС у пациентов с центральной и периферической формой АС выявил более высокое количество относительного и абсолютного количества М-МС в обеих подгруппах по сравнению со здоровыми донорами. В то же время повышенное содержание Г-МС регистрировалось только у больных АС с вовлечением периферических суставов (рис. 2).

Поскольку индексы активности ASAS и BASDAI у пациентов с периферической формой АС были выше (табл. 1), чем у больных с центральной формой, представлялось важным исследовать возможную взаимосвязь Г-МС с активностью заболевания. Для этого мы сравнили содержание Г-МС у пациентов с периферической формой АС в подгруппах с низкой и высокой активностью заболевания. Видно, что повышенное количество Г-МС отмечалось как в подгруппе пациентов с низкой/умеренной (ASDAS < 2,1), так и высокой/очень высокой активностью (ASDAS ≥ 2,1) и было сходным в сравниваемых подгруппах (рис. 3В, Г).



**Рисунок 2. Миелоидные супрессорные клетки у больных разными клиническими формами анкилозирующего спондилита**

**Примечание.** Представлены данные относительного (А) и абсолютного (Б) содержания ранних (Р-МС) и моноцитарных (М-МС) и гранулоцитарных (Г-МС) миелоидных супрессорных клеток у доноров (donors), больных анкилозирующим спондилитом с центральной (axial AS) и периферической (peripheral AS) формами. \*  $p_U < 0,05$  – достоверность различий между показателями.

Figure 2. Myeloid-derived suppressor cells in patients with different clinical forms of ankylosing spondylitis

Note. The data on the frequency (A) and absolute (B) count of early (E-MDSC), monocytic (M-MDSC) and granulocytic (G-MDSC) myeloid-derived suppressor cells in donors, patients with ankylosing spondylitis with axial (axial AS) and peripheral (peripheral AS) forms. \*  $p_U < 0.05$ , significance of differences between parameters.

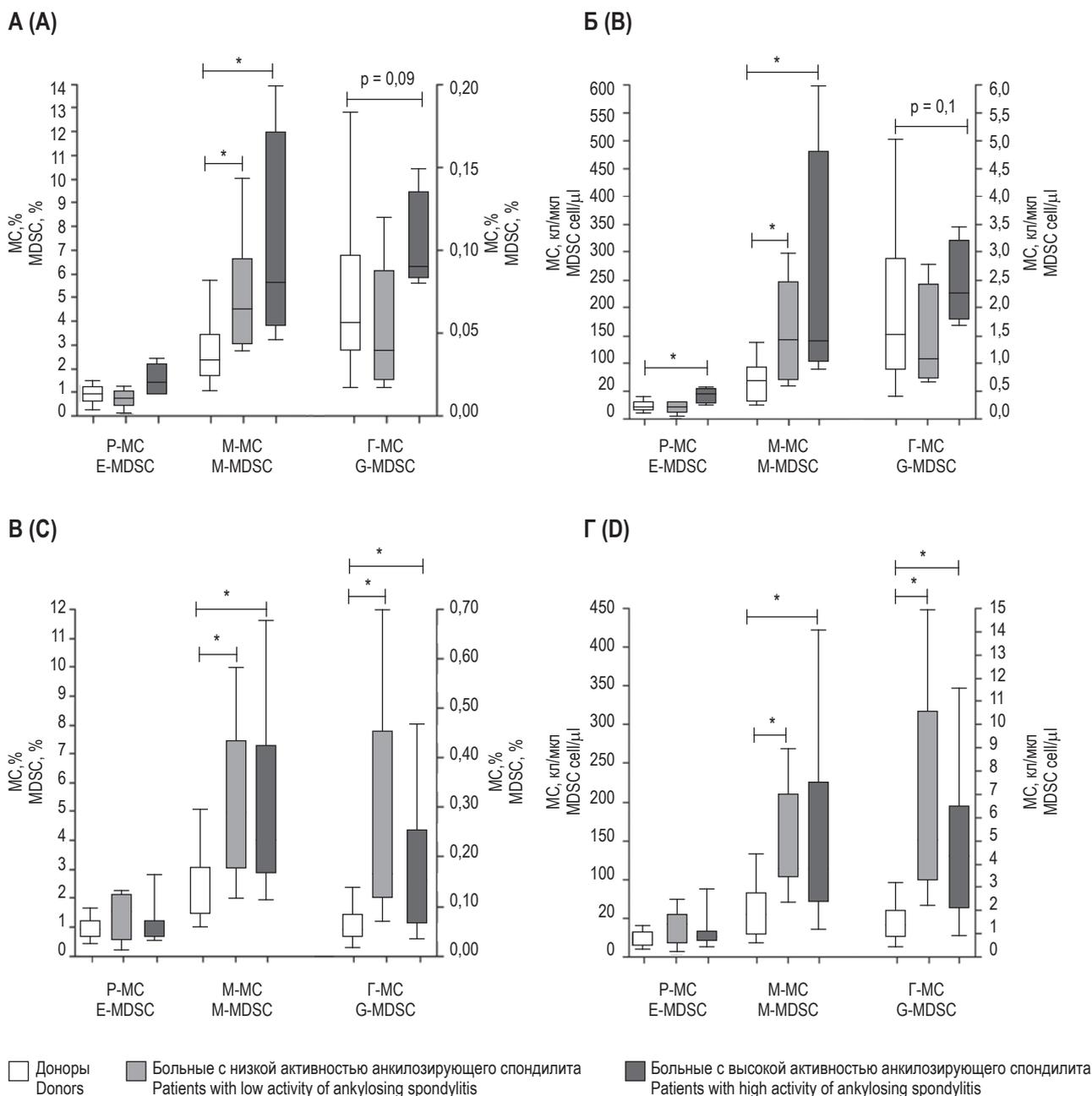
В то же время анализ взаимосвязи количества Г-МС и активности заболевания при центральной форме АС (рис. 3А, Б) показал, что пациенты с высокой/очень высокой активностью характеризовались тенденцией к более высокому относительному и абсолютному количеству Г-МС, тогда как в подгруппе с низкой/умеренной активностью изменений в количестве Г-МС не наблюдалось. Таким образом, при центральной форме АС содержание Г-МС ассоциировалось с активностью заболевания.

При анализе взаимосвязи М-МС с активностью заболевания выяснилось, что значимое увеличение количества М-МС при центральной форме АС обнаруживается у пациентов как с низкой/умеренной, так и высокой/очень высокой активностью (рис. 3А, Б). Тем не менее медианные и интерквартильный диапазон значений относительного количества М-МС в подгруппе с высокой/очень высокой активностью были выше, чем в оппозитной подгруппе, однако эти различия не были статистически значимыми ( $p = 0,3$ ). В то же

время у пациентов с периферической формой АС количество М-МС в подгруппах с низкой и высокой активностью было одинаково повышенным по сравнению с аналогичным показателем в группе здоровых доноров (Me 5,0 (3,0-7,0) и 4,0 (3,0-7,0) против 2,4 (1,6-3,5) % соответственно) (рис. 3В, Г).

Оценка содержания Р-МС среди МНК в зависимости от активности заболевания показала, что значимое повышение абсолютного количества Р-МС было характерно только для больных центральной формой АС с высокой активностью (рис. 3Б).

Обнаруженные нами особенности содержания субпопуляций МС в периферической крови больных АС с учетом активности заболевания и в зависимости от формы АС также подтверждались данными корреляционного анализа, в частности наличием значимой прямой корреляционной связи между относительным содержанием Г-МС и индексом активности BASDAI у пациентов с центральным АС и отсутствием таковой при пе-



**Рисунок 3. Миелоидные супрессорные клетки у больных разной степени активности анкилозирующего спондилита**

**Примечание.** Представлены данные относительного (А, В) и абсолютного (Б, Г) содержания ранних (Р-МС), моноцитарных (М-МС) и гранулоцитарных (Г-МС) миелоидных супрессорных клеток у доноров (donors), больных с низкой (low) и высокой (high) активностью анкилозирующего спондилита с центральной (А, Б) и периферической (В, Г) формами. \*  $p_0 < 0,05$  – достоверность различий между показателями.

Figure 3. Myeloid-derived suppressor cells in patients with varying activity scores of ankylosing spondylitis

Note. The data on the frequency (A, C) and absolute (B, D) count of early (E-MDSC), monocytic (M-MDSC) and granulocyte (G-MDSC) myeloid-derived suppressor cells in donors, patients with low and high activity of ankylosing spondylitis with axial (A, B) and peripheral (C, D) forms.

\*  $p_0 < 0,05$ , significance of differences between parameters.

риферической форме АС (табл. 3). Аналогичным образом статистически значимая положительная связь относительного содержания М-МС с ASDAS-СОЭ и на уровне тренда с СОЭ выявлялась у пациентов с центральной формой АС и

отсутствовала у больных с периферической формой АС. Прямая корреляционная взаимосвязь между содержанием Р-МС и индексами активности BASDAI, ASDAS-СРБ выявлялась на уровне тренда только при центральной форме АС.

**ТАБЛИЦА 3. КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОСВЯЗИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АКТИВНОСТИ АНКИЛОЗИРУЮЩЕГО СПОНДИЛИТА И СОДЕРЖАНИЯ МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК**

TABLE 3. CORRELATION ANALYSIS OF THE RELATIONSHIP BETWEEN THE ACTIVITY SCORES OF ANKYLOSING SPONDYLITIS AND THE FREQUENCY OF MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS

Параметры Parameters	P-МС E-MDSC		M-МС M-MDSC		Г-МС G-MDSC	
	Центральная форма Axial AS	Периферическая форма Peripheral AS	Центральная форма Axial AS	Периферическая форма Peripheral AS	Центральная форма Axial AS	Периферическая форма Peripheral AS
СОЭ ESR	0,36	-0,04	0,55	-0,04	0,26	-0,03
p*	0,3	0,85	0,098	0,86	0,47	0,87
СРБ CRP	0,47	-0,07	0,2	-0,01	0,15	0,18
p	0,17	0,73	0,58	0,96	0,67	0,37
BASDAI	0,58	-0,02	0,04	-0,17	0,65	-0,06
p	0,08	0,93	0,92	0,39	0,04	0,75
ASDAS-СОЭ ASDAS-ESR	0,23	0,06	0,73	-0,12	0,17	-0,04
p	0,53	0,77	0,02	0,55	0,65	0,85
ASDAS-СРБ ASDAS-CRP	0,56	0,004	0,3	-0,11	0,55	-0,07
p	0,09	0,98	0,38	0,58	0,1	0,71

Примечание. Данные представлены в виде коэффициента корреляции Спирмена. \* p – достоверность различий между подгруппами больных.

Note. Data are presented as Spearman's correlation coefficient. \* p, significance of differences between subgroups of patients.

## Обсуждение

Полученные нами в целом данные свидетельствуют о возрастании относительного и абсолютного количества М-МС и Г-МС при АС. Причем такие факторы, как пол пациентов, возраст и экспрессии HLA-B27, не влияют на уровень этих клеток в периферической крови. Повышенное количество М-МС регистрируется у пациентов как с центральной, так и периферической формой АС. В то же время экспансия Г-МС характерна только для пациентов с вовлечением периферических суставов. Относительное содержание Р-МС, М-МС и Г-МС при центральной форме АС прямо коррелирует с активностью заболевания, тогда как увеличение доли Г-МС при периферической форме АС не связано с активностью воспалительного процесса.

Согласно данным литературы, экспансия МС при аутоиммунном воспалении обусловлена повышенной концентрацией медиаторов воспаления (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IL-17, S100A8, S100A9) и CSF (G-CSF, GM-CSF), которые стимулируют миелопоэз, блокируют дифференцировку незрелых миелоидных предшественников на периферии, а также индуцируют супрессорную активность и выживаемость МС [9]. Другим механизмом может быть репрограммирование зрелых моноцитов и нейтрофилов в МС под действием провоспалительных медиаторов [7]. Это подтверждается возможностью генерации иммуносупрессивных М-МС из моноцитов с использованием GM-CSF в комбинации с IL-6, IL-1, IL-4 и PGE2 [2]. Поскольку АС характеризуется повышенной концентрацией многих провоспалительных медиаторов [11], что обуславливает высокую эффективность лечения ингибиторами TNF $\alpha$  и

IL-17, данная патология также может сопровождаться увеличением численности МС. Действительно, недавно появилось первое сообщение, в котором Liu с соавторами показали возрастание М-МС и Г-МС у больных АС [6], что согласуется с нашими данными. Однако в отличие от Liu мы также исследовали уровень Р-МС и показали выраженную тенденцию к возрастанию абсолютно количества этих клеток при АС. Другим новым фактом, выявленным в настоящей работе, стали данные о том, что среди различных факторов большое значение, по-видимому, имеет клинический фенотип АС, поскольку возрастание Г-МС регистрировалось только в группе пациентов с вовлечением периферических суставов.

Несмотря на то, что накопление МС в циркуляции и очагах воспаления выявлено при многих аутоиммунных заболеваниях, роль этих клеток в патогенезе аутоиммунного воспаления остается неясной, МС могут обладать как противовоспалительной, так и провоспалительной активностью [9]. Такая функциональная дихотомия МС похоже не связана с субпопуляционной принадлежностью к моноцитарным или гранулоцитарным МС, так как указанные субпопуляции, хотя и различаются по механизмам супрессорной активности [9], могут превращаются друг в друга и даже в другие клетки, например, остеокласты [14].

У больных АС доля МС по данным Liu прямо коррелировала с активностью заболевания, однако такая взаимосвязь была выявлена только в отношении М-МС. В то же время в нашем исследовании прямая корреляция с активностью заболевания прослеживалась для всех субпопуляций МС, но только у больных центральной формой

АС. Причем выявленная положительная корреляция Р-МС с показателями активности у больных центральной формой АС позволяет говорить и о вовлеченности данной субпопуляции в патогенез центральной формы АС. Полученные в нашем исследовании различия могут быть связаны с тем, что в исследовании Liu анализ проводился в общей группе пациентов без учета клинической формы. Кроме того, поскольку на сегодняшний день не существует единого подхода к характеристике фенотипа субпопуляций МС, выявленные различия также могут быть обусловлены особенностями гейтирования при оценке субпопуляций МС.

Обнаруженная прямая корреляционная связь между содержанием МС и активностью заболевания позволяет предполагать снижение супрессорной активности и/или появление провоспалительной активности у миелоидных предшественников. По данным литературы, МС в условиях хронического воспаления могут продуцировать провоспалительные цитокины [4] и способствовать дифференцировке Th17-лимфоцитов [15]. Действительно, Liu, несмотря на наличие супрессорной активности М-МС, выявил прямую корреляционную связь между долей этих клеток и уровнем IL-17 в сыворотке больных АС, основным источником которого могут являться Th17-лимфоциты. Функциональная активность МС в нашем исследовании не оценивалась, что является ограничением настоящей работы. Дальнейший анализ экспрессии молекул, опосредующих супрессорную активность (ARG-1, IDO, PDL-1) МС, позволит ответить на ряд вопросов относительно супрессорного потенциала различных субпопуляций МС у больных АС.

## Список литературы / References

1. Bronte V, Brandau S, Chen S, Colombo M.P, Frey A.B, Greten T.F, Mandruzzato S, Murray P.J, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, Rodriguez P.C., Sica A., Umansky V., Vonderheide R.H., Gabrilovich D.I. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat. Commun.*, 2016, Vol. 7, 12150. doi: 10.1038/ncomms12150.
2. Casacuberta-Serra S., Parés M., Golbano A., Coves E., Espejo C., Barquinero J. Myeloid-derived suppressor cells can be efficiently generated from human hematopoietic progenitors and peripheral blood monocytes. *Immunol. Cell Biol.*, 2017, Vol. 95, no. 6, pp. 538-548.
3. Gabrilovich D.I. Myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunol. Res.* 2017, Vol. 5, no. 1, pp. 3-8.
4. Guo C., Hu F., Yi H., Feng Z., Li C., Shi L., Li Y., Liu H., Yu X., Wang H., Li J., Li Z., Wang X. Myeloid-derived suppressor cells have a proinflammatory role in the pathogenesis of autoimmune arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2014, Vol. 75, pp. 278-285.
5. Jiao Z., Hua S., Wang W., Wang H., Gao J., Wang X. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlated negatively with Th17 cells in patients with rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.*, 2013, Vol. 42, no. 2, pp. 85-90.
6. Liu Y., Zhuang K., Chen B., Li P., Zhou X., Jiang H., Zhong L., Liu F. Expansion and activation of monocytic-myeloid-derived suppressor cell via STAT3/arginase-I signaling in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Res. Ther.*, 2018, Vol. 20, no. 1, 168. doi: 10.1186/s13075-018-1654-4.

7. Millrud C.R., Bergenfelz C., Leandersson K. On the origin of myeloid-derived suppressor cells. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 2, pp. 3649-3665.
8. Motallebnezhad M., Jadidi-Niaragh F., Qamsari E.S., Bagheri S., Gharibi T., Yousefi M. The immunobiology of myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Tumor Biol.*, 2016, Vol. 37, no. 2, pp. 1387-1406.
9. Rajabinejad M., Salari F., Karaji A.G., Rezaeiemanesh A. The role of myeloid-derived suppressor cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis; anti- or pro-inflammatory cells? *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, 2019, Vol. 47, no. 1, pp. 4149-4158.
10. Tcyganov E., Mastio J., Chen E., Gabrilovich D.I. Plasticity of myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Curr. Opin. Immunol.*, 2018, Vol. 51, pp. 76-82.
11. Tsukazaki H., Kaito T. The Role of the IL-23/IL-17 Pathway in the pathogenesis of spondyloarthritis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, Vol. 21, no. 17, 6401. doi: 10.3390/ijms21176401.
12. Whitfield-Larry F., Felton J., Buse J., Su M.A. Myeloid-derived suppressor cells are increased in frequency but not maximally suppressive in peripheral blood of type 1 diabetes mellitus patients. *Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 153, no. 1, pp.156-164.
13. Wu H., Zhen Y., Ma Z., Li H., Yu J., Xu Z.G., Wang X.-Y., Yi H., Yang Y.-G. Arginase-1-dependent promotion of TH17 differentiation and disease progression by MDSCs in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.*, 2016, Vol. 8, no. 331, 331ra40. doi: 10.1126/scitranslmed.aae048.
14. Zhang H., Huang Y., Wang S., Fu R., Guo C., Wang H., Zhao J., Gaskin F., Chen J., Yang N., Fu S.M. Myeloid-derived suppressor cells contribute to bone erosion in collagen-induced arthritis by differentiating to osteoclasts. *J. Autoimmun.*, 2015, Vol. 65, pp. 82-89.
15. Zhanga H., Wanga S., Huangb Y., Wanga H., Zhaoa J., Gaskinc F., Yanga N., Fud S.M. Myeloid-derived suppressor cells are proinflammatory and regulate collagen-induced arthritis through manipulating Th17 cell differentiation. *Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 157, no. 2, pp. 175-186.

**Авторы:**

**Моренкова А.Ю.** — аспирант лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

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

**Тыринова Т.В.** — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Баторов Е.В.** — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Сизиков А.Э.** — к.м.н., заведующий отделением ревматологии клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Authors:**

**Morenkova A.Yu.**, Postgraduate Student, 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

**Tyrinova T.V.**, PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Batorov E.V.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Sizikov A.E.**, PhD (Medicine), Head, Department of Rheumatology, Clinics of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Чумасова О.А.** — к.м.н., врач-ревматолог отделения ревматологии клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Сулутьян А.Э.** — к.м.н., врач-ревматолог отделения ревматологии клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

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

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

**Chumasova O.A.**, PhD (Medicine), Clinical Rheumatologist, Department of Rheumatology, Clinics of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Sulutyan A.E.**, PhD (Medicine), Clinical Rheumatologist, Department of Rheumatology, Clinics of Immunopathology, 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 16.10.2020  
Принята к печати 10.01.2021

Received 16.10.2020  
Accepted 10.01.2021

---

## АНГИОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ НЕЙТРОФИЛОВ ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ КРОВИ ПРИ РАКЕ ЭНДОМЕТРИЯ

Абакумова Т.В.<sup>1</sup>, Генинг Т.П.<sup>1</sup>, Генинг С.О.<sup>1</sup>, Антонеева И.И.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

<sup>2</sup> ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер» г. Ульяновск, Россия

**Резюме.** Нейтрофилы играют важную роль в канцерогенезе, опосредуя воспаление, иммуносупрессию и метастазирование, а также показана двоякая роль нейтрофилов в регуляции ангиогенеза. Рак эндометрия является наиболее распространенным злокачественным новообразованием женской репродуктивной системы. С целью оценки ангиогенного потенциала в лизате нейтрофилов периферической крови больных раком эндометрия и с миомой матки (группа сравнения) методом ИФА оценивали уровень воспалительных и ангиогенных цитокинов (VEGF-A, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-6). В ядерной фракции нейтрофилов определяли экспрессию ядерного фактора NF- $\kappa$ B. В исследуемых группах оценивали отношение нейтрофилов к лимфоцитам (NLR). Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием ПО Statistica 10.

Установлено отсутствие значимых изменений NLR при раке эндометрия, по сравнению с контролем, и при миоме. Экспрессия NF- $\kappa$ B и VEGF были повышены по сравнению с контролем на всех изученных стадиях рака эндометрия и при миоме матки. Наблюдалась изменение уровня NF- $\kappa$ B в нейтрофилах в зависимости от дифференцировки опухоли. Между содержанием VEGF и NF- $\kappa$ B в нейтрофилах выявлена регрессионная взаимосвязь. Нами выявлено повышение уровня IL-1 $\beta$  и IL-6 в нейтрофилах при миоме матки и на разных стадиях рака эндометрия по сравнению с контролем. Уровень IL-1 $\beta$  был выше в нейтрофилах пациенток с умеренной и низкой дифференцировкой опухоли в сравнении с высокой.

IL-17A в лизате нейтрофилов был значимо снижен при миоме матки и на разных стадиях рака эндометрия по сравнению с контролем.

Отмечена умеренная обратная корреляционная связь между содержанием в нейтрофилах VEGF и IL-6 ( $r = -0,426$ ;  $p = 0,001$ ); заметная обратная связь между VEGF и IL-17A ( $r = -0,615$ ;  $p < 0,001$ ).

Комбинация показателей IL-6 и IL-17A в лизате нейтрофилов (по результатам мультивариантного анализа) может быть использована для дифференциальной диагностики рака эндометрия и миомы матки.

Таким образом, различия в экспрессии нейтрофилами воспалительных и ангиогенных цитокинов, входящих в NF- $\kappa$ B-зависимый сигналинг, свидетельствует о приобретении проопухолевых функций нейтрофилами при прогрессировании рака эндометрия.

*Ключевые слова:* рак эндометрия, миома матки, нейтрофилы, VEGF-A, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-6, NF- $\kappa$ B-сигналинг, ангиогенез

### Адрес для переписки:

Абакумова Татьяна Владимировна  
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет»  
432017, Россия, г. Ульяновск,  
ул. Архитектора Ливчака, 2.  
Тел./факс: 8 (8422) 32-70-71.  
E-mail: taty-abakumova@yandex.ru

### Address for correspondence:

Abakumova Tatyana V.  
Ulyanovsk State University  
432017, Russian Federation, Ulyanovsk, Arch. Livchak str., 2.  
Phone/fax: 7 (8422) 32-70-71.  
E-mail: taty-abakumova@yandex.ru

### Образец цитирования:

Т.В. Абакумова, Т.П. Генинг, С.О. Генинг, И.И. Антонеева «Ангиогенный потенциал нейтрофилов циркулирующей крови при раке эндометрия» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 2. С. 339-344.  
doi: 10.15789/1563-0625-APO-2163

© Абакумова Т.В. и соавт., 2021

### For citation:

T.V. Abakumova, T.P. Gening, S.O. Gening, I.I. Antoneeva "Angiogenic potential of circulating blood neutrophils in endometrial cancer", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 2, pp. 339-344.  
doi: 10.15789/1563-0625-APO-2163

DOI: 10.15789/1563-0625-APO-2163

## ANGIOGENIC POTENTIAL OF CIRCULATING BLOOD NEUTROPHILS IN ENDOMETRIAL CANCER

Abakumova T.V.<sup>a</sup>, Gening T.P.<sup>a</sup>, Gening S.O.<sup>a</sup>, Antoneeva I.I.<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Ulyanovsk Regional Clinical Oncology Center, Ulyanovsk, Russian Federation

**Abstract.** Neutrophils play an important role in carcinogenesis, mediating inflammation, immunosuppression and metastasis. A dual role of neutrophils in regulation of angiogenesis has been shown. Endometrial cancer is the most common malignant neoplasm of the female reproductive system. To assess the cellular angiogenic potential, we determined the levels of inflammatory and angiogenic cytokines (VEGF-A, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-6) in cell lysate of peripheral blood neutrophils in the patients with endometrial cancer, and with uterine myoma (comparison group). Expression of the nuclear factor- $\kappa$ B was determined. In nuclear fraction of neutrophils. The neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) was assessed in the studied groups. Statistical processing of the obtained data was carried out using Statistica 10 software. We have not found any significant changes in NLR in endometrial cancer, compared with controls and the uterine myoma groups. Expression of NF- $\kappa$ B and VEGF was increased as compared to the control for all the studied stages of endometrial cancer and in uterine myoma. There was a change in NF- $\kappa$ B level in neutrophils, depending on the tumor differentiation grade. A regression relationship was found between the content of VEGF and NF- $\kappa$ B in neutrophils. We have found increased IL-1 $\beta$  and IL-6 levels in neutrophils of the uterine myoma patients, and at different stages of endometrial cancer compared with control. The IL-1 $\beta$  level was higher in neutrophils of the patients with intermediate and high tumor grade, compared to low-grade cases. IL-17A expression in the neutrophil lysate was significantly reduced in uterine myoma and at different stages of endometrial cancer, as compared with controls. There was a moderate inverse correlation between the contents of VEGF and IL-6 in neutrophils ( $r = -0.426$ ,  $p = 0.001$ ); a remarkable inverse relationship between VEGF and IL-17A ( $r = -0.615$ ,  $p < 0.001$ ). The combination of IL-6 and IL-17A levels in the neutrophils lysate (according to the results of multivariate analysis) may be used for the differential diagnosis of endometrial cancer and uterine myoma. Thus, the differences in the expression of inflammatory and angiogenic cytokines included in NF- $\kappa$ B-dependent signaling, may point to acquisition of pro-tumor functions by neutrophils during the endometrial cancer progression.

*Keywords:* endometrial cancer, myoma, neutrophils, VEGF-A, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-6, NF- $\kappa$ B-signaling, angiogenesis

### Введение

Рак эндометрия (РЭ) является наиболее распространенным злокачественным новообразованием женской репродуктивной системы в развитых странах и единственным гинекологическим раком с растущей заболеваемостью (+1,3% в год за последние 10 лет) и смертностью [15, 20]. Нейтрофилы (Нф), являясь наиболее многочисленной популяцией среди лейкоцитов [7], играют важную роль в канцерогенезе, опосредуя воспаление, иммуносупрессию и метастазирование [9, 25]. На сегодня показана двоякая роль Нф в регуляции ангиогенеза. С одной стороны, они инициируют синтез и высвобождение проангиогенных факторов – V $\alpha$ 8, фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A), матриксной металлопротеиназы-9, а также цитокинов, в том числе и при РЭ [3, 22]. В то же время, Нф могут секретировать эластазу и  $\alpha$ -дефенсины, которые инактивируют проангиогенные факторы [18]. Участие Нф в процессе воспаления реализуется через NF- $\kappa$ B-сигналинг [13]. Активация NF- $\kappa$ B-сигналинга в Нф может способствовать стимуляции синтеза провоспалительных цитокинов [17], способных прямо или косвенно способствовать росту и ми-

грации эндотелиальных клеток [21]. В связи с этим **целью исследования** явилась оценка ангиогенного потенциала нейтрофилов циркулирующей крови при РЭ.

### Материалы и методы

Объектом исследования явились Нф циркулирующей крови первичных больных РЭ на стадии I (начальный РЭ) ( $n = 27$ ), и II-III (локализованный РЭ) ( $n = 12$ ) по международной классификации FIGO. Пациентки с миомой тела матки ( $n = 20$ ) служили группой сравнения. Средний возраст пациенток с миомой матки составил  $48,8 \pm 6,3$  (41-59) и с РЭ –  $60,8 \pm 9,2$  (37-77) лет. В контрольную группу вошли 22 практически здоровых женщин-донора (23-65 лет) (табл. 1).

Уровень воспалительного ответа при прогрессировании РЭ оценивали по отношению нейтрофилов к лимфоцитам (NLR). Кровь забирал стандартным способом у больных после постановки диагноза до начала лечения. Для приготовления лизата Нф клетки выделяли из 5 мл гепаринизированной крови в двойном градиенте плотности фиколл-урографина ( $r = 1,117$  и  $1,077$  г/мл). Взвесь Нф трижды отмывали физио-

логическим раствором. Чистота фракции Нф составляла 92-94%. Жизнеспособность Нф в тесте с 0,5%-ным трипановым синим составляла 95%. С помощью ИФА в лизате Нф крови определяли уровень IL-17A (ООО «Цитокин»), VEGF-A, IL-1 $\beta$ , IL-6 (ЗАО «Вектор-Бест-Волга», Россия), в ядерной фракции Нф – экспрессию ядерного фактора NF- $\kappa$ B (eBioscience, США). Исследование проведено согласно требованиям комиссии по этике ИМЭиФК УлГУ (протокол № 3 от 15.03.2015). Совокупности количественных показателей, распределение которых отличалось от нормального, описывались при помощи значений медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ). Статистическая значимость различий оценивалась при помощи ANOVA, U-критерия Манна–Уитни. С целью изучения связи между количественными переменными использовался расчет коэффициента корреляции Спирмена. Для оценки диагностического потенциала изученных показателей использовалась бинарная логистическая регрессия и построение ROC-кривой.

## Результаты

Установлено отсутствие значимых изменений NLR (медиана 2,37, IQR,  $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ) при РЭ по сравнению с показателями в контроле (медиана 2,22, IQR,  $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ) и в группе сравнения (медиана 2,54, IQR,  $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ). Экспрессия NF- $\kappa$ B в ядерной фракции Нф была повышена по сравнению с контролем как при миоме матки ( $p = 0,0001$ ), так и на всех изученных стадиях РЭ ( $p = 0,0001$  при I стадии РЭ и  $p = 0,0001$  при II-III стадиях РЭ). При II-III стадиях экспрессия NF- $\kappa$ B в Нф была выше, чем при начальном РЭ ( $p = 0,006$ ) (табл. 2). Наблюдалась тенденция к повышению уровня NF- $\kappa$ B в Нф при умеренной и низкой дифференцировке РЭ в сравнении с высокой дифференцировкой ( $p = 0,089$ ).

В результате проведенного нами исследования выявлено повышение уровня VEGF в лизате Нф при миоме ( $p = 0,0001$ ) и на начальной стадии РЭ ( $p = 0,0004$ ) по сравнению с контрольной группой. На II-III стадиях РЭ уровень VEGF в лизате Нф повышался относительно такового в контроле ( $p = 0,0001$ ), в группе с миомой ( $p = 0,0001$ ) и с начальной стадией РЭ ( $p = 0,0001$ ) (табл. 2). Между содержанием VEGF и NF- $\kappa$ B в Нф наблюдалась регрессионная взаимосвязь ( $p = 0,001$ ).

Нами выявлено повышение уровня IL-1 $\beta$  в Нф при миоме матки ( $p = 0,0001$ ), РЭ I стадии ( $p = 0,0005$ ) и локализованном РЭ ( $p = 0,0004$ ) по сравнению с показателями контрольной группы. На I и II-III стадиях РЭ уровень IL-1 $\beta$  в Нф значимо не отличался от такового при миоме матки ( $p = 0,140$  и  $p = 0,270$  соответственно) (рис. 1). Кроме того, уровень IL-1 $\beta$  был выше в Нф пациенток с умеренной и низкой диффе-

**ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОК С РЭ, ВКЛЮЧЕННЫХ В ИССЛЕДОВАНИЕ**

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH ENDOMETRIAL CANCER INCLUDED IN THE STUDY

Характеристика Characteristic	Число пациенток (%) Number of patients (%)
<b>Средний возраст, медиана 60 лет (IQR, <math>Q_{0,25}</math>-<math>Q_{0,75}</math>; 57,5-64,5), n = 39 (100%) Average age, median 60 years (IQR, <math>Q_{0,25}</math>-<math>Q_{0,75}</math>; 57,5-64,5), n = 39 (100%)</b>	
<b>Стадия FIGO FIGO stage</b>	
1	27 (69,2)
2	7 (17,9)
3	5 (12,8)
<b>Дифференцировка опухоли Tumor differentiation</b>	
<b>высокая high</b>	16 (41,0)
<b>низкая low</b>	5 (12,8)
<b>умеренная moderate</b>	18 (46,2)
<b>Признаки метаболического синдрома Signs of metabolic syndrome</b>	
<b>есть available</b>	23 (58,9)
<b>нет not available</b>	16 (41,1)
<b>ОАК при поступлении: лейкоциты, <math>\times 10^{12}/л</math>, медиана 6,64 (IQR, <math>Q_{0,25}</math>-<math>Q_{0,75}</math>; 5,8-7,8); тромбоциты, <math>\times 10^9/л</math>, медиана 250 (IQR, <math>Q_{0,25}</math>-<math>Q_{0,75}</math>; 221-317); СОЭ, мм/ч, медиана 22 (IQR, <math>Q_{0,25}</math>-<math>Q_{0,75}</math>; 11-33) General blood test on admission: leukocytes, <math>\times 10^{12}/l</math>, median 6.64 (IQR, <math>Q_{0,25}</math>-<math>Q_{0,75}</math>; 5.8-7.8); platelets, <math>\times 10^9/l</math>, median 250 (IQR, <math>Q_{0,25}</math>-<math>Q_{0,75}</math>; 221-317); erythrocyte sedimentation rate, mm/h, median 22 (IQR, <math>Q_{0,25}</math>-<math>Q_{0,75}</math>; 11-33)</b>	

ренцировкой опухоли в сравнении с высокой ( $p = 0,011$ ).

IL-6 в лизате Нф значимо повышался при миоме матки по сравнению с контролем ( $p = 0,0001$ ). На начальной стадии РЭ уровень IL-6 в лизате Нф был значимо выше такового в контроле ( $p = 0,0001$ ) и при миоме ( $p = 0,0007$ ), однако при прогрессировании РЭ уровень IL-6 в лизате Нф был ниже, чем на I стадии ( $p = 0,0001$ ), и аналогичен уровню при миоме матки ( $p = 0,9469$ ) (рис. 1). Содержание IL-6 в Нф у пациенток с ме-

**ТАБЛИЦА 2. УРОВЕНЬ ЯДЕРНОГО ФАКТОРА-κВ И VEGF-A В ЛИЗАТЕ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ ПРИ МИОМЕ ТЕЛА МАТКИ, НАЧАЛЬНОМ И ЛОКАЛИЗОВАННОМ РЭ, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

**TABLE 2. LEVEL OF NUCLEAR FACTOR-κB AND VEGF-A IN BLOOD NEUTROPHIL LYSATE IN MYOMA, INITIAL AND LOCALIZED ENDOMETRIAL CANCER, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

Группа / Group	Контроль / Control n = 22	Миома матки / Myoma n = 20	I стадия РЭ / Stage I of EC n = 27	II-III стадия РЭ / Stage II-III of EC n = 12
<b>NF-κB, мг/мл</b> NF-κB, mg/ml	0,174 (0,125-0,201)	0,503 (0,482-0,533)	0,413 (0,358-0,599)	0,700 (0,659-0,714)
<b>VEGF, пг/мл</b> VEGF, pg/ml	48,940 (40,989-52,851)	91,358 (78,670-103,759)	78,387 (62,412-92,856)	235,743 (223,478-239,756)

таблицеским синдромом значимо не отличалось от уровня IL-6 в отсутствие синдрома (p = 0,064).

IL-17A в лизате Нф был значимо снижен при миоме матки по сравнению с контролем (p = 0,0001). При начальном РЭ уровень IL-17A в лизате Нф был ниже такового в контроле (p = 0,0001), не отличаясь от показателей при миоме (p = 0,3767). При РЭ II-III стадии экспрессия IL-17A была ниже по сравнению с уровнями в группах контроля, миомы и раннего рака (p = 0,0001, p = 0,0057 и p = 0,0001 соответственно) (рис. 1). Наблюдалась тенденция к снижению экспрессии IL-17A в Нф пациенток с низко- и умеренно-дифференцированным РЭ в сравнении с высокодифференцированным (p = 0,089).

Мы наблюдали умеренную обратную корреляционную связь между содержанием в Нф VEGF и IL-6 (r = -0,426; p = 0,001); заметную обратную связь между VEGF и IL-17A (r = -0,615; p < 0,001).

Обсуждение. NF-κB признан важным анти-апоптотическим фактором транскрипции для Нф при воспалении [24, 27]. Связь между акти-

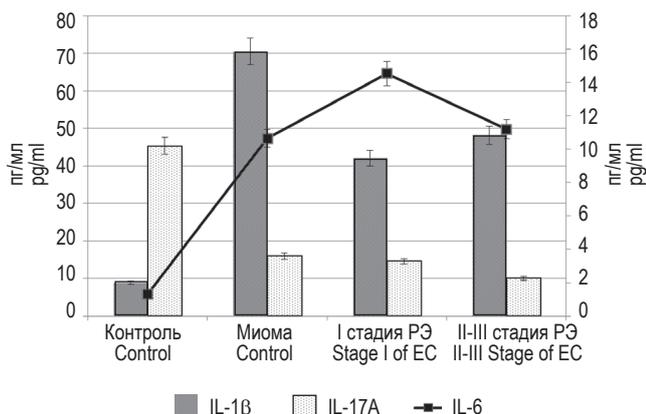
вацией NF-κB и параметрами воспаления (NOS, IL-6, IL-8, TNFα, CCL2) способствует развитию опухоли [5]. NF-κB участвует в регуляции экспрессии мРНК VEGF [19]. VEGF синтезируется нейтрофилами человека и хранится внутриклеточно в них [1]; он относится к факторам, определяющим проопухолевую (N2) поляризацию нейтрофила [2].

Помимо VEGF, продуцируемые нейтрофилами хемокины и цитокины (CXCL1, CXCL8, IL-17, IL-1β и IL-6) поддерживают ангиогенез опухоли [14]. IL-1β индуцируется и секретируется только при воспалительных сигналах. Индуцированные VEGF / IL-1 гены включают в сайты связывания NF-κB в их промоторах; VEGF-A предпочтительно использует NFAT, а IL-1 использует NF-κB для индуцирования этих генов [23].

При колоректальном раке опухолевые экзосомы способны продлевать выживаемость Нф, индуцируя секрецию в них IL-1β и поляризуя Нф в проопухолевую сторону [8]. Предполагается, что циркулирующий IL-1β влияет на способность Нф формировать внеклеточные ловушки (NETs) [4], а NETs, формирующиеся в условиях стерильного опухоли-индуцированного воспаления, задерживают опухолевые клетки и облегчают процесс метастазирования [16]. Продуцируемые самими Нф IL-1β и IL-6 участвуют в формировании преметастатических ниш, а также кластеров Нф с циркулирующими опухолевыми клетками [26].

При провоспалительных состояниях, к которым относятся и метаболический синдром, и опухолевый процесс, повышаются уровни экспрессии гранулопоэтических цитокинов, таких как G-CSF, GM-CSF и IL-6, что приводит к процессу экстренного гранулопоэза, что способствует прогрессированию опухоли и метастазированию [6].

Провоспалительный IL-17 является критическим медиатором рекрутирования Нф в инвазивный край опухоли, где Нф являются основными источниками MMP-9 и стимулируют проангиогенную активность в клетках рака желудка [11].



**Рисунок 1. Изменение уровня IL-1β, IL-6 и IL-17A в лизате Нф крови при миоме тела матки, начальном и локализованном РЭ**

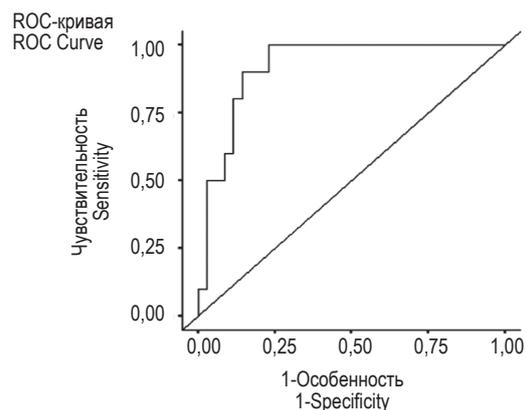
**Figure 1. Changes in the level of IL-1β, IL-6 and IL-17A in the blood neutrophil lysate in myoma, primary and localized endometrial cancer**

Также по данным Liu G. и соавт. (2017), IL-17A заметно индуцировал экспрессию VEGF и IL-6 в линии мышечных макрофагов Raw264.7 и в фибробластах роговицы мыши [12].

Продуцируемый Нф IL-17A считается проопухолевым, так как индуцирует дифференцировку мезенхимальных клеток в опухоль-ассоциированные фибробласты [10, 28]. В доступной литературе мы не обнаружили результатов оценки уровня IL-17A в Нф при опухолевой патологии тела матки. Снижение уровня IL-17A, возможно, определяется биологическими особенностями опухоли.

В унивариантном анализе логистической регрессии для дифференциальной диагностики между РЭ и миомой матки статистически значимость продемонстрировали показатели IL-6, IL-17A. При их комбинации в мультивариантном анализе оба вносили достоверный вклад в регрессионную модель (IL-6, ОШ 0,390 95% ДИ 0,197-0,773;  $p = 0,007$ ; IL-17A, ОШ 1,429 95% ДИ 1,096-1,856;  $p = 0,008$ ). Площадь под кривой (AUC) такой модели составила 0,911, и РЭ мог быть диагностирован с 83,8% вероятностью (рис. 2).

Таким образом, несмотря на количественное постоянство, функция циркулирующих Нф изменяется в ответ на патологические пролиферативные процессы в теле матки — как доброкачественные, так и злокачественные. При этом реактивные изменения экспрессии VEGF и NF- $\kappa$ B в Нф более выражены при РЭ, чем при доброкачественной патологии. В то же время в



**Рисунок 2. ROC-кривая для регрессионной модели дифференциальной диагностики РЭ и миомы тела матки с учетом показателей IL-6, IL-17A**

Figure 2. ROC-curve for the regression model of differential diagnosis of endometrial cancer and myoma, taking into account the indicators of IL-6, IL-17A

функциональном профиле Нф при миоме матки и при РЭ наблюдаются значимые различия, в частности, в экспрессии IL-6 и IL-17A. Это предполагает наличие специфических системных эффектов злокачественной опухоли уже на ранних ее стадиях, а также взаимодействия между циркулирующими Нф и клетками опухолевого очага. Различия в экспрессии VEGF, NF- $\kappa$ B, IL-6 и IL-17A в Нф на различных стадиях РЭ могут отражать процессы смещения фенотипа Нф в пролифо-противоопухолевую сторону в процессе прогрессирования заболевания.

## Список литературы / References

1. Apte R.S., Chen D.S., Ferrara N. Vegf in signaling and disease: beyond discovery and development. *Cell*, 2019, Vol. 176, no. 6, pp. 1248-1264.
2. Giese M.A., Hind L.E., Huttenlocher A. Neutrophil plasticity in the tumor microenvironment. *Blood*, 2019, Vol. 133, no. 20, pp. 2159-2167.
3. Girling J.E., Rogers P.A. Recent advances in endometrial angiogenesis research. *Angiogenesis*, 2005, Vol. 8, no. 2, pp. 89-99.
4. Gomes T., Várady C.B.S., Lourenço A.L., Mizurini D.M., Rondon A.M.R., Leal A.C., Gonçalves B.S., Bou-Habib D.C., Medei E., Monteiro R.Q. IL-1 $\beta$  blockade attenuates thrombosis in a neutrophil extracellular trap-dependent breast cancer model. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 2088. doi: 10.3389/fimmu.2019.02088.
5. Gupta S.C., Sundaram C., Reuter S., Aggarwal B.B. Inhibiting NF- $\kappa$ B activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, Vol. 1799, pp. 775-787.
6. Guthrie G.J., Roxburgh C.S., Richards C.H., Horgan P.G., McMillan D.C. Circulating IL-6 concentrations link tumour necrosis and systemic and local inflammatory responses in patients undergoing resection for colorectal cancer. *Br. J. Cancer*, 2013, Vol. 109, no. 1, pp. 131-137.
7. Holub K., Busato F., Gouy S., Sun R., Pautier P., Genestie C., Morice P., Leary A., Deutsch E., Haie-Meder C., Biete A., Chargari C. Analysis of systemic inflammatory factors and survival outcomes in endometrial cancer patients staged I-III FIGO and treated with postoperative external radiotherapy. *J. Clin. Med.*, 2020, Vol. 9, no. 5, 1441. doi: 10.3390/jcm9051441.
8. Hwang W.L., Lan H.Y., Cheng W.C., Huang S.C., Yang M.H. Tumor stem-like cell-derived exosomal RNAs prime neutrophils for facilitating tumorigenesis of colon cancer. *J. Hematol. Oncol.*, 2019, Vol. 12, no. 1, 10. doi: 10.1186/s13045-019-0699-4.
9. Jaillon S., Ponzetta A., Di Mitri D., Santoni A., Bonocchi R., Mantovani A. Neutrophil diversity and plasticity in tumour progression and therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2020, Vol. 20, no. 9, pp. 485-503.
10. Li S., Cong X., Gao H., Lan X., Li Z., Wang W., Song S., Wang Y., Li C., Zhang H., Zhao Y., Xue Y. Tumor-associated neutrophils induce EMT by IL-17a to promote migration and invasion in gastric cancer cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2019, Vol. 38, no. 1, 6. doi: 10.1186/s13046-018-1003-0.

11. Li T.J., Jiang Y.M., Hu Y.F., Huang L., Yu J., Zhao L.Y., Deng H.J., Mou T.Y., Liu H., Yang Y., Zhang Q., Li G.X. Interleukin-17-producing neutrophils link inflammatory stimuli to disease progression by promoting angiogenesis in gastric cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2017, Vol. 23, no. 6, pp. 1575-1585.
12. Liu G., Wu H., Lu P., Zhang X. Interleukin (IL)-17A promotes angiogenesis in an experimental corneal neovascularization model. *Curr. Eye Res.*, 2017, Vol. 42, no. 3, pp. 368-379.
13. McDonald P.P., Bald A., Cassatella M.A. Activation of the NF-kappaB pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils. *Blood*. 1997, Vol. 89, no. 9, pp. 3421-3433.
14. Naldini A., Carraro F. Role of inflammatory mediators in angiogenesis. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*, 2005, Vol. 4, no. 1, pp. 3-8.
15. National cancer institute SEER stat fact sheets: endometrial cancer. Available at: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/corp.html> (accessed on 25 February 2020).
16. Palacios-Acedo A.L., Mège D., Crescence L., Dignat-George F., Dubois C., Panicot-Dubois L. Platelets, thrombo-inflammation, and cancer: collaborating with the enemy. *Front. Immunol.*, 2019, no. 10, 1805. doi: 10.3389/fimmu.2019.01805.
17. Pires B.R.B., Silva R.C.M.C., Ferreira G.M., Abdelhay E. NF-kappaB: two sides of the same coin. *Genes (Basel)*, 2018, Vol. 9, no. 1, 24. doi: 10.3390/genes9010024.
18. Seignez C., Phillipson M. The multitasking neutrophils and their involvement in angiogenesis. *Curr. Opin. Hematol.*, 2017, Vol. 24, no. 1, pp. 3-8.
19. Shibata A., Nagaya T., Imai T., Funahashi H., Nakao A., Seo H. Inhibition of NF-kappaB activity decreases the VEGF mRNA expression in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2002, Vol. 73, no. 3, pp. 237-243.
20. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J. Clin.*, 2020, Vol. 70, pp. 7-30.
21. Tazzyman S., Lewis C.E., Murdoch C. Neutrophils: key mediators of tumour angiogenesis. *Int. J. Exp. Pathol.*, 2009, Vol. 90, no. 3, pp. 222-231.
22. Tecchio C., Cassatella M.A. Neutrophil-derived cytokines involved in physiological and pathological angiogenesis. *Chem. Immunol. Allergy*, 2014, Vol. 99, pp. 123-137.
23. Voronov E., Carmi Y., Ron N. Apt. The role IL-1 in tumor-mediated angiogenesis. *Front. Physiol.*, 2014, no. 5, 114. doi: 10.3389/fphys.2014.00114e.
24. Wright H.L., Chikura B., Bucknall R.C., Moots R.J., Edwards S.W. Changes in expression of membrane TNF, NF- $\kappa$ B activation and neutrophil apoptosis during active and resolved inflammation. *Ann. Rheum. Dis.*, 2011, Vol. 70, pp. 537-543.
25. Wu L., Saxena S., Singh R.K. Neutrophils in the tumor microenvironment. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2020, Vol. 1224, pp. 1-20.
26. Wu M., Ma M., Tan Z., Zheng H., Liu X. Neutrophil: a new player in metastatic cancers. *Front. Immunol.*, 2020, no. 11, 565165. doi: 10.3389/fimmu.2020.565165.
27. Xing Y., Wang X., Jameson S.C., Hogquist K.A. Late stages of T cell maturation in the thymus involve NF- $\kappa$ B and tonic type I interferon signaling. *Nat. Immunol.*, 2016, Vol. 17, pp. 565-573.
28. Zhang J., Ji C., Li W., Mao Z., Shi Y., Shi H., Ji R., Qian H., Xu W., Zhang X. Tumor-educated neutrophils activate mesenchymal stem cells to promote gastric cancer growth and metastasis. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2020, no. 8, 788. doi: 10.3389/fcell.2020.00788.

---

**Авторы:**

**Абакумова Т.В.** – к.б.н., доцент, доцент кафедры физиологии и патофизиологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

**Генинг Т.П.** – д.б.н., профессор, заведующая кафедрой физиологии и патофизиологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

**Генинг С.О.** – ассистент кафедры физиологии и патофизиологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

**Антонеева И.И.** – д.м.н., доцент, профессор кафедры онкологии и лучевой диагностики ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет»; заведующая гинекологическим отделением ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер», г. Ульяновск, Россия

---

**Authors:**

**Abakumova T.V.**, PhD (Biology), Associate Professor, Department of Physiology and Pathophysiology, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

**Gening T.P.**, PhD, MD (Biology), Professor, Head, Department of Physiology and Pathophysiology, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

**Gening S.O.**, Assistant Professor, Department of Physiology and Pathophysiology, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

**Antoneeva I.I.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Oncology and Radiology, Ulyanovsk State University; Head of the Gynecological Department, Ulyanovsk Regional Clinical Oncology Center, Ulyanovsk, Russian Federation

---

Поступила 25.11.2020  
Принята к печати 10.01.2021

---

Received 25.11.2020  
Accepted 10.01.2021

## КЛИНИЧЕСКАЯ ИНФОРМАТИВНОСТЬ ХЕМОКИНОВ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПАРОДОНТИТЕ

**Базарный В.В., Мандра Ю.В., Полушина Л.Г., Максимова А.Ю.,  
Светлакова Е.Н.**

*ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский институт» Министерства здравоохранения РФ,  
г. Екатеринбург, Россия*

**Резюме.** Одним из ключевых механизмов иммунопатогенеза распространенного заболевания — хронического пародонтита (ХП) — является активация цитокиновой сети. Поэтому неслучайно исследование протеомного (в том числе цитокинового) профиля слюны признано одним из глобальных направлений исследований в пародонтологии. Однако полученные многочисленные данные о содержании различных хемокинов в ротовой жидкости при ХП нередко противоречивы. Эта неоднозначность результатов может быть связана как с разнообразием методических подходов при определении цитокинов, так и с особенностями когорт обследованных пациентов, например с разной тяжестью заболевания. При этом большинство публикаций посвящено средне-тяжелым и тяжелым формам ХП. Кроме того, в систематических обзорах, метаанализах последних лет вопрос о клинической ценности хемокинов при ХП также не решен однозначно, что указывает на необходимость дальнейших исследований в этой области.

Целью настоящего исследования было установить клинико-диагностическое значение определения некоторых хемокинов в ротовой жидкости при хроническом пародонтите легкой степени.

Работа была основана на исследовании 18 пациентов с диагнозом хронический пародонтит легкой степени и 12 практических здоровых добровольцев с относительно интактным пародонтом. Диагноз был установлен на основании стандартных клинико-рентгенологических критериев. Всем проводили определение уровня 8 хемокинов (CXCL1, CXCL8, CXCL10, CXCL12, CCL2, CCL3, CCL5, CCL11) методом мультипараметрического флуоресцентного анализа с магнитными микросферами (технология xMAP, Lumiplex 200, США). Статистический анализ проводился с использованием непараметрических критериев. Для определения диагностической значимости изученных параметров применили ROC-анализ.

Было показано, что течение хронического пародонтита сопровождается повышением уровня CXCL1 в 5,5 раза, CXCL8 в 8,1 раза, CXCL12 — в 3,5 раза, CCL2 — в 2,7. При этом уровень других хемокинов в ротовой жидкости — CXCL10, CCL3, CCL5, CCL11 существенно не изменялся. Наблюдалось отсутствие корреляционных связей между отдельными параметрами в группе пациентов с хроническим пародонтитом, в отличие от контрольной группы, что, вероятно, отражает нарушение механизмов «сбалансированности» регуляции хемокинов. В ходе ROC-анализа были выявлены потенциальные биомаркеры ХП легкой степени. Диагностическая чувствительность и диагностическая специфичность составили для CXCL1 91 и 75% соответственно, CXCL8 и CXCL12 — 95 и 75%, CCL2 — 82 и 75%. Полученные данные свидетельствуют о том, что слюварные хемокины CXCL1, CXCL8, CXCL12, CCL2 могут рассматриваться в качестве потенциальных биомаркеров хронического пародонтита легкой степени.

*Ключевые слова:* хемокины, ротовая жидкость, хронический пародонтит, чувствительность, специфичность

### Адрес для переписки:

Полушина Лариса Георгиевна  
ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский  
институт» Министерства здравоохранения РФ  
620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3.  
Тел.: 8 (343) 214-85-56.  
E-mail: polushina-larisa@bk.ru

### Address for correspondence:

Polushina Larisa G.  
Ural State Medical University  
620028, Russian Federation, Ekaterinburg, Repin str., 3.  
Phone: 7 (343) 214-85-56.  
E-mail: polushina-larisa@bk.ru

### Образец цитирования:

В.В. Базарный, Ю.В. Мандра, Л.Г. Полушина,  
А.Ю. Максимова, Е.Н. Светлакова «Клиническая  
информативность хемокинов ротовой жидкости  
при хроническом пародонтите» // Медицинская  
иммунология, 2021. Т. 23, № 2. С. 345-352.  
doi: 10.15789/1563-0625-CVO-2162

© Базарный В.В. и соавт., 2021

### For citation:

V.V. Bazarny, Yu.V. Mandra, L.G. Polushina,  
A.Yu. Maksimova, E.N. Svetlakova "Clinical value of  
oral fluid chemokines in chronic periodontitis", *Medical  
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*,  
2021, Vol. 23, no. 2, pp. 345-352.

doi: 10.15789/1563-0625-CVO-2162

DOI: 10.15789/1563-0625-CVO-2162

## CLINICAL VALUE OF ORAL FLUID CHEMOKINES IN CHRONIC PERIODONTITIS

Bazarny V.V., Mandra Yu.V., Polushina L.G., Maksimova A.Yu., Svetlakova E.N.

Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

**Abstract.** Activation of cytokine network is one of the key mechanisms in immunopathogenesis of chronic periodontitis (CP), a common dental disease. Therefore, the study of the proteomic (including cytokine) profile of saliva is not *coincidentally* considered among global research areas in periodontology. However, the existing data on the contents of cytokines / chemokines in oral fluid (OF) in CP are contradictory. This ambiguity of the results can be associated both with a variety of methodological approaches to the cytokine determination, and with different severity of CP in the studied cohorts of patients. Moreover, recent systematic reviews and meta-analyses show that clinical value of chemokines in CP is also not yet determined thus indicating a need for future research in this area.

The aim of this study was to assess clinical and diagnostic value of some chemokines from oral fluid in chronic mild periodontitis. The work was based on a study of 18 patients diagnosed with mild chronic periodontitis (MCD-10 K05.3) and 12 practically healthy volunteers with relatively intact periodontal tissue. The diagnosis was based on standard clinical and radiological criteria. In all cases the levels of 8 chemokines were determined using multiparametric fluorescence analysis with magnetic microspheres (xMAP technology, Luminex 200, USA). Statistical analysis was carried out by methods of non-parametric statistics. To determine the predictive value of the test, ROC analysis was performed.

It has been shown that CP is accompanied by increased levels of CXCL1 (5.5-fold), CXCL8 (8.1-fold), CXCL12 (3.5-fold), CCL2 (2.7-fold). At the same time, the level of other chemokines did not change significantly. There was a lack of correlations between individual parameters in the group of patients with CP, in contrast to the control group, thus, probably reflecting disturbed mechanisms of “balance” regulation of chemokines. By means of ROC analysis, highly sensitive biomarkers of chronic mild periodontitis were identified. The diagnostic sensitivity and diagnostic specificity were for CXCL1 (91 and 75%, respectively), CXCL8 and CXCL12 (95 and 75%), CCL2 (82 and 75%). The data obtained indicate that the salivary chemokines CXCL1, CXCL8, CXCL10, CXCL12, CCL2 can be considered potential biomarkers of mild chronic periodontitis.

*Keywords:* chemokines, oral fluid, chronic periodontitis, sensitivity, specificity

Данная работа проводилась в рамках государственного задания «Иммунорегуляция и иммунологический мониторинг реакций повреждения и восстановления тканей полости рта», № госрегистрации АААА-А18-118042890061-4.

### Введение

Хронический пародонтит (ХП) остается одним из самых распространенных заболеваний на планете, им поражено до 95% населения, причем тяжелая форма, в зависимости от клинических подходов к диагностике и от характеристик конкретной изучаемой популяции, встречается у 7-20% пациентов [12, 17]. Заболевание возникает в результате нарушения баланса содержания в микробиоме полости рта пародонтопатогенов и иммунной системы человека. Пародонтопатогенные микроорганизмы индуцируют воспалительный процесс, который способствует разрушению опорных тканей вокруг зубов, потере соединительной ткани и коллагена в десне, разрушению периодонтальной связки и резорбции альвеолярной кости. При этом воспаление пародонта имеет системные эффекты, оно оказы-

вает негативное воздействие на другие органы и способствует развитию различных заболеваний [7, 11, 17]. Установлено, что одним из ключевых механизмов развития и прогрессирования ХП является активация цитокиновой сети. Цитокины «рекрутируют» в очаг воспаления иммунокомпетентные клетки, усиливают экспрессию молекул эндотелиальной адгезии и индуцируют целый каскад последующих патофизиологических реакций [2, 8, 16, 24, 25, 26, 27, 33]. Поэтому исследование протеомного профиля слюны признано одним из глобальных направлений исследований в пародонтологии [14, 29]. Неслучайно в последние 10-20 лет появилось огромное количество публикаций, показывающих, что ротовая жидкость (РЖ) или смешанная слюна является важным источником информации для неинвазивной диагностики [1, 9]. Многие авторы предлагают использовать уровень слюнных цитокинов в качестве биомаркеров ХП [5, 6, 18, 20, 22]. В частности, в проведенных ранее нами исследованиях было оценено клинико-диагностическое значение IL-2, IL-4, IL-6 и IL-17 в РЖ при ХП [2, 3]. Менее изучен при ХП другой класс

цитокинов – суперсемейство хемокинов. Представленные в авторитетных публикациях данные по этому вопросу нередко противоречивы. Так, одни авторы отмечают повышение уровня интерлейкина-8 (IL-8), моноцитарного хемотаксического белка (CCL2, MCP-1), макрофагального белка воспаления (CCL3, MIP-1 $\alpha$ ) в слюне и десневой жидкости при ХП [9, 10, 13, 23, 36]. Другие авторы не обнаружили значительного изменения концентрации указанных белков в РЖ [16, 20, 25, 35]. Эта неоднозначность результатов может быть связана как с разнообразием методических подходов при определении хемокинов, так и с особенностями когорт обследованных пациентов, различающихся, например, разной тяжестью ХП. Кроме того, в систематических обзорах, метаанализах последних лет вопрос о клинической ценности хемокинов при хроническом пародонтите также не решен однозначно, что связано с качеством и объемами проведенных исследований и указывает на необходимость дальнейших исследований в данной области [6, 19, 32, 34]. Это определило **цель работы** – установить клинико-диагностическое значение определения некоторых саливарных хемокинов РЖ при ХП легкой степени тяжести.

## Материалы и методы

Работа основана на результатах проспективного исследования 18 пациентов, которым на основании клинико-рентгенологических критериев в соответствии с клиническим рекомендациями (протоколами лечения) при диагнозе пародонтит, утвержденный Стоматологической Ассоциацией России (2013) с изменениями и дополнениями на основании постановления № 15 Совета «Стоматологической Ассоциацией России» от 30.09.2014, актуализированные 02.08.2018 [<http://www.e-tomatology.ru/director/protokols/>]. был установлен диагноз хронический пародонтит легкой степени (K05.3 по МКБ-10), Степень заболевания устанавливали в соответствии с традиционной «Ереванской» классификацией (1983) и учетом новой классификации, представленной на EuroPerio-2018 (Needeleman, Tonetti и соавт.) на основе стадии процесса в зависимости от уровня потери клинического прикрепления, рентгенологической потери костной ткани и потери зуба. Контрольную группу составили 12 практических здоровых добровольцев с относительно интактным пародонтом. Поло-возрастная структура и характер сопутствующей заболеваемости обследованных в группах достоверно не отличались. Наряду со стандартным клиническим обследованием оценивались стоматологические индексы: папиллярно-маргинально-альвеолярный индекс (ПМА) в модификации С. Парма (1960) и пародонтальный индекс Рассела (ПИ).

Критериями включения в основную группу были: возраст пациента 18-50 лет, общесоматическое состояние пациентов в стадии компенсации, пациенты, обратившиеся к стоматологу с жалобами на кровоточивость десен, пациенты на поддерживающей пародонтальной терапии.

Нестимулированную РЖ получали не ранее чем через 2 часа после приема пищи и полоскания полости рта, собирали в пробирки SalivaCapsSet. Пробирки маркировались, замораживались и хранились при температуре -20 °С. Перед исследованием биологический материал размораживали и центрифугировали 15 минут при 1500 оборотов/мин.

В РЖ определяли содержание хемокинов, представленных в таблице 1.

Концентрацию саливарных хемокинов определяли методом мультипараметрического флуоресцентного анализа с магнитными микросферами (технология xMAP, Luminex 200, США) с использованием тест-системы ProcartaPlex Human Cytokine/Chemokine (Invitrogen, США). Исследование выполняли согласно протоколу производителя. Биологический образец инкубировали в 96-луночном планшете со смесью окрашенных инфракрасными флуоресцентными красителями магнитных микросфер, нагруженных моноклональными антителами, специфичных для исследуемых хемокинов, и стрептавидин-R-фикоэритрином (RPE). Полученную суспензию анализировали с помощью проточной камеры Luminex 200. Для обнаружения магнитных частиц прибор Luminex имеет два лазера: красный для различения спектральной сигнатуры, зеленый для определения количества флуоресценции RPE, которое пропорционально количеству белка, присутствующего в образце. Концентрацию каждого хемокина рассчитывали на основе средней интенсивности флуоресценции частиц по калибровочному графику. Результаты обрабатывались с помощью программного обеспечения xPONENT.

Статистический анализ результатов показал, что выборки не подчиняются закону нормального распределения, поэтому при статистическом анализе использовали непараметрические критерии: медиана (Me) и межквартильный диапазон (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>). Для выявления различий количественных признаков между группами использовали непараметрический двусторонний критерий Манна–Уитни. Для установления взаимосвязей между параметрами применили корреляционный анализ с определением коэффициента корреляции Спирмена, значения которого интерпретировали в соответствии со шкалой Чеддока. Также был проведен ROC-анализ для определения клинической (диагностической) чувствительности (ДЧ) и специфичности (ДС) изучаемых показателей. Для решения задач многомерной статистики использовали программу Gretl (<http://gretl>).

ТАБЛИЦА 1. ПЕРЕЧЕНЬ ОПРЕДЕЛЯЕМЫХ В ИССЛЕДОВАНИИ ХЕМОКИНОВ

TABLE 1. LIST OF CHEMOKINES DETERMINED IN THE STUDY

Семейство Kind	Название Name	Синоним Synonym
СХС	CXCL1	<b>GRO<math>\alpha</math> – росторегулирующий онкоген альфа</b> GRO $\alpha$ , growth-regulating oncogene alpha
	CXCL8	<b>IL-8 – интерлейкин-8</b> IL-8, interleukin-8
	CXCL10	<b>IP-10 – гамма-интерферон индуцируемый белок-10</b> IP-10, interferon gamma inducible protein-10
	CXCL12	<b>SDF-1 – фактор стромальных клеток-1</b> SDF-1, stromal cell factor-1
СС	CCL2	<b>MCP-1 – моноцитарный хемотаксический белок 1</b> MCP-1, monocytic chemotactic protein 1
	CCL3	<b>MIP-1<math>\alpha</math> – макрофагальный белок воспаления альфа</b> MIP-1 $\alpha$ , macrophage inflammatory protein alpha
	CCL5	<b>RANTES – хемокин, экспрессируемый и секретируемый Т-лимфоцитами при активации</b> RANTES, chemokine expressed and secreted by T lymphocytes upon activation
	CCL11	<b>Eotaxin – эозинофильный хемотаксический белок</b> Eotaxin, eosinophilic chemotactic protein

sourceforge.net/ru.html), для расчета диагностических характеристик – приложение для Excel 2007 – Analyse-it.

Клиническое обследование и лечение пациентов проведено в стоматологической клинике ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России (главный врач – д.м.н. Мягкова Н.В.) При проведении исследований соблюдались этические принципы, принятые Хельсинской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (2000). Проведение данного исследования было одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России от 16.12.2018 г. (протокол № 10).

## Результаты

Пациентам проведено стоматологическое обследование с индексной оценкой состояния пародонта (индексы ПМА и ПИ). Стоматологические индексы являются объективными показателями состояния полости рта. Они были заметно повышены у пациентов с ХП (табл. 2), например ПМА – в 4,5 раза, что подтверждает корректность установленного диагноза, отражает степень воспаления десны. ПИ, который в основной группе повышен в 3,5 раза, свидетельствует о выраженном ухудшении пародонтального здоровья: разрушение эпителиального прикрепления, образование десневых карманов с последующей резорбцией альвеолярной кости, нарушение опорно-удерживающей функции пародонта, что указывает на тяжесть заболевания.

Пародонтогенные микроорганизмы вызывают целый каскад иммунопатофизиологических реакций, ведущих к повреждению тканей пародонта.

В частности к ним относится активация цитокиновой сети и увеличение в РЖ уровня провоспалительных цитокинов [8, 16, 21, 24]. В фокусе данной работы были, как указано выше, хемокины двух семейств (табл. 3).

Определение слюварных хемокинов у пациентов с ХП показало повышение уровня CXCL1 (GRO $\alpha$ ) в 5,5 раза, CXCL8 (IL-8) в 8,1 раза, CXCL12 (SDF-1) – в 3,5 раза, CCL2 (MCP-1) – в 2,7. Уровень других факторов: IP-10, MIP-1 $\alpha$ , RANTES и Eotaxin не изменялся.

Учитывая, что хемокины представляют собой сложно устроенную сеть [36], нами был проведен корреляционный анализ зависимости между концентрацией тех хемокинов, уровень которых в РЖ при ХП был повышен (табл. 4).

В контрольной группе во всех парах признаков зависимость была заметной, в то время как при ХП сила связи по Чеддоку была менее выраженной по силе и статистически незначимой ( $p > 0,05$ ). Можно предположить, что отсутствие корреляционных связей между отдельными параметрами в группе пациентов отражает нарушение механизмов регуляции продукции хемокинов при ХП.

Полученные нами данные о сдвигах в концентрации слюварных хемокинов ставят вопрос об их клинической ценности как потенциальных биомаркеров легкой степени ХП. Современным инструментом для его объективного решения является ROC-анализ, которому мы подвергли только те параметры, изменения которых оценили как значимые у пациентов (табл. 5).

**ТАБЛИЦА 2. ИНДЕКСЫ СТОМАТОЛОГИЧЕСКОГО ЗДОРОВЬЯ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ПАРОДОНТИТОМ, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 2. INDICES OF DENTAL HEALTH IN PATIENTS WITH CHRONIC PERIODONTITIS, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

Показатель Index	Контрольная группа Control group	Основная группа Main group
РМА	10 (2-15)	45 (40-48) p = 0,005
ПИ PI	0,1 (0-0,3)	3,6 (2,1-3,9) p = 0,004

**ТАБЛИЦА 3. КОНЦЕНТРАЦИЯ ХЕМОКИНОВ В РЖ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПАРОДОНТИТЕ**

TABLE 3. CONCENTRATION OF CHEMOKINES IN THE ORAL FLUID OF PATIENTS WITH CHRONIC PERIODONTITIS

Хемокины, пкг/мл Chemokines, pkg/ml	Контрольная группа Control group	ХГП (основная группа) Chronic generalized periodontitis (main group)	p
<b>CXCL1 (GRO<math>\alpha</math>)</b>	23,9 19,3-75,1	132,1 107,5-185,5	p < 0,05
<b>CXCL8 (IL-8)</b>	80,9 19,7-429,5	656,4 436,1-798,2	p < 0,05
<b>CXCL10 (IP-10)</b>	125,7 64,0-117,5	89,2 33,5-148,0	p > 0,05
<b>CXCL12 (SDF-1)</b>	346,1 256,2-943,3	1210,2 1076,3-1827,0	p < 0,05
<b>CCL2 (MCP1)</b>	220,4 179,1-285,9	585,1 429,5-976,2	p < 0,05
<b>CCL3 (MIP1<math>\alpha</math>)</b>	0,6 0,1-2,3	1,8 1,4-5,1	p > 0,05
<b>CCL5 (RANTES)</b>	1,5 0,1-4,6	6,5 2,9-8,4	p > 0,05
<b>CCL11 (Eotaxin)</b>	5,6 3,0-7,5	6,4 3,3-8,1	p > 0,05

Как следует из данных таблицы 5, SDF-1 и IL-8 являются высокочувствительными биомаркерами легкого ХП, а GRO $\alpha$  и MCP-1 – достаточно специфичными. В целом все из четырех использованных параметров могут рассматриваться на роль кандидатов биомаркеров ХП.

## Обсуждение

Хемокины обладают широким спектром биологической активности. Они активно участвуют в различных патогенетических механизмах ХП – активируют миграцию различных видов иммунокомпетентных клеток в очаг воспаления, стимулируют остеокластическую деструкцию костной ткани, индукцию повреждения мягких тканей пародонта [23, 32, 36]. Поэтому не удивителен интерес к хемокинам, в том числе – содержащимся в РЖ, как лабораторным диагностическим тестам.

Исследование РЖ является одним из путей получения достоверной и объективной информации о состоянии организма человека, в том

числе – полости рта. На этом основано новое направление неинвазивной диагностики – «саливарная протеомика». В настоящее время получены данные о повышенном содержании в РЖ цитокинов, острофазовых белков, различных метаболитов и ферментов при ХП и других заболеваниях [1, 4, 22, 26, 27]. В публикациях последних лет обсуждается вопрос о клинической ценности хемокинов. Одни авторы считают их биомаркерами заболевания, другие полагают, что количество и качество опубликованных работ требуют продолжение исследований в этой области [9, 10, 11, 15]. Этим была определена актуальность данного исследования.

Как следует из полученных нами данных, определение концентрации CXCL1(GRO $\alpha$ ), CXCL8 (IL-8), CXCL10 ((IP-10), CXCL12 (SDF-1), CCL2 (MCP-1) в РЖ при ХП имеют достаточно высокие значения ДЧ и ДС: 82-95% и 70-75% соответственно (при установленных критических значениях cut off). На этом основании можно за-

ТАБЛИЦА 4. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СВЯЗЬ МЕЖДУ УРОВНЕМ НЕКОТОРЫХ ХЕМОКИНОВ

TABLE 4. CORRELATION BETWEEN THE LEVEL OF SOME CHEMOKINES

Пара признаков Couple of signs	Коэффициент корреляции Спирмена Spearman's correlation coefficient	
	Контрольная группа Control group	ХГП (основная группа) Chronic generalized periodontitis (main group)
СХСL12 – ССL2	-0,800; p < 0,05	0,382; p > 0,05
СХСL1 – СХСL12	0,800; p < 0,05	0,582; p > 0,05
СХСL1 – ССL2	-0,400; p < 0,05	0,050; p > 0,05
СХСL8 – СХСL12	0,800; p < 0,05	0,025; p > 0,05
СХСL8 – ССL2	-0,400 p < 0,05	0,750; p > 0,05
СХСL8 – СХСL1	0,990; p < 0,05	0,143; p > 0,05

ТАБЛИЦА 5. ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОНЦЕНТРАЦИИ ХЕМОКИНОВ В РЖ

TABLE 5. DIAGNOSTIC EFFICIENCY OF CHEMOKINE CONCENTRATION IN ORAL FLUID

Показатель Index	Критическое значение Critical value	ДЧ Diagnostic sensitivity	ДС Diagnostic specificity
СХСL1 (GRO $\alpha$ )	100	91	75
ССL2 (MCP-1)	400	82	75
СХСL12 (SDF-1)	400	95	70
СХСL8 (IL-8)	250	95	70

ключить, что уровень данных слюварных хемокинов может иметь диагностическое значение и использоваться в лабораторном мониторинге пациентов с ХП, в частности – для выявления рецидива заболевания и оценки эффективности терапии, хотя критические значения показателей в последнем случае требуют уточнения.

В целом, полученные данные в основном совпадают с полученными ранее другими авторами относительно повышения или отсутствия выраженных сдвигов в РЖ уровня изученных хемокинов [18, 20, 25, 30, 31, 35]. Кроме того, аналогичные изменения экспрессии данных хемокинов установлены и непосредственно в тканях пародонта [28]. Однако нельзя не отметить и некоторую противоречивость полученных нами данных, которые не вполне согласуются с выявленным ранее подъемом уровня RANTES, СХСL12 (SDF-1)

и GRO что вероятно, характерно для пациентов с более тяжелым течением пародонтита, у пациентов с метаболическим синдромом и другой сопутствующей патологией [13, 30].

Таким образом, слюварные хемокины СХСL1, СХСL8, СХСL10, СХСL12, ССL2 могут рассматриваться в качестве биомаркеров хронического пародонтита легкой степени. В то же время очевидно, что переход высокочувствительных технологий определения биомаркеров из лаборатории в стоматологическую клинику требует исследований по уточнению их критических уровней (cut-off), валидации получаемых новых данных, связанных с оценкой пародонтального здоровья.

#### Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

## Список литературы / References

1. Базарный В.В., Полушина Л.Г., Максимова А.Ю., Светлакова Е.Н., Мандра Ю.В. Патогенетическое обоснование новых подходов к оценке состояния тканей полости рта при хроническом генерализованном пародонтите // Проблемы стоматологии, 2018. Т. 14, № 2. С. 14-18. [Bazarny V.V., Polushina L.G., Maksimova A.Yu., Svetlakova E.N., Mandra Yu.V. Pathogenetic justification of new approaches to assessing the state of oral tissues in chronic generalized periodontitis. *Problemy stomatologii = Problems of Dentistry*, 2018, Vol. 14, no. 2, pp. 14-18. (In Russ.)]
2. Базарный В.В., Полушина Л.Г., Семенцова Е.А., Светлакова Е.Н., Береснева Н.С., Мандра Ю.В., Цвиренко С.В. Значение некоторых интерлейкинов в патогенезе пародонтита // Вестник Уральской медицинской академической науки, 2017. Т. 14, № 1. С. 35-39. [Bazarny V.V., Polushina L.G., Sementsova E.A., Svetlakova E.N., Beresneva N.S., Mandra Yu.V., Tsvirenko S.V. The significance of certain interleukins in the pathogenesis of periodontitis. *Vestnik Uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Bulletin of the Ural Medical Academic Science*, 2017, Vol. 14, no. 1, pp. 35-39. (In Russ.)]

3. Полушина Л.Г., Светлакова Е.Н., Семенцова Е.А., Мандра Ю.В., Базарный В.В. Клинико-патогенетическое значение некоторых цитокинов при пародонтите // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 6. С. 803-806. [Polushina L.G., Svetlakova E.N., Sementsova E.A., Mandra Yu.V., Bazarny V.V. Clinical and pathogenetic significance of certain cytokines in periodontitis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 6, pp. 803-806. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-803-806.
4. Aldahlawi S., Youssef A.R., Shahabuddin S. Evaluation of chemokine CXCL10 in human gingival crevicular fluid, saliva, and serum as periodontitis biomarker. *J. Inflamm. Res.*, 2018, Vol. 11, pp. 389-396.
5. Almeahadi A.H., Alghamdi F. Biomarkers of alveolar bone resorption in gingival crevicular fluid: a systematic review. *Arch. Oral Biol.*, 2018, Vol. 93, pp. 12-21.
6. Arias-Bujanda N., Regueira-Iglesias A., Balsa-Castro C., Nibali L., Donos N., Tomás I. Accuracy of single molecular biomarkers in saliva for the diagnosis of periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Periodontol.*, 2020, Vol. 47, no. 1, pp. 2-18.
7. Cardoso E.L., Reis C., Manzanares-Céspedes M.C. Chronic periodontitis, inflammatory cytokines, and interrelationship with other chronic diseases. *Postgrad. Med. J.*, 2018, Vol. 130, no. 1, pp. 98-104.
8. Cekici A., Kantarci A., Hasturk H., van Dyke T.E. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol. 2000, 2014*, Vol. 64, no. 1, pp. 57-80.
9. Chen X.T., Tan J.Y., Lei L.H., Chen L.L. Cytokine levels in plasma and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis. *Am. J. Dent.*, 2015, Vol. 28, no. 1, pp. 9-12.
10. Finoti L.S., Nepomuceno R., Pigossi S.C., Corbi S.C., Secolin R., Scarel-Caminaga R.M. Association between interleukin-8 levels and chronic periodontal disease: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 2017, Vol. 96 no. 22, 6932. doi: 10.1097/MD.0000000000006932.
11. Genco R.J., Sanz M. Clinical and public health implications of periodontal and systemic diseases: an overview. *Periodontol. 2000, 2020*, Vol. 83, no.1, pp. 7-13.
12. Gross A.J., Paskett K.T., Cheever V.J., Lipsky M.S. Periodontitis: a global disease and the primary care provider's role. *Postgrad. Med. J.*, 2017, Vol. 93, no. 1103, pp. 560-565.
13. Gürkan A., Eren G., Çetinkalp Ş., Akçay Y.D., Emingil G., Atilla G. Monocyte chemotactic protein-1, RANTES and macrophage migration inhibitory factor levels in gingival crevicular fluid of metabolic syndrome patients with gingivitis. *Arch. Oral Biol.*, 2016, Vol. 69, pp. 82-88.
14. Hartenbach FARR., Velasquez É., Nogueira FCS., Domont G.B., Ferreira E., Colombo A.P.V. Proteomic analysis of whole saliva in chronic periodontitis. *J. Proteomics*, 2020, Vol. 20, no. 213, 103602. doi: 10.1016/j.jprot.2019.103602.
15. Havens A.M., Chiu E., Taba M., Wang J., Shiozawa Y., Jung Y., Taichman L.S, D'Silva N.J., Gopalakrishnan R., Wang C., Giannobile W.V., Taichman R.S. Stromal-derived factor-1alpha (CXCL12) levels increase in periodontal disease. *J. Periodontol.*, 2008, Vol. 79, no. 5, pp. 845-853.
16. Herrero E.R., Fernandes S., Verspecht T., Ugarte-Berzal E., Boon N., Proost P., Bernaerts K., Quirynen M., Teughels W. Dysbiotic Biofilms Derregulate the Periodontal Inflammatory Response. *J. Dent. Res.*, 2018, Vol. 97, no. 5, pp. 547-555.
17. Kassebaum N.J., Smith A.G.C., Bernabé E., Fleming T.D., Reynolds A.E., Vos T., Murray C.J.L., Marcenes W. Global, regional, and national prevalence, incidence, and disability-adjusted life years for oral conditions for 195 countries, 1990-2015: a systematic analysis for the global burden of diseases, injuries, and risk factors. *J. Dent. Res.*, 2017, Vol. 96, no. 4, pp. 380-387.
18. Kawamoto D., Amado P.P.L., Albuquerque-Souza E., Bueno M.R., Vale G.C., Saraiva L., Mayer M.P.A. Chemokines and cytokines profile in whole saliva of patients with periodontitis. *Cytokine*, 2020, Vol. 135, 155197. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155197.
19. Kc S., Wang X.Z., Gallagher J.E. Diagnostic sensitivity and specificity of host-derived salivary biomarkers in periodontal disease amongst adults: Systematic review. *J. Clin. Periodontol.*, 2020, Vol. 47, no. 3, pp. 289-308.
20. Liukkonen J., Gürsoy U.K., Könönen E., Gürsoy M., Metso J., Salminen A., Kopra E., Jauhiainen M., Mäntylä P., Buhlin K., Paju S., Sorsa T., Nieminen M.S., Lokki M.L., Sinisalo J., Pussinen P.J. Salivary biomarkers in association with periodontal parameters and the periodontitis risk haplotype. *Innate Immun.*, 2018. Vol. 24, no. 7, pp. 439-447.
21. Loos B.G., van Dyke T.E. The role of inflammation and genetics in periodontal disease. *Periodontol. 2000, 2020*, Vol. 83, pp. 26-39.
22. Lorenzo-Pouso A.I., Pérez-Sayáns M., Bravo S.B., López-Jornet P., García-Vence M., Alonso-Sampedro M., Carballo J., García-García A. Protein-based salivary profiles as novel biomarkers for oral diseases. *Dis. Markers*, 2018, Vol. 7, 6141845. doi: 10.1155/2018/6141845.
23. Nisha K.J., Suresh A., Anilkumar A., Padmanabhan S. MIP-1 $\alpha$  and MCP-1 as salivary biomarkers in periodontal disease. *Saudi Dent. J.*, 2018, Vol. 30, no. 4 pp. 292-298.
24. Pan W., Wang Q., Chen Q. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *Int. J. Oral Sci.*, 2019, Vol. 11, no. 3, 30. doi: 10.1038/s41368-019-0064-z.
25. Plemmenos G., Evangelioi E., Polizogopoulos N., Chalazias A., Deligianni M., Piperi C. Central regulatory role of cytokines in periodontitis and targeting options. *Curr. Med. Chem.*, 2020. doi: 10.2174/0929867327666200824112732.
26. Polepalle T., Moogala S., Boggarapu S., Pesala D.S., Palagi F.B. Acute phase proteins and their role in periodontitis: a review. *J. Clin. Diagn. Res.*, 2015, Vol. 9 no. 11, pp. 1-5.
27. Ramadan D.E., Hariyani N., Indrawati R., Ridwan R.D., Diyatri I. Cytokines and chemokines in periodontitis. *Eur. J. Dent.*, 2020, Vol. 14, no. 3, pp. 483-495.

28. Rath-Deschner B., Memmert S., Damanaki A., Nokhbehshaim M., Eick S., Cirelli J.A., Götz W., Deschner J., Jäger A., Nogueira A.V.B. CXCL1, CCL2, and CCL5 modulation by microbial and biomechanical signals in periodontal cells and tissues – *in vitro* and *in vivo* studies. *Clin. Oral Investig.*, 2020, Vol. 24, no. 10, pp. 3661-3670.
29. Ryder M.I. Periodontics in the USA: an introduction. *Periodontol.* 2000, 2020, Vol. 82, no. 1, pp. 9-11.
30. Souto G.R., Queiroz C.M. Jr., Costa F.O., Mesquita R.A. Relationship between chemokines and dendritic cells in human chronic periodontitis. *J. Periodontol.*, 2014, Vol. 85, no. 10, pp. 1416-1423.
31. Spitz A., Teles R.P., Nojima L.I. Influence of orthodontic loading on biomarkers levels around miniscrews. *Arch. Oral Biol.*, 2020, Vol. 112, 104668. doi: 10.1016/j.archoralbio.2020.104668.
32. Stadler A.F., Angst P.D., Arce R.M., Gomes S.C., Oppermann R.V., Susin C. Gingival crevicular fluid levels of cytokines/chemokines in chronic periodontitis: a meta-analysis. *J. Clin. Periodontol.*, 2016, Vol. 43, no. 9, pp. 727-745.
33. van Dyke T.E., Sima C. Understanding resolution of inflammation in periodontal diseases: is chronic inflammatory periodontitis a failure to resolve? *Periodontol.* 2000, 2020, Vol. 82, no. 1, pp. 205-213.
34. Wu Y.C., Ning L., Tu Y.K., Huang C.P., Huang N.T., Chen Y.F., Chang P.C. Salivary biomarker combination prediction model for the diagnosis of periodontitis in a Taiwanese population. *J. Formos. Med. Assoc.*, 2018, Vol. 117, no. 9, pp. 841-848.
35. Zekeridou A., Mombelli A., Cancela J., Courvoisier D., Giannopoulou C. Systemic inflammatory burden and local inflammation in periodontitis: what is the link between inflammatory biomarkers in serum and gingival crevicular fluid? *Clin. Exp. Dent. Res.*, 2019, Vol. 5, no. 2, pp. 128-135.
36. Zlotnik A., Yoshie O. The chemokine superfamily revisited. *Immunity*, 2012, Vol. 36, pp. 705-716.

**Авторы:**

**Базарный В.В.** — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский институт» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

**Мандра Ю.В.** — д.м.н., профессор, директор института стоматологии, профессор кафедры терапевтической стоматологии и пропедевтики стоматологических заболеваний ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский институт» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

**Полушина Л.Г.** — научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский институт» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

**Максимова А.Ю.** — младший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский институт» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

**Светлакова Е.Н.** — к.м.н., доцент кафедры пропедевтики и физиотерапии стоматологических заболеваний ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский институт» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

**Authors:**

**Bazarny V.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Main Research Associate, Central Research Laboratory, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

**Mandra Yu.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Institute of Dentistry, Professor, Department of Therapeutic Dentistry and Propedeutics of Dental Diseases, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

**Polushina L.G.**, Research Associate, Central Research Laboratory, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

**Maksimova A. Yu.**, Junior Research Associate, Central Research Laboratory, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

**Svetlakova E.N.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Therapeutic Dentistry and Propedeutics of Dental Diseases, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

# РЕСПУБЛИКАНСКИЙ РЕГИСТР ПЕРВИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТОВ В ЧУВАШСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ И ОПИСАНИЕ НАРУШЕНИЯ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У БЕРЕМЕННОЙ ПАЦИЕНТКИ С ОБЩЕЙ ВАРИАБЕЛЬНОЙ ИММУННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Карзакова Л.М.<sup>1</sup>, Мучукова О.М.<sup>1,2</sup>, Луткова Т.С.<sup>1</sup>, Кудряшов С.И.<sup>1</sup>,  
Журавлева Н.В.<sup>1</sup>, Ухтерова Н.Д.<sup>1</sup>, Гаврилова Э.С.<sup>1</sup>, Сидоров И.А.<sup>3</sup>,  
Одинцова А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Чувашская Республика, Россия

<sup>2</sup> БУ «Республиканская клиническая больница» Министерства здравоохранения Чувашской Республики, г. Чебоксары, Чувашская Республика, Россия

<sup>3</sup> БУ «Республиканская детская клиническая больница» Министерства здравоохранения Чувашской Республики, г. Чебоксары, Чувашская Республика, Россия

**Резюме.** В последние годы первичные иммунодефициты из разряда редко встречающихся заболеваний переходят в число заболеваний, с которыми может встретиться врач любой специальности. Первый случай первичных иммунодефицитных заболеваний (ПИДЗ) был выявлен в Чувашии в 1993 г. С тех пор на кафедре внутренних болезней с курсом клинической иммунологии Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова ведется регистрация всех диагностированных в регионе случаев ПИДЗ с внесением их в Республиканский регистр ПИДЗ. Целью настоящего исследования явилось изучение эпидемиологических показателей, клинико-лабораторных проявлений ПИДЗ на территории Чувашии. Материалом исследования служили данные о больных, полученные в ходе ретроспективного анализа 85 историй болезни больных ПИДЗ, находившихся на стационарном лечении в различных отделениях БУ «Республиканская клиническая больница» и БУ «Городская детская клиническая больница» Минздрава Чувашии в 2000-2019 гг., а также 49 амбулаторных карт пациентов, включенных в региональный регистр ПИДЗ. Диагностику различных форм ПИДЗ осуществляли в соответствии с критериями, разработанными Европейским Обществом по имму-

## Адрес для переписки:

Карзакова Луиза Михайловна  
ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет  
имени И.Н. Ульянова»  
428015, Россия, Чувашская Республика, г. Чебоксары,  
Московский пр., 15.  
Тел.: 8 (903) 358-82-89.  
E-mail: luizak58@mail.ru

## Address for correspondence:

Karzakova Louise M.  
I. Ulyanov Chuvash State University  
428015, Russian Federation, Chuvash Republic, Cheboksary,  
Moskovsky ave., 15.  
Phone: 7 (903) 358-82-89.  
E-mail: luizak58@mail.ru

## Образец цитирования:

Л.М. Карзакова, О.М. Мучукова, Т.С. Луткова,  
С.И. Кудряшов, Н.В. Журавлева, Н.Д. Ухтерова,  
Э.С. Гаврилова, И.А. Сидоров, А.В. Одинцова  
«Республиканский Регистр первичных  
иммунодефицитов в Чувашской Республике и описание  
нарушения поствакцинального иммунитета у  
беременной пациентки с общей вариабельной иммунной  
недостаточностью» // Медицинская иммунология,  
2021. Т. 23, № 2. С. 353-368.  
doi: 10.15789/1563-0625-RRO-2148

© Карзакова Л.М. и соавт., 2021

## For citation:

L.M. Karzakova, O.M. Muchukova, T.S. Lutkova,  
S.I. Kudryashov, N.V. Zhuravleva, N.D. Ukhterova,  
E.S. Gavrilova, I.A. Sidorov, A.V. Odintsova "Republican  
Registry of primary immune deficiencies in the Chuvash  
Republic and description of postvaccinal immunity disorders in  
a pregnant patient with common variable immune deficiency",  
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,  
2021, Vol. 23, no. 2, pp. 353-368.  
doi: 10.15789/1563-0625-RRO-2148

DOI: 10.15789/1563-0625-RRO-2148

нодефицитам и Панамериканской группой по иммунодефицитам (1999). Результаты исследования показали, что частота распространенности ПИДЗ в регионе составляет 3,4:100 000. Заболеваемость наиболее распространенной формы ПИДЗ в регионе – общей варибельной иммунной недостаточности (ОВИН) – составила 1,58 на 100 000 населения. Средний возраст на момент постановки диагноза ОВИН у больных Чувашии равнялся  $30,4 \pm 16,1$  годам, возраст дебюта ОВИН –  $11,3 \pm 15,0$  годам. Задержка постановки диагноза с момента клинической манифестации ОВИН составила в регионе в среднем 17,9 лет. На момент выставления диагноза ОВИН у больных обнаруживалось выраженное снижение уровней иммуноглобулинов 3-х или 2-х классов (IgG и IgA) и содержания в периферической крови Т-хелперных клеток ( $CD3^+CD4^+$ ). Показатель распространенности селективного дефицита IgA, проявляющегося клинически, составил 0,83 на 100 000 населения региона, частота встречаемости бессимптомной формы данного ПИДЗ – 1:167. У пациентов с селективным дефицитом IgA обнаруживались нарушения в Т-клеточной системе, проявляющиеся в уменьшении относительного числа цитотоксических Т-клеток. Уровни IgG и IgM оказались повышены. Возраст постановки диагноза X-сцепленной агаммаглобулинемии в регионе составил  $3,5 \pm 3,0$  года. Помимо нарушения в гуморальном звене адаптивного иммунитета у детей с данным заболеванием выявлялось уменьшение абсолютного числа Т-лимфоцитов. В заключение приведено описание нарушения поствакцинального иммунитета у беременной пациентки с ОВИН, бессимптомное течение которой привело к ложной трактовке показателей серологических маркеров ТОРЧ-инфекций и ошибкам в тактике ведения беременности.

*Ключевые слова:* регистр первичных иммунодефицитов, ОВИН, селективный дефицит IgA, X-сцепленная агаммаглобулинемия, поствакцинальный иммунитет

## REPUBLICAN REGISTRY OF PRIMARY IMMUNE DEFICIENCIES IN THE CHUVASH REPUBLIC AND DESCRIPTION OF POSTVACCINAL IMMUNITY DISORDERS IN A PREGNANT PATIENT WITH COMMON VARIABLE IMMUNE DEFICIENCY

Karzakova L.M.<sup>a</sup>, Muchukova O.M.<sup>a,b</sup>, Lutkova T.S.<sup>a</sup>, Kudryashov S.I.<sup>a</sup>, Zhuravleva N.V.<sup>a</sup>, Ukhterova N.D.<sup>a</sup>, Gavrilova E.S.<sup>a</sup>, Sidorov I.A.<sup>c</sup>, Odintsova A.V.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> I. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Chuvash Republic, Russian Federation

<sup>b</sup> Republican Clinical Hospital, Cheboksary, Chuvash Republic, Russian Federation

<sup>c</sup> Republican Pediatric Clinical Hospital, Cheboksary, Chuvash Republic, Russian Federation

**Abstract.** In recent years, primary immunodeficiencies have turned from the class of rare diseases to the category of more common disorders which may be encountered by doctors of any clinical discipline. The first case of primary immunodeficiency disorder (PID) in Chuvashia was detected in 1993. Since that time, the Department of Internal Diseases with the Course of Clinical Immunology at the I. Ulyanov Chuvash State University registered all the cases of PID diagnosed in the region, introducing them into the Republican Registry of PID. The study was aimed for searching epidemiological indexes, clinical and laboratory manifestations of PID in Chuvash region. The study was based on the patient data obtained by retrospective analysis of 85 case histories of PID patients, treated at different departments of the Republican Clinical Hospital, and the City Chuvash Pediatric Clinical Hospital of Public Health Ministry in 2000-2019, as well as on 49 outpatient records of the patients included into the Regional PID Registry. Various forms of PIDs were diagnosed according to the criteria developed by the European Society for Immunodeficiency and the Pan-American Group on Immunodeficiency (1999). The results of this study showed that the incidence of PID in the Chuvash Region is 3.4:100,000. The incidence of common variable immune deficiency (CVID), the most common form of

PID in the region, was 1.58 per 100,000 population. The average age at the time of CVID diagnosis in Chuvash patients was  $30.4 \pm 16.1$  years, and the age of CVID debut was  $11.3 \pm 15.0$  years. The delay in proper diagnosis from the moment of clinical manifestation of CVID was, on average, 17.9 years in the region. At the time of CVID diagnosis, the patients showed marked decrease in the levels of 3 or 2 immunoglobulin classes (IgG and IgA), and T-helper cell contents ( $CD3^+CD4^+$ ) in peripheral blood. Prevalence of selective IgA deficiency with clinical symptoms was 0.83 per 100,000 population of the region, and the incidence of the asymptomatic form of this PID was 1:167. In patients with selective IgA deficiency, there were also disorders in the T cell system manifesting as decreased relative number of cytotoxic T-cells as well as elevated IgG and IgM levels. The age of diagnosis of X-linked agammaglobulinemia in the region was  $3.5 \pm 3.0$  years. In addition to disturbances of humoral adaptive immunity in children with this disease, a decrease in absolute T cell numbers was detected. In conclusion, the article describes disturbances of postvaccinal immunity in a pregnant patient with CVID, with asymptomatic clinical course, thus leading to false interpretation of the serological markers of TORCH infections and wrong strategy of pregnancy management.

*Keywords: register of primary immunodeficiency, CVID, selective IgA deficiency, X-linked agammaglobulinaemia, postvaccinal immunity*

## Введение

В последние годы первичные иммунодефициты (ПИД) из разряда редко встречающихся заболеваний переходят в число заболеваний, с которыми может встретиться в клинической практике врач любой специальности. Первичное иммунодефицитное заболевание (ПИДЗ) связано с врожденным дефектом какого-либо компонента иммунного ответа, в ряде случаев – с комбинацией дефектов нескольких звеньев иммунного ответа, что обуславливает повышенную восприимчивость к инфекциям, склонность к развитию аллергических, аутоиммунных, лимфо-пролиферативных синдромов и злокачественных опухолей. К настоящему времени известно 430 различных форм ПИДЗ [16]. Полиморфность клинической картины, незнание реальной распространенности и трудности распознавания ПИДЗ обуславливают позднюю диагностику заболеваний данной группы, что приводит к развитию хронических очагов инфекции, тяжелых инфекционных осложнений, необратимых изменений в органах, ухудшению прогноза заболеваний и инвалидизации пациентов. В Чувашии первый случай ПИДЗ был выявлен в 1993 г. Это был случай общей вариабельной иммунной недостаточности (ОВИН) у пациента Г. 34 лет. С тех пор на кафедре внутренних болезней с курсом клинической иммунологии Чувашского государственного университета им. И.Н. Ульянова ведется регистрация всех диагностированных в Чувашской Республике случаев ПИДЗ с внесением их в Республиканский регистр ПИДЗ. Прошло 26 лет с момента диагностики первого случая ПИДЗ, однако до сих пор не проведена систематизация

региональных данных по заболеваемости ПИДЗ в Чувашии.

**Цель исследования** – анализ эпидемиологических показателей, клинико-лабораторных проявлений ПИДЗ на территории Чувашской Республики.

## Материалы и методы

Материалом исследования служили данные о больных, полученные в ходе ретроспективного анализа 85 историй болезни больных ПИДЗ, находившихся на стационарном лечении в различных отделениях БУ «Республиканская клиническая больница» и БУ «Городская детская клиническая больница» Министерства здравоохранения Чувашской Республики в 2000-2019 гг. и 49 амбулаторных карт пациентов, включенных в Республиканский регистр ПИДЗ. Преобладающая часть пациентов детского возраста, состоящих в Республиканском регистре, была обследована в Национальном медицинском исследовательском центре детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева (Москва), заболевания были подтверждены на молекулярно-генетическом уровне. Нами проведен анализ эпидемиологических данных по различным формам ПИДЗ, изучены клинико-иммунологические особенности ПИДЗ на территории Чувашской Республики. Лабораторные показатели группы больных ПИДЗ сравнивали с таковыми двух контрольных групп – контрольной группы 1, которая включала практически здоровых лиц в возрасте от 16 до 65 лет, и контрольной группы 2, включавшей практически здоровых детей от 2 до 5 лет.

Диагностику различных форм ПИДЗ осуществляли в соответствии с критериями, разра-

ботанными Европейским обществом по иммунодефицитам и Панамериканской группой по иммунодефицитам в 1999 г. [9].

#### Методы регистрации лабораторных показателей

Предварительно выделяли из венозной крови мононуклеарные клетки (МНК) с использованием градиента плотности ( $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ ) фикола-верографина, затем проводили идентификацию Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>), В-лимфоцитов (CB20<sup>+</sup>) и субпопуляций Т-лимфоцитов – CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клеток методом прямой иммунофлуоресценции на проточном цитометре Fc500 («Beckman Coulter», США). При этом использовали моноклональные антитела (МКАТ) к соответствующим дифференцировочным маркерам – CD3, CD20, CD4, CD8, CD20 и флуоресцирующие красители – флуоресцеина-5-изотиоционат (ФИТЦ) и R-фикоэритрин (РЕ) (Beckman Coulter, США). Все этапы иммунофенотипирования МНК с использованием МКАТ выполняли в соответствии с инструкцией производителя МКАТ.

Определение содержания иммуноглобулинов IgA, IgG и IgM осуществляли в сыворотке крови иммунотурбидиметрическим методом на автоматическом биохимическом анализаторе ILab 650 (Япония, Италия).

#### Этическая экспертиза

Перед началом исследования получали от больных (или родителей больных детей), а также от здоровых лиц добровольное информированное согласие на исследование в письменной форме. Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом при ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова».

#### Статистический анализ

Полученные в ходе исследования данные обрабатывали с помощью пакета статистических программ Statistica v. 10.0 (StatSoft Inc., США). Предварительно проверяли полученные значения изучаемых показателей на соответствие правильному распределению по методу Колмогорова–Смирнова с поправкой Лиллиефорса. При установлении неправильного (асимметричного) распределения значений использовали непараметрический критерий Манна–Уитни ( $p_{m-w}$ ) для оценки достоверности межгрупповых различий показателей и групповые показатели выражали в виде медианы (Me) и перцентильного диапазона значений в пределах от 10-го перцентиля до 90-го перцентилей ( $Q_{0,10}$ – $Q_{0,90}$ ). При правильном распределении совокупности значений показателей в группах данные выражали в формате  $M \pm SD$ , где  $M$  – средняя арифметическая,  $SD$  – среднеквадратичное отклонение.

## Результаты

#### Клинико-эпидемиологические показатели

За период времени с 1993 г. по январь 2020 г. зарегистрировано 49 случаев врожденных дефектов иммунной системы у жителей Чувашии, из них 42 пациента живы, а семерых нет в живых по причине смерти из-за инфекционных и других осложнений. 20 пациентов внесены в «Регистр больных с первичными иммунодефицитными состояниями (РПИДС)», созданный на платформе Rosmed.info в 2017 г. по инициативе «Национальной Ассоциации Экспертов в области Первичных Иммунодефицитов (НАЭПИД)». Заболеваемость ПИДЗ на территории Чувашии с численностью населения около 1 200 000 человек составляет 3,4 на 100 000 человек. В Республиканском регистре ПИДЗ преобладают случаи ОВИН (26 человек). Заболеваемость ОВИН с клиническими проявлениями составляет 1,58 на 100 000 населения, на втором месте по частоте встречаемости – селективный дефицит IgA (10 человек) с показателем заболеваемости клинически проявляющихся случаев заболевания – 0,83 на 100 000 населения. На третьем месте по показателю распространенности – X-сцепленная агаммаглобулинемия, или болезнь Брутона (4 человека) и наследственный ангионевротический отек (4 человека). На долю остальных форм ПИДЗ приходится 5 случаев: 2 случая синдрома Луи–Бар, по одному случаю синдрома Диджорджи, синдрома Вискотта–Олдрича и гипер-IgE-синдрома. В регистр не включены дети с транзиторной гипогаммаглобулинемией раннего возраста. Это связано с отсутствием четких критериев диагностики этой формы ПИДЗ и со сложностями в ее дифференциации от вторичных иммунодефицитных состояний у детей до 3 лет.

Среди больных ПИДЗ в Чувашии преобладают взрослые пациенты – 39 человек (79,6%), что можно объяснить высокой представленностью в Республиканском регистре ПИДЗ больных ОВИН и селективным дефицитом IgA, диагностируемых преимущественно на третьем десятке жизни (табл. 1).

Случаи ОВИН манифестировали чаще всего (69,2%) повторными пневмониями, требовавшими длительной антибиотикотерапии; риносинуситами (50%) и бронхитами (50%). На момент постановки диагноза ОВИН у пациентов имелись признаки хронического гнойного бронхита, риносинусита, рецидивирующего мезотимпанита, возраст варьировал от 10 до 62 лет. Диагноз ОВИН был выставлен в среднем спустя 17,9 лет после возникновения первых клинических про-

**ТАБЛИЦА 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГРУПП ПАЦИЕНТОВ С НАИБОЛЕЕ ЧАСТО ВСТРЕЧАЮЩИМИСЯ ФОРМАМИ ПИДЗ**

TABLE 1. GENERAL CHARACTERISTICS OF GROUPS OF PATIENTS WITH THE MOST COMMON FORMS OF PID

Показатель Indicator	ОВИН CVID	Селективный дефицит IgA Selective IgA deficiency	X-сцепленная агаммаглобулинемия X-linked agammaglobulinaemia
<b>Число зарегистрированных больных</b> Number of registered patients	26	10	4
<b>Мужчины, % (абс.)</b> Men, % (abs.)	58 (15)	40 (4)	100 (4)
<b>Женщины, % (абс.)</b> Women, % (abs.)	42 (11)	60 (6)	0 (0)
<b>Число живых больных, абс.</b> Number of living patients, abs.	19	10	3
<b>Возраст живых пациентов, годы</b> Age of living patients, years	41,1±19,1	29,2±11,9	4,5±2,6
<b>Число умерших пациентов, абс.</b> Number of patients who died, abs.	7	–	1
<b>Продолжительность жизни умерших, годы</b> Life expectancy of the deceased, years M±SD	44,6±16,1	–	0,6±0,5
<b>Возраст проявления ПИДЗ, годы</b> Age of manifestation of PID, years M±SD	11,3±15,0	24,5±7,8	0,4±0,5
<b>Возраст в момент постановки диагноза ПИДЗ, годы</b> Age at diagnosis PID, years M±SD	30,4±16,1	27,5±10,6	3,5±3,0
<b>Продолжительность периода от манифестации ПИДЗ до постановки диагноза, годы</b> Duration of the period from the manifestation of PID to the diagnosis, years M±SD	17,9±17,5	8,5±2,1	2,0±2,2
<b>Число пневмоний у одного пациента за период наблюдения за больным</b> Number of pneumonias in one patient during the follow up period M±SD	7,9±7,4	0,0	1,7±1,2
<b>Индекс массы тела, кг/м<sup>2</sup></b> Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	19,0±4,3	22,0±5,0	11,2±1,8

явлений. Инфекционный синдром проявлялся помимо респираторных инфекций рецидивирующим фурункулезом (у 4 больных), генитальным герпесом (у 3 пациентов), опоясывающим лишаем (у 3 пациентов). Наличие бронхоэктазов у половины больных затрудняло санацию респираторной системы. В наблюдаемой нами когорте

пациентов с ОВИН пяти больным была проведена резекция пораженных бронхоэктазами долей легких. У 17 (65%) больных наблюдались желудочно-кишечные заболевания (хронический гастрит, энтерит, аденокарцинома желудка, мальабсорбция). Помимо инфекционного синдрома у больных ОВИН был распространен лимфопро-

лиферативный синдром, который проявлялся у 11 (42%) пациентов гепатоспленомегалией, лимфоаденопатией, у 2 больных — лимфомой. Ряду пациентов были произведены хирургические вмешательства по удалению вторичных иммунологических органов: аппендэктомия — 4 больным, спленэктомия — 2 (по поводу лимфомы) и тонзиллэктомия — 3 больным. У 9 пациентов (34,6%) заболевание проявлялось аутоиммунным синдромом (ревматоидноподобный артрит без прогрессирования суставных поражений, витамин В<sub>12</sub>-дефицитная анемия, аутоиммунный тиреоидит, псориаз, склеродермоподобный синдром, аутоиммунный гепатит). У 8 пациентов имелись аллергические проявления. 5 случаев летальных исходов ОВИН из общего числа (7) наблюдались у пациентов, у которых заболевание проявилось и было диагностировано еще в 90-е годы прошлого века, когда не было возможности в стране обеспечить таких больных регулярной заместительной терапией иммуноглобулинами. Данная группа больных имела тяжелое проявление заболевания в виде рецидивирующих или хронических гнойных бактериальных инфекций (абсцедирующая пневмония, гнойный бронхит с бронхоэктазами, менингит, мезотимпанит, пансинусит) в сочетании с неинфекционными проявлениями (лимфома, витамин-В<sub>12</sub>-дефицитная анемия, ревматоидноподобный артрит). У больных этой же группы обнаруживались спленомегалия, токсическое поражение печени и почек из-за использования множества лекарственных препаратов, мальабсорбция, дефицит массы тела с формированием синдрома белково-энергетической недостаточности.

Селективный дефицит IgA проявлялся преимущественно легко протекающими, «малыми» бактериальными инфекциями (отиты, риносинуситы, ангины). По сравнению с ОВИН клинические проявления селективного дефицита IgA проявлялись позже, но диагноз выставлялся раньше.

Болезнь Брутона у исследуемых больных проявлялась в раннем детском возрасте, на момент постановки диагноза средний возраст детей составлял 3,5 года. Все случаи выставления диагноза данного заболевания приходятся на период с 2012 по 2017 гг. По всей видимости, случаи данного заболевания оставались не распознанными до 2012 г. из-за малой осведомленности врачей-педиатров о данном заболевании и/или отсутствия диагностических возможностей. В последнее десятилетие облегчился порядок направления детей на обследование в Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии,

онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, благодаря чему удалось добиться своевременного распознавания болезни Брутона, для диагностики которой важна генетическая диагностика. У всех детей X-сцепленная агаммаглобулинемия была подтверждена выявлением мутации в гене ВТК (Bruton tyrosine kinase). В каждом случае болезни Брутона прослеживался отягощенный наследственный анамнез по данному заболеванию: брат одного пациента также болен X-сцепленной агаммаглобулинемией, а у других братья умирали в раннем детстве от тяжелых инфекций (в одном случае — от тяжелой двусторонней пневмонии, в другом — от бактериального менингита). Во всех 4 случаях заболевание манифестировало пневмонией в сочетании или с гнойным мезотимпанитом, или риносинуситом. У одного больного ребенка наблюдалась повторная ветряная оспа. Все дети имели белково-энергетическую недостаточность, отставали от сверстников по физическому развитию.

Центральное место в лечении ОВИН и болезни Брутона занимает заместительная терапия препаратами иммуноглобулинов для внутривенного введения (ВВИГ). В исследуемой когорте пациентов регулярно получали заместительную терапию 14 (46,6%) человек. В преобладающем большинстве случаев больным вводили Пентаглобин и Иммуновенин (из расчета 0,3-0,4 г/кг в месяц). У 6 пациентов отмечено развитие аллергических реакций на ВВИГ. Наиболее аллергичным оказался Пентаглобин, он вызывал реакции у 1/4 пациентов, которым назначался этот препарат. На втором месте по частоте вызываемых реакций был Имбиоглобулин, он вызвал реакцию у 2 пациентов. Лучше всего переносились такие препараты, как Габриглобин, Привиджен и Гамунокс. На них не отмечено ни одного случая развития непереносимости. Пациенты детского возраста получали преимущественно Привиджен. Помимо заместительной терапии ВВИГ, дети с болезнью Брутона получают антибиотикотерапию — азитромицин (10 мг/кг через день) или Бисептол (120 мг по 5 дней в неделю) на фоне противогрибкового препарата — Дифлюкана (3 мг/кг 1 раз в неделю).

#### **Иммуно-лабораторные показатели**

В таблицах 2 и 3 приведены средние лабораторные показатели на момент постановки диагноза у больных различными формами ПИДЗ.

Показатели контрольных групп рассматривали как референсные значения, характерные для региона. В контрольные группы включали практически здоровых лиц, не имеющих хронических заболеваний, связанных с нарушениями

**ТАБЛИЦА 2. ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ У ПАЦИЕНТОВ С НАИБОЛЕЕ ЧАСТО ВСТРЕЧАЮЩИМИСЯ ФОРМАМИ ПИДЗ, Me (Q<sub>0,10</sub>-Q<sub>0,90</sub>)**

TABLE 2. LABORATORY PARAMETERS IN PATIENTS WITH THE MOST COMMON FORMS OF PID, Me (Q<sub>0,10</sub>-Q<sub>0,90</sub>)

Показатель Indicator	Контрольная группа 1 Control group 1 n = 115	Контрольная группа 2 Control group 2 n = 115	ОВИН CVID n = 26	Селективный дефицит IgA Selective IgA deficiency n = 10	Х-сцепленная агамма-глобулинемия X-linked agammaglobulinaemia n = 4
Лейкоциты, × 10 <sup>9</sup> /л Leukocytes, × 10 <sup>9</sup> /l	5,2 (4,12-7,12)	8,2 (6,45-9,10)	9,4*** (6,2-12,6)	6,2 (3,8-9,8)	8,3 (4,9-12,0)
Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/l	131,4 (123-151)	118,4 (105-134)	106,2*** (88,4-124,0)	132,4 (97,0-167,8)	110,7 (75,7-135,2)
Сывороточное железо, нг/мл Serum iron, ng/ml	15,2 (9,6-27,3)	11,5 (7,4-23,3)	4,4*** (3,3-6,6)	14,6 (11,2-16,2)	5,2 <sup>ooo</sup> (3,4-9,1)
Тромбоциты, × 10 <sup>6</sup> /л Platelets, × 10 <sup>6</sup> /l	230 (170-290)	302 (180-420)	238,8 (152-320)	241,5 (162-322)	310,0 (240-362)
Гамма-глобулины, % Gamma globulins, %	18,2 (15-22)	15,1 (10-21)	7,6*** (2,1-8,1)	16,4 (9,2-23,9)	6,4 <sup>ooo</sup> (2,1-7,6)
Т-лимфоциты T lymphocytes (CD3 <sup>+</sup> ), %	63,4 (52-72)	68,2 (56-79)	55,2*** (42-69)	72,2 (62-79)	69,2±14,6 (55-78)
Т-лимфоциты (CD3), абс (× 10 <sup>9</sup> /л) T lymphocytes (CD3 <sup>+</sup> ), abs (× 10 <sup>9</sup> /l)	1,25 (0,90-1,60)	2,1 (1,6-2,3)	1,13 (0,62-1,60)	1,35 (0,73-1,90)	1,17 <sup>oo</sup> (0,62-1,77)
Т-хелперы T helpers (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> ), %	38,2 (32-45)	34,3 (28-43)	28,5*** (22-34)	34,9 (27-44)	32,3 (26-39)
Цитотоксические Т-лимфоциты Cytotoxic T lymphocytes (CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> ), %	25,0 (18-30)	27,4 (20-32)	26,3 (20-33)	18,9** (12-25)	28,9 (22-32)
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	1,56 (1,2-2,3)	1,31 (1,2-1,8)	1,09*** (0,7-1,5)	1,7 (1,4-2,5)	1,2 (1,0-1,5)
В-лимфоциты B lymphocytes (CD20), %	13,0 (5-23)	14,2 (8-20)	11,0* (5-15)	15,0 (11-17)	1,0 <sup>ooo</sup> (0-2)
В-лимфоциты (CD20), абс (× 10 <sup>9</sup> /л) B lymphocytes (CD20), abs (× 10 <sup>9</sup> /l)	0,26 (0,1-0,4)	0,41 (0,20-0,58)	0,22 (0,15-0,29)	0,27 (0,15-0,36)	0,01 <sup>ooo</sup> (0,006-0,014)

Примечание. Звездочками обозначены степени различия значений показателей относительно значений контрольной группы 1 по критерию Манна–Уитни (\* – p < 0,05; \*\* – p < 0,01; \*\*\* – p < 0,001), кружочками обозначены степени различия значений показателей относительно значений контрольной группы 2 (<sup>oo</sup> – p < 0,01; <sup>ooo</sup> – p < 0,001).

Note. Asterisks denote the degree of difference in the values of indicators relative to the values of control group 1 according to the Mann–Whitney test (\*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.001), circles indicate the degree of difference in values indicators relative to the values of the control group 2 (<sup>oo</sup>, p < 0.01; <sup>ooo</sup>, p < 0.001).

**ТАБЛИЦА 3. СЫВОРОТОЧНЫЕ УРОВНИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С НАИБОЛЕЕ ЧАСТО ВСТРЕЧАЮЩИМИСЯ ФОРМАМИ ПИДЗ, Me (Q<sub>0,10</sub>-Q<sub>0,90</sub>)**

TABLE 3. SERUM IMMUNOGLOBULIN LEVELS IN PATIENTS WITH THE MOST COMMON FORMS OF PID, Me (Q<sub>0,10</sub>-Q<sub>0,90</sub>)

Показатель Indicator	Контрольная группа 1 Control group 1 n = 220	Контрольная группа 2 Control group 2 n = 115	ОВИН CVID n = 26	Селективный дефицит IgA Selective IgA deficiency n = 10	Х-сцепленная агаммаглобулинемия X-linked agammaglobulinaemia n = 4
<b>IgA, г/л</b> IgA, g/l	1,63 (0,7-2,1)	0,8 (0,25-1,10)	0,06*** (0,02-0,10)	0,002*** (0,000-0,008)	0,06 <sup>ooo</sup> (0,00-0,13)
<b>IgG, г/л</b> IgG, g/l	11,7 (7,0-16,0)	8,1 (4,5-12,2)	2,9*** (2,1-3,4)	15,0*** (13,1-18,2)	2,1 <sup>ooo</sup> (1,5-2,3)
<b>IgM, г/л</b> IgM, g/l	1,28 (0,4-1,3)	1,23 (0,4-1,7)	0,03*** (0,01-0,05)	1,6** (1,2-1,9)	0,03 <sup>ooo</sup> (0,01-0,05)

Примечание. Звездочками обозначены степени различия значений показателей относительно значений контрольной группы 1 по критерию Манна–Уитни (\*\* – p < 0,01; \*\*\* – p < 0,001), кружочками обозначены степени различия значений показателей относительно значений контрольной группы 2 (<sup>ooo</sup> – p < 0,001).

Note. Asterisks indicate the degree of difference between the values of indicators relative to the values of the control group 1 according to the Mann–Whitney test (\*\* – p < 0.01; \*\*\* – p < 0.001), circles indicate the degree of difference between the values of indicators relative to the values of the control group 2 (<sup>ooo</sup>, p < 0.001).

в иммунной системе (аутоиммунные и аллергические заболевания, инфекционно-воспалительные заболевания, лимфопролиферативные заболевания), а также случаи острой патологии (острые респираторные инфекции, ангины и др.) в течение последнего месяца перед исследованием и не получавших лечение препаратами, способными влиять на иммунологические показатели (нестероидные противовоспалительные препараты, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, противоэпилептические средства). С целью исключения сезонных влияний на показатели иммунного статуса, забор крови для исследований проводили в летние месяцы и зимние. В образцах крови летних исследований индивидуальные значения IgA колебались от 0 до 1,9 г/л в контрольной группе 1 и от 0 до 1,0 г/л в контрольной группе 2, в каждой из контрольных групп было обнаружено по одному человеку с полным отсутствием в сыворотке крови IgA. В зимней серии исследований не было обнаружено нулевых значений IgA ни в одной контрольной группе, при этом диапазон колебаний индивидуальных значений показателя составил 0,9-2,7 г/л в контрольной группе 1 и 0,3-1,4 г/л в контрольной группе 2.

В связи с имеющимися возрастными различиями в группах больных с различными формами ПИДЗ, показатели пациентов с ОВИН (средний

возраст – 30,4±16,1 года) и селективным дефицитом IgA (27,5±10,6 года) сравнивали со значениями контрольной группы 1 (средний возраст – 28,2±9,3 года), а показатели больных детей с болезнью Брутона (3,5±3 года) – со значениями контрольной группы 2 (3,8±3,2 года). У больных ОВИН к моменту постановки диагноза обнаруживались лейкоцитоз, анемия, гипоферремия и гипогаммаглобулинемия. Последние два лабораторных признака (гипоферремия и гипогаммаглобулинемия) отмечались и у детей с болезнью Брутона.

У больных выявлялись существенные изменения в показателях иммунограммы. Так, у пациентов с ОВИН обнаруживали существенное снижение уровней 3 основных классов иммуноглобулинов – IgA, IgG, IgM, уменьшение относительного числа В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов (за счет уменьшения числа клеток хелперной субпопуляции). В группе больных селективным дефицитом IgA отмечалось уменьшение процентного содержания цитотоксических Т-клеток, выраженное снижение содержания IgA в сыворотке крови с полным его отсутствием у 8 из 10 пациентов и повышение уровней других двух классов иммуноглобулинов – IgG и IgM. У детей с болезнью Брутона установлено уменьшение абсолютного числа Т-лимфоцитов при сохранении их относительного содержания на уровне здоро-

вых лиц. Более выраженными были изменения в показателях В-системы иммунитета: содержание В-лимфоцитов было резко снижено как по абсолютному, так и относительному значениям, уровни всех 3 исследуемых классов иммуноглобулинов оказались существенно сниженными по сравнению с показателями здоровых детей соответствующего возраста.

## Обсуждение

Результаты проведенного исследования показали, что частота распространенности ПИДЗ в Чувашии составляет 3,4:100 000, что укладывается в диапазон распространенности ПИДЗ в европейских странах, составляющий от 1,3 до 5, согласно Европейскому Регистру первичных иммунодефицитов [4]. Заболеваемость наиболее распространенной формы ПИДЗ в Чувашии – ОВИН с клиническими проявлениями заболевания составила 1,58 на 100 000 населения, что соответствует общеизвестным данным о распространенности данного заболевания [6, 19]. Средний возраст на момент постановки диагноза ОВИН у больных Чувашии (30,4 года) приближается к значениям, известным из литературы – 31 год у мужчин и 34 года у женщин [12]. Возраст дебюта заболевания, среднее значение которого составило 11,3 года, практически совпадает с показателем – 10,3 года, определенным группой отечественных исследователей у больных данным ПИДЗ [3] и значительно меньше значения данного показателя – 18 лет, представленного в Европейском Регистре ПИД [12].

Для больных ОВИН было характерно сочетание нескольких клинических синдромов – инфекционного, лимфопролиферативного, аутоиммунного и аллергического. Ведущим клиническим синдромом ОВИН являлись хронические и/или рецидивирующие респираторные инфекции. Известные из литературы результаты исследования также подтверждают преобладание среди клинических проявлений данного заболевания инфекций бронхолегочной системы и ЛОР-органов [20]. У половины пациентов выявлялись бронхоэктазы. В публикациях других авторов также сообщалось о том, что повторные тяжелые инфекционно-воспалительные процессы в органах дыхания способствуют развитию необратимых процессов в легких с формированием бронхоэктазов, которые встречаются более чем у 1/3 больных ОВИН [15]. Большая часть больных, имея в анализах крови изменение уровня гаммаглобулинов на протяжении более десятка лет, не была подвергнута иммунологическому обследованию и не консультирована иммунологом, что

обусловило задержку постановки диагноза с момента клинической манифестации заболевания в среднем на 17,9 лет (от 2 до 52 лет). Другие отечественные авторы отмечают задержку с выставлением диагноза ОВИН в среднем от 12,6 года (от 2 до 45 лет) [3] до 19 лет [2], в то время как общеевропейский показатель диагностической задержки составил всего 4 года (от 0 до 69 лет) [12]. Очевидно, задержка выставления диагноза ОВИН связана с плохой осведомленностью врачей первичного звена с проявлениями ПИДЗ, а также с выраженной гетерогенностью данного заболевания и диагностическими трудностями. Большая задержка в диагностировании ОВИН в Чувашии объясняется тем, что 5 случаев (19,2%) заболевания были распознаны еще в 90-е годы прошлого века, когда практические врачи мало знали об иммунопатологических состояниях, и иммунологические методы диагностики не были доступны в практическом здравоохранении. В этих условиях больные с недиагностированными ПИДЗ погибали от инфекционных осложнений. Когда в начале 90-х годов прошлого века появилась возможность проведения иммунологических исследований, благодаря открытию иммунологических лабораторий в Чувашии, было распознано 5 случаев ОВИН у пациентов, страдавших рецидивирующими пневмониями, риносинуситами и другими проявлениями иммунодефицитов. На момент диагностики заболевания средний возраст больных данной группы достиг 35,2 года, а средняя длительность предшествовавшего периода рецидивирующих инфекций составила 26,5 лет. Среднее значение возраста больных ОВИН на момент смерти равнялось 44,6 годам (при минимальном значении – 17 лет и максимальном – 65 лет), что очень близко к данным Resnick E.S. и соавт., согласно которым возраст умерших от ОВИН больных женщин составил 44 года (10-90 лет), мужчин – 42 года (9-79 лет) [14].

Показатель распространенности селективного дефицита IgA в Чувашии составил 0,83 на 100 000 населения. Очевидно, данный показатель не отражает фактическую распространенность рассматриваемого дефекта иммунной системы, составляющую, по данным литературы, 1:134 – 1:18500, в зависимости от рассматриваемой популяции [11]. Известно, что 90% случаев селективного дефицита IgA имеет бессимптомное течение [21]. Правильнее было бы рассчитывать показатель распространенности селективного дефицита IgA в отдельности для «бессимптомной» формы и формы, проявляющейся клинически из-за нарушения противоинфекционного иммунитета и повышения восприимчивости к

инфекциям. Наши исследования показали, что в общей когорте 335 практически здоровых лиц (220 взрослых и 115 детей) оказались два человека с полным отсутствием IgA. Причем случаи дефицита IgA в образцах крови у представителей контрольных групп выявлялись лишь в летней серии исследований. В тестах, проведенных в зимний период, в числе практически здоровых людей, не оказалось ни одного человека с дефицитом IgA. Данные факты свидетельствуют о том, что состояние здоровья лиц с бессимптомной формой селективного дефицита IgA в летний период не отличается от такового здоровой популяции населения, в то время как в зимний период лица с данным дефектом иммунной системы, хоть и условно «бессимптомным», не выдерживают критериев включения в контрольную группу, видимо из-за имеющейся повышенной чувствительности к сезонным респираторным инфекциям. Другие авторы используют для обозначения повышенного риска инфекций у лиц с асимптомным селективным дефицитом IgA понятие «субклиническое проявление селективного дефицита IgA» [17]. В соответствии с исследованиями летнего периода, распространенность селективного дефицита IgA среди практически здоровых людей составляет 2 случая на 335 человек (1:167). Чтобы оценить истинную распространенность селективного дефицита IgA среди жителей Чувашии, требуется исследование с использованием более крупной когорты исследуемых лиц. Полученные нами данные о сезонном влиянии на частоту обнаружения селективного дефицита IgA подтверждаются результатами исследования Weber-Mzell D. и соавт. [18], свидетельствующими об обнаружении 8 случаев селективного дефицита IgA среди 2087 обследованных в летний период лиц европейской популяции и отсутствия случаев выявления селективного дефицита IgA среди 3595 обследованных в зимнее время. Из данных этих же авторов следует, что сывороточный уровень IgA у человека в зимний период выше, чем в весенний, летний и осенний периоды.

Диагноз селективного дефицита IgA выставлялся в регионе со значительной задержкой, хотя и с меньшей, чем у больных ОВИН. Данный факт находит объяснение в том, что большая часть случаев селективного дефицита IgA выявлена в последние годы, когда врачи стали более осведомленными в вопросах диагностики ПИДЗ.

На момент выставления диагноза ОВИН у больных обнаруживалось выраженное снижение уровней иммуноглобулинов 3-х или 2-х классов (IgG и IgA) и содержания в периферической крови Т-хелперных клеток ( $CD3^+CD4^+$ ). Такой

же спектр изменений в иммунограммах больных ОВИН находили и другие исследователи [5]. У пациентов с селективным дефицитом IgA также обнаруживалось нарушение в Т-клеточной системе, проявляющееся уменьшением относительного числа цитотоксических Т-клеток, а сывороточные уровни IgG и IgM оказались повышены, что подтверждает известные из литературы данные о компенсаторном повышении продукции данных классов иммуноглобулинов при селективном дефиците IgA [10, 13]. У больных детей с X-сцепленной агаммаглобулинемией помимо нарушения в гуморальном звене адаптивного иммунитета выявлялось уменьшение абсолютного числа Т-лимфоцитов. Выявленные изменения в Т-системе у больных с дефектами в антителопродукции, возможно, являются приобретенными. Можно предположить, что условием клинического проявления бессимптомно протекающих ОВИН и селективного дефицита IgA является присоединение вторичной недостаточности клеточного звена адаптивного иммунитета. Основанием для такого предположения является то, что большинство случаев ПИДЗ впервые проявлялись клинически, когда пациенты оказывались в условиях повышенного риска развития вторичных иммунодефицитов. Так, в роли провоцирующего фактора, обуславливающего манифестацию ОВИН и селективного дефицита IgA, в наших наблюдениях часто выступал переезд пациента из одного географического региона проживания в другой, что является фактором риска срыва адаптационных реакций организма и развития Т-клеточной недостаточности. Вторым по частоте встречаемости провоцирующим фактором являлось проживание в экологически неблагоприятных зонах региона, в частности в промышленно насыщенном Калининском административном районе г. Чебоксары и в г. Новочебоксарск, в котором долгие годы функционирует химический комбинат. Нами ранее было показано, что проживание на этих территориях Чувашии обуславливает развитие вторичной иммунологической недостаточности Т-системы [1]. Основным механизмом делеции Т-клеток является апоптоз, к которому более чувствительны  $CD4^+$  клетки. Возможно, уменьшение числа  $CD4^+$  клеток у больных ОВИН связано с активацией апоптоза этих клеток. В пользу данного предположения свидетельствует обнаружение Azizi G. и соавт. повышенной экспрессии у больных ОВИН маркера  $CD95$  на  $CD4^+CD45RA^+$ Т-клетках, содержащих преимущественно наивные  $CD4^+$ Т-клетки, и активации спонтанного апоптоза данных клеток [5]. В других исследованиях

у больных ОВИН выявлено снижение содержания Т-регуляторных (Treg)-клеток фенотипа  $CD4^+CD127^{low}CD25^{high}FoxP3^+$ , что может иметь патогенетическую роль в развитии аутоиммунных проявлений ОВИН [22]. Наряду с приобретенными расстройствами у больных ОВИН могут иметь место врожденные изменения в Т-системе иммунитета, в частности такие, которые вызывают дефект рекрутирования  $CD4^+$  клеток и их взаимодействия с В-лимфоцитами [8].

#### **Описание нарушения формирования поствакцинального иммунитета у пациентки с ОВИН**

Известно, что у больных ПИДЗ нарушено формирование поствакцинального иммунитета, и прививка живыми вакцинами таких пациентов запрещена из-за возможных поствакцинальных осложнений. В большинстве наблюдаемых нами случаев ОВИН и селективного дефицита IgA иммунодефицит не был распознан в детском возрасте, и прививки, в том числе и живыми вакцинами, были проведены в соответствии с Национальным календарем профилактических прививок Российской Федерации. К счастью, поствакцинальных осложнений не наблюдалось. Мы столкнулись с нарушением формирования поствакцинального иммунитета к краснухе у молодой женщины с ОВИН. Наш опыт ведения данной пациентки, с которым мы делимся в ниже приведенном описании клинического случая, может быть полезен как для врачей акушер-гинекологов, так и врачей-иммунологов.

Пациентка К., 1985 года рождения, в 2005 г. в возрасте 20 лет прошла стандартное обследование в связи с впервые наступившей беременностью. При этом были обнаружены специфические IgM к краснухе при отрицательном титре специфических антител IgG. Ситуация была расценена как первичное инфицирование вирусом краснухи, хотя пациентка указывала на то, что ранее была привита вакциной против краснухи. Беременность была прервана на сроке 20 недель из-за риска развития врожденной краснухи у плода и тератогенного действия на плод вируса краснухи. Спустя 6 месяцев, в июне 2006 г., женщина была вакцинирована против краснухи. Спустя 4 месяца при исследовании сыворотки крови на специфические антитела к краснухе вновь обнаружены лишь антитела класса IgM при полном отсутствии специфических IgG. Пациентка была консультирована врачом-инфекционистом, который расценил отсутствие специфических антител IgG как слабый иммунный ответ на вакцину, в связи с чем рекомендовал консультацию иммунолога. При объективном исследовании органов и систем организма пациентки иммунологом не

было выявлено никаких патологических изменений, кроме дефицита массы тела (индекс массы тела –  $17 \text{ кг/м}^2$ ). В детстве с 3-го месяца жизни до 5 лет отмечался аллергический дерматит, болела гастритом. Пациентка беременна, срок беременности – 4 недели. При анализе показателей иммунограмм от 19.10.06 г. и от 08.11.06 г. обращало внимание резкое снижение концентрации IgG и IgA на фоне нормального содержания IgM (табл. 4). Суммарная концентрация иммуноглобулинов основных трех классов – IgG, IgA и IgM составила 2,16 г/л и 2,2 г/л по данным первой и второй иммунограмм соответственно. При ультразвуковом исследовании органов брюшной полости обнаружено умеренное увеличение размеров селезенки до  $120 \times 48 \text{ мм}$ . Площадь селезенки составила  $57 \text{ см}^2$  при норме менее  $50 \text{ см}^2$ . На основании анамнеза заболевания, данных клинико-лабораторного обследования выявлен ведущий лабораторный синдром – агаммаглобулинемия (суммарная концентрация IgG, IgA и IgM ниже 3 г/л), что стало поводом для проведения дифференциального диагноза в пределах патологических состояний, проявляющихся данным синдромом – 1) гипогаммаглобулинемии с повышенным уровнем IgM, 2) болезни Брутона, 3) общей вариабельной иммунологической недостаточности, 4) вторичной агаммаглобулинемии. Гипогаммаглобулинемия с повышенным уровнем IgM была исключена на основании того, что уровень данного класса иммуноглобулинов во всех иммунограммах не выходил за пределы референсных значений. Сохранение нормальных значений содержания В-лимфоцитов в периферической крови позволило исключить болезнь Брутона. В качестве причинных факторов развития вторичной агаммаглобулинемии могут выступать нефротический синдром, миеломная болезнь, ожоговая болезнь, белковое голодание, последствия применения некоторых медикаментов (ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента, противоэпилептических средств, нестероидных противовоспалительных препаратов) [7], отсутствовавшие у пациентки, что позволило отвергнуть вторичную форму агаммаглобулинемии. Все типы агаммаглобулинемии, кроме общей вариабельной иммунологической недостаточности, были исключены. В результате дифференциального диагноза был выставлен пациентке диагноз: «Первичное иммунодефицитное состояние: агаммаглобулинемия по типу общей вариабельной иммунной недостаточности. Спленомегалия. Дефицит массы тела. Беременность 4 недели».

ТАБЛИЦА 4. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У ПАЦИЕНТКИ К.

TABLE 4. IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN PATIENT K.

Показатель Indicator	Референсные значения ( $Q_{0,10}$ - $Q_{0,90}$ ) Reference values ( $Q_{0,10}$ - $Q_{0,90}$ )	Дата исследования Study dates							
		1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*
IgA, г/л IgA, g/l	0,7-2,1	0,05	0,05	0,29	0,28	0,05	1,36	0,46	0,05
IgG, г/л IgG, g/l	7,0-16,0	1,06	1,1	4,8	2,9	1,3	4,89	3,94	4,3
IgM, г/л IgM, g/l	0,4-1,3	1,05	1,05	0,72	0,9	0,92	1,89	1,11	0,76
Т-клетки T cells (CD3 <sup>+</sup> ), %	52-72	62	71	55	68	64	58	58	54
В-клетки B cells (CD20 <sup>+</sup> ), %	5-23	13	11	15	11	14	11	9	13

Примечание. Звездочками отмечены даты последовательных исследований, проведенных на фоне заместительной терапии внутривенными иммуноглобулинами (ВВИГ), накануне очередного введения ВВИГ: 1\* – 19.10.2006, 2\* – 08.11.2006, 3\* – 03.03.2007 (беременность 17 недель), 4\* – 12.09.2007 (после родов), 5\* – 11.03.2009, 6\* – 27.09.2011 (беременность 5-6 недель), 7\* – 14.11.2013 (беременность 5-6 недель), 8\* – 13.08.2020.

Note. Asterisks indicate the dates of consecutive studies carried out against the background of replacement therapy with intravenous immunoglobulins (IVIg), on the eve of the next IVIg administration: 1\*, 19.10.2006; 2\*, 08.11.2006; 3\*, 03.03.2007 (pregnancy 17 weeks); 4\*, 12.09.2007 (after childbirth); 5\*, 11.03.2009; 6\*, 27.09.2011 (pregnancy 5-6 weeks); 7\*, 14.11.2013 (pregnancy 5-6 weeks); 8\*, 13.08.2020.

Пациентке были даны рекомендации по пожизненной заместительной терапии ВВИГ. На первом этапе был назначен Габриглобин в режиме насыщения по 5 г внутривенно капельно на физиологическом растворе хлорида натрия через день трижды. Рекомендовано через 3 недели провести контрольное иммунологическое исследование для решения вопроса о дозе назначения иммуноглобулина в режиме поддерживающей терапии. Проведенный в составе главных специалистов-экспертов Минздрава Чувашии терапевтический консилиум разрешил пролонгацию беременности. На протяжении всей беременности и в период грудного вскармливания ребенка пациентка получала Габриглобин по 15 г ежемесячно. В течение последующих 4 лет пациентка К. продолжала наблюдаться иммунологом, состояние пациентки оставалось контролируемым, пациентка отказалась от заместительной терапии ВВИГ. В 2011 г. наступила 3-я беременность, которая на сроке 5 недель неожиданно осложнилась «замершим плодом». При детальном сборе анамнеза было обнаружено, что ухудшению состояния предшествовало осложненное течение кариеса, завершившееся экстракцией

коренного зуба. С 2011 г. самочувствие женщины оставалось удовлетворительным, ВВИГ не получала. В 2013 г. наступила 4-я беременность, в связи с чем пациентка самостоятельно возобновила заместительную терапию ВВИГ. На фоне ежемесячного введения Габриглобина в режиме поддерживающей терапии родила второго здорового доношенного ребенка. В последние 3 года заместительную терапию не получала, участились респираторные заболевания до 3-4 раз в год. Состояние ухудшилось 1 ноября 2018 г., когда возникли боли и отечность в правой половине лица, повышение температуры, снижение слуха на правое ухо. Обратилась к оториноларингологу, лечилась амбулаторно без эффекта, в связи с чем была госпитализирована для стационарного лечения в оториноларингологическое отделение с диагнозом «обострение хронического гнойного среднего отита справа». Выписалась с улучшением, но сохранялась заложенность в правом ухе при глотании, шум в ухе, временами стреляющие боли, головные боли. В феврале 2019 г. госпитализирована повторно в связи с затяжным течением хронического воспалительного процесса для проведения заместительной иммунотерапии.

После проведенного лечения состояние улучшилось: прошли заложенность и боли в правом ухе, головные боли. При выписке даны рекомендации: регулярная пожизненная заместительная терапия ВВИГ каждые 3-4 недели в режиме поддерживающей терапии в дозе 0,4 г на 1 кг массы тела (при массе пациентки 50 кг показано введение 400 мл 5% ВВИГ). При перерывах в лечении более 2 месяцев, а также во время или после тяжелых эпизодов обострения инфекционного синдрома предписано возобновление терапии в режиме насыщения в дозе 1-1,5 г/кг. В качестве целевого уровня иммуноглобулинов при проведении заместительной терапии обозначено достижение концентрации основного класса иммуноглобулинов – IgG уровня 7 г/л.

Особенностью описанного случая является то, что к моменту выставления диагноза ОВИН отсутствовали клинические проявления иммунодефицита, и пациентка считала себя практически здоровой. К диагнозу привело обнаружение лабораторных признаков нарушения формирования поствакцинального иммунитета к краснухе. В сыворотке крови пациентки обнаруживались из специфических антител к краснухе лишь IgM при полном отсутствии IgG, что можно объяснить сохранением у пациентки продукции антител класса IgM на фоне нарушения продукции других классов антител – IgG и IgA. Подтверждением тому является то, что уровень IgM в сыворотке крови больной находился в пределах референсных значений, составляя 1,05 г/л перед постановкой диагноза ОВИН, когда еще не проводилась заместительная терапия иммуноглобулинами. При этом содержание IgG колебалось на уровнях 1,06-1,0 г/л, что в 7 раз меньше значения нижнего порога референсных значений, а уровень IgA был в 14 раз меньше нижнего порога референсных значений, составляя лишь 0,05 г/л. Похоже, что нарушение переключения синтеза антител с класса IgM на IgG у пациентки обусловило отсутствие специфических IgG в сыворотке крови. Благодаря результатам иммунологических исследований и консультации врача-иммунолога был выставлен диагноз ОВИН и сохранена пациентке вторая беременность. Представляя данный клинический случай, авторы преследовали цель – обратить внимание практикующих врачей на возможность нарушения поствакцинального иммунитета у пациентов с ПИДЗ, что может привести к ложной трактовке показателей серологических маркеров инфекций и ошибкам в тактике ведения таких пациентов.

ПИДЗ, являясь редко встречающимися заболеваниями, доставляют массу проблем врачам

разных специальностей. Широкое варьирование клинических проявлений данных заболеваний, недостаточная осведомленность врачей разных специальностей о критериях их диагностики обуславливают отсроченную диагностику заболеваний. Несвоевременное назначение иммунотерапии и/или нерегулярное ее применение вызывают развитие необратимых повреждений органов, осложнений и высокую смертность. Особого внимания заслуживают больные ПИДЗ в гестационном периоде. Наличие ПИДЗ у беременных требует привлечения иммунолога к трактовке серологических маркеров ТОРЧ-инфекций и к корректировкам в ведении пациенток.

Итак, анализ данных Республиканского регистра ПИДЗ в Чувашии показывает, что в последнее десятилетие улучшилась диагностика данных заболеваний: снизились показатели задержки выставления диагноза заболевания и возраста пациентов на момент постановки диагноза. 46,6% больных получают регулярно заместительную терапию ВВИГ. Требуются дальнейшие исследования для оценки реальной распространенности различных форм ПИДЗ, в первую очередь, селективного дефицита IgA с клиническими проявлениями, показатель заболеваемости которого в Чувашии имеет выраженное отличие от российских и мировых показателей.

Преобладание взрослых пациентов среди больных ПИДЗ в регионе может свидетельствовать о высоком уровне их выявляемости благодаря хорошей осведомленности врачей взрослой сети о данных заболеваниях. Немаловажное значение имеет учет пациентов с ПИДЗ, начатый еще в 1993 г. на кафедре внутренних болезней с курсом клинической иммунологии Чувашского государственного университета им. И.Н. Ульянова, а также неоднократная демонстрация больных ОВИН на заседаниях и клинических разборах научных обществ врачей (терапевтов, оториноларингологов, пульмонологов, аллергологов-иммунологов, гематологов).

## Благодарности

Авторы выражают благодарность студентам медицинского факультета ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова»: Мельниковой Марии Алексеевне, Шошориной Марии Сергеевне и Егорову Льву Валерьевичу за внесение базы данных пациентов Чувашии с различными формами ПИДЗ в таблицу Excel для проведения статистической обработки.

## Список литературы / References

1. Карзакова Л.М., Ванькина Н.Н., Борисова Л.В., Мучукова О.М., Андреева И.И. Изучение иммунного статуса населения, проживающего в промышленно насыщенной зоне Чувашии. В кн.: Артемьева Е.Г., Батраков С.Н., ред. Иммунодефицитные состояния в клинике внутренних болезней. Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, 1999. С. 38-41. [Karzakova L.M., Vankina N.N., Borisova L.V., Muchukova O.M., Andreeva I.I. Study of the immune status of the population living in the industrially saturated zone of Chuvashia. In: Immunodeficiency conditions in the clinic of internal diseases. Ed. Artemieva E.G., Batrakov S.N.]. Cheboksary: Chuvash University printing house, 1999, pp. 38-41.
2. Сизязкина Л.П., Андреева И.И. Создание регистра пациентов как эффективный инструмент диагностики первичных иммунодефицитов // Педиатрическая фармакология, 2013. Т. 10, № 5. С. 94-96. [Sizyakina L.P., Andreeva I.I. Register of patients as an effective method of diagnosing primary immunodeficiencies. *Pediatricheskaya farmakologiya = Pediatric Pharmacology*, 2013, Vol. 10, no. 5, pp. 94-96. (In Russ.)]
3. Тузанкина И.А., Каракина М.Л., Власова Е.В. Анализ клинических проявлений дебюта первичных иммунодефицитов у взрослых // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 4. С. 367-374. [Tuzankina I.A., Karakina M.L., Vlasova E.V. Analysis of initial clinical features of primary immunodeficiencies in adults. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 4, pp. 367-374. (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-2014-4-367-374.
4. Abolhassani H., Azizi G., Sharifi L., Yazdani R., Mohsenzadegan M., Delavari S., Sohani M., Shirmast P., Chavoshzadeh Z., Mahdavian S.A., Kalantari A., Tavakol M., Jabbari-Azad F., Ahanchian H., Momen T., Sherkat R., Sadeghi-Shabestari M., Aleyasin S., Esmailzadeh H., Al-Herz W., Bousfiha A.A., Condino-Neto A., Seppänen M., Sullivan K.E., Hammarström L., Modell V., Modell F., Quinn J., Orange J.S., Aghamohammadi A. Global systematic review of primary immunodeficiency registries. *Expert. Rev. Clin. Immunol.*, 2020, Vol. 16, no. 7, pp. 717-732.
5. Azizi G., Rezaei N., Kiaee F., Tavakolinia N., Yazdani R., Mirshafiey A., Aghamohammadi A. T-Cell abnormalities in common variable immunodeficiency. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 26, no. 4, pp. 233-243.
6. Bonilla F.A., Barlan I., Chapel H., Costa-Carvalho B.T., Cunningham-Rundles C., de la Morena M.T., Espinosa-Rosales F.J., Hammarström L., Nonoyama S., Quinti I., Routes J.M., Tang M.L., Warnatz K. International consensus document (ICON): common variable immunodeficiency disorders. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2016, Vol. 4, no. 1, pp. 38-59.
7. Chapel H. Common Variable Immunodeficiency Disorders (CVID) – diagnoses of exclusion, especially combined immune defects. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2016, Vol. 4, pp. 1158-1159.
8. Compeer E.B., Janssen W., van Royen-Kerkhof A., van Gijn M., van Montfrans J.M., Boes M. Dysfunctional BLK in common variable immunodeficiency perturbs B-cell proliferation and ability to elicit antigen-specific CD4<sup>+</sup> T-cell help. *Oncotarget*, 2015, Vol. 6, no. 13, pp. 10759-10771.
9. Conley M.E., Notarangelo L.D., Etzioni A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). *Clin. Immunol.*, 1999, Vol. 93, no. 3, pp. 190-197.
10. Litzman J., Bartonková D., Pikulová Z., Pazdírková A., Sevcíková I., Lokaj J. IgG subclasses and autoantibodies in adult patients with selective IgA deficiency. *Vnitr. Lek.*, 2000, Vol. 46, no. 3, pp.170-173. (In Czech)
11. McGowan K.E., Lyon M.E., Butzner J.D. Celiac disease and IgA deficiency: complications of serological testing approaches encountered in the clinic. *Clin. Chem.*, 2008, Vol. 54, pp. 1203-1209.
12. Odnoletkova I., Kindle G., Quinti I., Grimbacher B., Knerr V., Gathmann B., Ehl S., Mahlaoui N., van Wilder P., Bogaerts K., de Vries E.; Plasma Protein Therapeutics Association (PPTA) Taskforce. The burden of common variable immunodeficiency disorders: a retrospective analysis of the European Society for Immunodeficiency (ESID) registry data. *Orphanet J. Rare Dis.*, 2018, Vol. 13, no. 1, 201. doi: 10.1186/s13023-018-0941-0.
13. Plebani A., Mira E., Mevio E., Monafó V., Notarangelo L.D., Avanzini A., Ugazio, A.G. IgM and IgD concentrations in the serum and secretions of children with selective IgA deficiency. *Clin. Exp. Immunol.*, 1983, Vol. 53, no. 3, pp. 689-696.
14. Resnick E.S., Moshier E.L., Godbold J.H., Cunningham-Rundles C. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood*, 2012, Vol. 119, no. 7, pp. 1650-1657.
15. Schussler E., Beasley M.B., Maglione P.J. Lung disease in primary antibody deficiencies. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2016, Vol. 4, no. 6, pp.1039-1052.
16. Tangye S.G., Al-Herz W., Bousfiha A., Chatila T., Cunningham-Rundles C., Etzioni A., Franco J.L., Holland S.M., Klein C., Morio T., Ochs H.D., Oksenhendler E., Picard C., Puck J., Torgerson T.R., Casanova J.L., Sullivan K.E. Human inborn errors of immunity: 2019 update on the classification from the international union of immunological societies expert committee. *J. Clin. Immunol.*, 2020, Vol. 40, no. 1, pp. 24-64.
17. Urbonas V., Sadauskaitė J., Cerkauskienė R., Kaminskas A., Mäki M., Kurppa K. Population-based screening for selective immunoglobulin A (IgA) deficiency in lithuanian children using a rapid antibody-based fingertip test. *Med. Sci. Monit.*, 2016, Vol. 22, pp. 4773-4778.

18. Weber-Mzell D., Kotanko P., Hauer A.C., Goriup U., Haas J., Lanner N., Erwa W., Ahmaida I.A., Haitchi-Petnehazy S., Stenzel M., Lanzer G., Deutsch J. Gender, age and seasonal effects on IgA deficiency: a study of 7293 Caucasians. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2004, Vol. 34, no. 3, pp. 224-228.
19. Westh L., Mogensen T.H., Dalgaard L.S., Bernth Jensen J.M., Katzenstein T., Hansen A.E., Larsen O.D., Terpling S., Nielsen T.L., Larsen C.S. Identification and characterization of a nationwide danish adult common variable immunodeficiency cohort. *Scand. J. Immunol.*, 2017, Vol. 85, no. 6, pp. 450-461.
20. Yazdani R., Abolhassani H., Asgardoost M., Shaghaghi M., Modaresi M., Azizi G., Aghamohammadi A. Infectious and noninfectious pulmonary complications in patients with primary immunodeficiency disorders. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 27, no. 4, pp. 213-224.
21. Yel L. Selective IgA deficiency. *J. Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 30, pp. 10-16.
22. Yesillik S., Agrawal S., Gollapudi S.V., Gupta S. Phenotypic analysis of CD4<sup>+</sup> Treg, CD8<sup>+</sup> Treg, and Breg cells in adult common variable immunodeficiency patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2019, Vol. 180, no. 2, pp. 150-158.

---

**Авторы:**

**Карзакова Л.М.** — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой внутренних болезней с курсом клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Чувашская Республика, Россия

**Мучукова О.М.** — к.м.н., ассистент кафедры внутренних болезней с курсом клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова»; врач аллерголог-иммунолог поликлиники БУ «Республиканская клиническая больница» Министерства здравоохранения Чувашской Республики, г. Чебоксары, Чувашская Республика, Россия

**Луткова Т.С.** — к.м.н., доцент кафедры внутренних болезней с курсом клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Чувашская Республика, Россия

**Кудряшов С.И.** — к.м.н., доцент кафедры внутренних болезней с курсом клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Чувашская Республика, Россия

**Журавлева Н.В.** — к.м.н., доцент кафедры внутренних болезней с курсом клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Чувашская Республика, Россия

**Authors:**

**Karzakova L.M.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Internal Diseases with a Course of Clinical Immunology, I. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Chuvash Republic, Russian Federation

**Muchukova O.M.**, PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Internal Diseases with a Course of Clinical Immunology, I. Ulyanov Chuvash State University; Clinical Allergologist/Immunologist, Ambulance Department, Republican Clinical Hospital, Cheboksary, Chuvash Republic, Russian Federation

**Lutkova T.S.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Internal Diseases with a Course of Clinical Immunology, I. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Chuvash Republic, Russian Federation

**Kudryashov S.I.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Internal Diseases with a Course of Clinical Immunology, I. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Chuvash Republic, Russian Federation

**Zhuravleva N.V.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Internal Diseases with a Course of Clinical Immunology, I. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Chuvash Republic, Russian Federation

**Ухтерова Н.Д.** — к.м.н., доцент кафедры внутренних болезней с курсом клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Чувашская Республика, Россия

**Гаврилова Э.С.** — к.м.н., доцент кафедры внутренних болезней с курсом клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Чувашская Республика, Россия

**Сидоров И.А.** — д.м.н., врач отделения оториноларингологии и челюстно-лицевой хирургии БУ «Республиканская детская клиническая больница» Министерства здравоохранения Чувашской Республики, г. Чебоксары, Чувашская Республика, Россия

**Одинцова А.В.** — студентка ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Чувашская Республика, Россия

**Ukhterova N.D.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Internal Diseases with a Course of Clinical Immunology, I. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Chuvash Republic, Russian Federation

**Gavrilova E.S.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Internal Diseases with a Course of Clinical Immunology, I. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Chuvash Republic, Russian Federation

**Sidorov I.A.**, PhD, MD (Medicine), Clinician, Department of Otorhinolaryngology and Maxillofacial Surgery, Republican Pediatric Clinical Hospital, Cheboksary, Chuvash Republic, Russian Federation

**Odintsova A.V.**, Student, I. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Chuvash Republic, Russian Federation

---

Поступила 03.11.2020  
Принята к печати 10.01.2021

Received 03.11.2020  
Accepted 10.01.2021

## ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *HLA-G*, ВНУТРИМАТОЧНОЙ ИНФЕКЦИИ И НЕВЫНАШИВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ У ЖЕНЩИН

Гордеева Л.А.<sup>1</sup>, Воронина Е.Н.<sup>2</sup>, Поленок Е.Г.<sup>1</sup>, Мун С.А.<sup>1</sup>,  
Нерсесян С.Л.<sup>3</sup>, Оленникова Р.В.<sup>3</sup>, Филипенко М.Л.<sup>2</sup>, Глушков А.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук (Институт экологии человека СО РАН), г. Кемерово, Россия

<sup>2</sup> ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> ГАУЗ «Кемеровская областная клиническая больница», г. Кемерово, Россия

**Резюме.** Изучали связь полиморфизма гена *HLA-G* (rs41551813, rs12722477 и rs41557518), внутриматочной инфекции и невынашивания беременности у женщин. Исследуемую группу (НБ) составили 180 женщин с невынашиванием беременности, определяемой как два и более повторяющихся самопроизвольных выкидыша (min = 2; max = 8) до 20 недель беременности. На момент обследования женщины были не беременными и наблюдались в медико-генетической консультации г. Кемерово. Каждая женщина прошла гинекологическое обследование. Из исследования были исключены женщины с медицинскими абортами, родами и внематочными беременностями, с сахарным диабетом. Для исключения других известных причин самопроизвольного выкидыша были проведены ультразвуковое исследование органов малого таза и кариотипирование женщины и мужчины. Средний возраст женщин составил 29,6±4,8 (SD) лет. Группа сравнения (контроль) включала 408 здоровых и фертильных женщин. Критериями включения в исследование для них были роды 1-2 здоровых детей. Средний возраст женщин составил 26,8±5,2 (SD) лет. Влияние инфекционного фактора анализировали на основании лабораторных тестов: микроскопического исследования (для выявления бактериального вагиноза и вульво-вагинального кандидоза); иммуноферментного анализа и полимеразно-цепной реакции (для выявления генитального герпеса, цитомегаловируса, вируса папилломы человека типа 16/18; *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* и *Gardnerella vaginalis*; и *Trichomonas vaginalis*. Данные были получены из медицинских карт обследуемых женщин. Все женщины дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Типирование полиморфизма Thr31Ser (rs41551813, *HLA-G\*01:03*) в экзоне 2, Leu110Ile (rs12722477, *HLA-G\*01:04*) и 1597 delC (rs41557518, *HLA-G\*01:05N*) в экзоне 3 гена *HLA-G* проводили методом асимметричной ПЦР в режиме реального времени. Как показало исследование, у обследуемых женщин внутриматочная инфекция не являлась самостоятельно значимым фактором риска НБ (p = 0,30). Обнаружено, что аллель 110 Ile (*HLA-G\*01:04*) являлся фактором риска НБ как у женщин с внутриматочной ин-

### Адрес для переписки:

Гордеева Людмила Александровна  
Федеральный исследовательский центр угля и углехимии  
Сибирского отделения Российской академии наук  
(Институт экологии человека СО РАН)  
650065, Россия, г. Кемерово, Ленинградский пр., 10.  
Тел.: 8 (913) 322-78-99.  
E-mail: gorsib@rambler.ru, ihe@kemtrel.ru

### Address for correspondence:

Gordeeva Ludmila A.  
Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian  
Branch, Russian Academy of Sciences (Institute of Human  
Ecology, SB RAS)  
650065, Russian Federation, Kemerovo,  
Leningradsky ave., 10.  
Phone: 7 (913) 322-78-99.  
E-mail: gorsib@rambler.ru, ihe@kemtrel.ru

### Образец цитирования:

Л.А. Гордеева, Е.Н. Воронина, Е.Г. Поленок, С.А. Мун,  
С.Л. Нерсесян, Р.В. Оленникова, М.Л. Филипенко,  
А.Н. Глушков «Изучение связи полиморфизма гена  
*HLA-G*, внутриматочной инфекции и невынашивания  
беременности у женщин» // Медицинская иммунология,  
2021. Т. 23, № 2. С. 369-380.  
doi: 10.15789/1563-0625-SOR-2155

© Гордеева Л.А. и соавт., 2021

### For citation:

L.A. Gordeeva, E.N. Voronina, E.G. Polenok, S.A. Mun,  
E.A. Sokolova, S.L. Nersesyan, R.V. Olennikova,  
M.L. Filipenko, A.N. Glushkov "Study of relationships  
between *HLA-G* gene polymorphism, intrauterine infection  
and recurrent miscarriage in women", *Medical Immunology  
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2021, Vol. 23, no. 2,  
pp. 369-380. doi: 10.15789/1563-0625-SOR-2155

DOI: 10.15789/1563-0625-SOR-2155

фекцией ( $OR_a = 4,50 [2,41-8,38]$ ,  $p = 2,09e-06$ ), так и у женщин без инфекции ( $OR_a = 2,46 [1,44-4,21]$ ,  $p = 0,0009$ ). Выявлено совместное влияние генетического и инфекционного факторов с риском НБ у женщин ( $OR_{a+f} = 3,50 [2,01-6,09]$ ,  $p = 8,78e-06$ ). Наши результаты могут быть полезны в понимании молекулярных механизмов иммунных нарушений в системе мать-плод и при выборе тактики ведения и лечения женщин с НБ.

*Ключевые слова: генетический полиморфизм, HLA-G, невынашивание беременности*

## STUDY OF RELATIONSHIPS BETWEEN *HLA-G* GENE POLYMORPHISM, INTRAUTERINE INFECTION AND RECURRENT MISCARRIAGE IN WOMEN

Gordeeva L.A.<sup>a</sup>, Voronina E.N.<sup>b</sup>, Polenok E.G.<sup>a</sup>, Mun S.A.<sup>a</sup>, Sokolova E.A.<sup>b</sup>, Nersesyan S.L.<sup>c</sup>, Olennikova R.V.<sup>c</sup>, Filipenko M.L.<sup>b</sup>, Glushkov A.N.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences (Institute of Human Ecology, SB RAS), Kemerovo, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>c</sup> Kemerovo Regional Clinical Hospital, Kemerovo, Russian Federation

**Abstract.** The relationship between the *HLA-G* gene polymorphism (rs41551813, rs12722477, rs41557518), intrauterine infection and recurrent miscarriage (RM) in women were studied. The case group consisted of 180 patients with RM, defined as two or more consecutive miscarriages (min = 2; max = 8) at up to 20 weeks of gestation, and with clinically confirmed pregnancies and non-viable fetuses. At the time of examination, the women were enrolled from the Genetic Counseling Center at the Kemerovo Regional Clinical Hospital, Kemerovo, Russia, and were not pregnant. Each patient underwent a gynecological examination. We excluded women with a history of medical abortion, birth, and ectopic pregnancies. In addition, we excluded women with endocrine (e.g. diabetes) disorders. To exclude other known causes of spontaneous abortion, the following tests were performed: ultrasound examination of pelvic organs, and karyotyping in women and men. The women's mean age in the RM group, was  $29.6 \pm 4.8$  (SD) years. The control group comprised 408 fertile women. These women didn't have a history of spontaneous abortion, or a family history of congenital malformations. They have born, at least, 1-2 healthy children. Women's mean age at birth of last child was  $26.8 \pm 5.2$  (SD) years. Influence of the intrauterine infection was analyzed on the basis of laboratory tests. Diagnostics of bacterial vaginosis and vulvo-vaginal candidiasis by microscopic examination was conducted. Viral agent infections (herpes simplex virus type 2, cytomegalovirus, human papilloma virus type 16/18), *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Gardnerella vaginalis* and *Trichomonas vaginalis* were detected by enzyme-linked immunoassay and polymerase chain reaction (PCR). The data were obtained from the medical cards of the surveyed women. All the women gave a written informed consent before participating in the study. Typing of polymorphisms of Thr31Ser (rs41551813, *HLA-G\*01:03*) in exon 2, Leu110Ile (rs12722477, *HLA-G\*01:04*) and 1597 delC (rs41557518, *HLA-G\*01:05N*) in exon 3 *HLA-G* genes were performed by real-time PCR followed by melting analysis. The study showed that the intrauterine infection was not a risk factor for RM ( $p = 0.30$ ) in the examined women. It was found that the 110 Ile allele (*HLA-G\*01:04*) was a risk factor for RM both in women with intrauterine infection [ $OR_a = 4.50 (2.41-8.38)$ ,  $p = 2.09e-06$ ], and in women without infection [ $OR_a = 2.46 (1.44-4.21)$ ,  $p = 0.0009$ ]. The cooperative influence of genetic and infections factors with the risk of RM in women was revealed [ $OR_{a+f} = 3.50 (2.01-6.09)$ ,  $p = 8.78e-06$ ]. Our results will be useful in understanding the molecular mechanisms of immune disorders in fetomaternal interface, and for choosing the strategy of management and treatment in women with RM.

*Keywords: genetic polymorphism, HLA-G, recurrent miscarriage*

## Введение

Беременность является серьезным испытанием для материнской иммунной системы. Ее успех зависит от включения сложных регуляторных механизмов, позволяющих полуаллогенному плоду расти и развиваться, несмотря на тесный контакт с материнскими иммунокомпетентными клетками [4]. Феномен уклонения плода от материнского иммунного надзора получил название иммунотолерантности и связан с продукцией уникального набора антигенов (АГ) Главного комплекса гистосовместимости человека – G (HLA-G) [9].

HLA-G принадлежит к неклассическим молекулам семейства HLA I класса. Уникальность их функций во время беременности заключается в обеспечении иммунотолерантности и поддержки защиты плода от патогенов [19, 37]. Хотя HLA-G представляют ограниченный, но разный набор пептидов, они могут регулировать функции иммунных клеток через прямое взаимодействие с клеточными рецепторами [26]. Как выяснилось, HLA-G связываются с рецепторами ILT2 и ILT4 (IgG-подобный транскрипт семейства рецепторов LILR-leukocyte Ig-like receptor) и KIR2DL4 (IgG-подобный рецептор киллерных клеток) на NK-клетках (ILT2 и KIR2DL4), CD4<sup>+</sup> (ILT2) и CD8<sup>+</sup> (ILT2) Т-клетках, В-клетках (ILT2), моноцитах/макрофагах и дендритных клетках (ILT2 и ILT4) [11, 19]. Они не активируют NK-клетки и CD8<sup>+</sup>Т-клетки, а напротив, ингибируют цитотоксичность и опосредуют апоптоз этих клеток, индуцируют развитие АГ презентующих клеток (АПК), дендритных клеток и различных типов регуляторных Т-клеток, тем самым способствуя иммуносупрессии [26]. При осложнениях беременности, связанных с нарушением иммуносупрессии, наблюдается низкая продукция молекул HLA-G [25]. Помимо беременности установлена связь молекул HLA-G с хроническими вирусными и паразитарными инфекциями, а также раком [23].

У человека обнаружено семь изоформ белка HLA-G. Четыре из них связаны с клеточной мембраной (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 и HLA-G4), а три являются растворимыми (sHLA-G: HLA-G5, HLA-G6 и HLA-G7) и образуются в результате альтернативного сплайсинга первичных транскриптов [6]. Особенности продукции молекул HLA-G, их взаимодействия с клеточными рецепторами и модуляции иммунного ответа контролируются полиморфизмом гена *HLA-G* [33].

По сравнению с классическими генами *HLA* I класса ген *HLA-G* слабо полиморфен, полиморфные изменения затрагивают как кодирующие, так и не кодирующие регионы гена. Полиморфизм в кодирующем регионе гена связан

с изменениями в аминокислотной последовательности белка. Установлены основные группы аллелей – *HLA-G\*01:01:xx*, *HLA-G\*01:02*, *HLA-G\*01:03:xx*, *HLA-G\*01:04:xx*, *HLA-G\*01:05N* (нулевой аллель), *HLA-G\*01:06* и *HLA-G\*01:07* – *HLA-G\*01:18*, выявляемые у людей в разных популяциях [33]. Обнаружена связь аллелей *HLA-G* и биологических функций молекул HLA-G, таких как связывание с пептидами и образование изоформ белка и его количества [11, 23]. Как показали исследования, уровень экспрессии гена и стабильность мРНК регулируется полиморфизмом в некодирующем регионе гена *HLA-G* – промоторной области (5'URR) и 3'-нетранслируемой области (3'UTR). Нуклеотидная последовательность 3'UTR-области отличается вариативностью. У людей выявлено более 40 гаплотипов 3'UTR, из которых только семь (с UTR1 по UTR7) стабильно представлены у разных этносов и составляют ~90% от всех известных гаплотипов. Обнаружены ассоциации UTR-гаплотипов с поверхностной экспрессией HLA-G и продукцией sHLA-G в плазме/сыворотке крови у людей [7, 19].

Полиморфизм гена *HLA-G* неоднократно изучался у женщин с разными осложнениями беременности, в том числе с невынашиванием беременности (НБ) [7]. Однако результаты исследований весьма противоречивы в разных популяциях людей. Остается неизвестной связь полиморфизма гена *HLA-G* с чувствительностью к внутриматочной инфекции, которая может выступать триггером для повторных выкидышей во время беременности. Поэтому целью настоящего исследования стало изучение связи полиморфизма гена *HLA-G*, внутриматочной инфекции и невынашивания беременности у женщин.

## Материалы и методы

Выборки. Основную группу (НБ) составили 180 женщин, обратившиеся в Медико-генетическую консультацию г. Кемерово в связи с невынашиванием беременности. На момент обследования 159 (88%) женщин были не беременными и находились на реабилитации после очередного выкидыша. 21 (12%) женщина была беременной, настоящая беременность тоже протекала с угрозой прерывания. Каждая женщина прошла гинекологическое обследование. Условиями отбора женщин в основную группу были: отсутствие в анамнезе медицинских аборт и внематочных беременностей; подряд два и более самопроизвольных выкидыша; отсутствие аутоиммунных заболеваний; отсутствие репродуктивных проблем у мужчины. Для исключения других известных причин самопроизвольного выкидыша были проведены ультразвуковое исследование органов малого таза и кариотипирование женщины и

мужчины. Характеристика обследуемых женщин представлена в таблице 1.

Группу сравнения (контроль) составили 408 женщин без НБ и врожденных пороков развития (ВПР) у плода/ребенка. Из них 264 (65%)

женщины были беременными (15-36 нед.) и уже имели 1-2 детей, 144 (35%) женщины – роженицы доношенных и недоношенных I степени детей (родились в сроки 35-40 недель с массой тела больше 2000 г). Отсутствие ВПР у плода во время

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУПП

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF THE STUDIED GROUPS

Параметр Parameter	Группа Group	
	НБ RM (n = 180)	Контроль Control (n = 408)
<b>возраст</b> age <b>m±SD</b> <b>min-max</b>	29,6±4,8 19-43	26,8±5,2 16-45
<b>кол-во выкидышей</b> number of miscarriages: <b>m; min-max</b> <b>2 выкидыша / 2 miscarriage</b> <b>3 и более выкидышей / 3 and more miscarriages</b>	2,4 (2,0-8,0) 132 48	–
<b>выкидыши</b> miscarriages <b>до 12 недель / up to 12 weeks</b> <b>после 12 недель / after 12 weeks</b> <b>до и после 12 недель / before and after 12 weeks</b>	107 10 63	–
<b>хронические заболевания</b> chronic diseases <b>есть / yes</b> <b>нет / no</b> <b>неизвестно / unknown</b>	77 69 34	131 208 69
<b>осложненный акушерско-гинекологический анамнез</b> complicated obstetric and gynecological history <b>отслойка плаценты / placental abruption</b> <b>клинические признаки угрозы прерывания беременности / clinical signs of threatened abortion</b> <b>синдром задержки развития плода / fetal growth retardation syndrome</b> <b>фетоплацентарная недостаточность / fetoplacental insufficiency</b> <b>хронический эндометрит / chronic endometritis</b> <b>хроническое воспаление придатков матки / chronic inflammation of the uterine appendages</b> <b>нет / no</b>	157 81 124 8 47 66 11 23	157 – 11 – 100 32 14 251
<b>инфекционный фактор</b> infectious factor <b>вирусы / viruses</b> <b>бактерии / bacterium</b> <b>простейшие / protozoa</b> <b>смешанного генеза (бактерии + вирусы + простейшие) / mixed genesis (bacteria + viruses + protozoa)</b> <b>сопутствующий бактериальный вагиноз / concomitant bacterial vaginitis</b> <b>нет / no</b>	87 29 39 – 19 17 93	177 15 144 3 5 129 231
<b>курение / smoking</b> <b>есть / yes</b> <b>нет / no</b> <b>неизвестно / unknown</b>	14 132 34	37 220 151

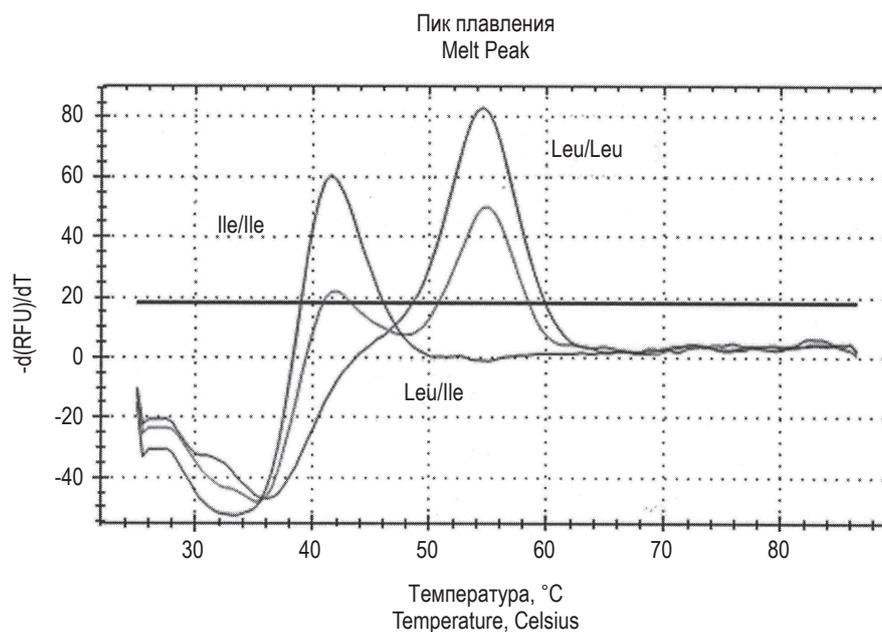


Рисунок 1. Кривые плавления продуктов амплификации rs12722477 полиморфизма гена HLA-G  
Figure 1. Melting curves of the amplification products of rs12722477 polymorphism of HLA-G gene

беременности подтверждалось ультразвуковым исследованием, а при рождении ребенка – врачами-неонатологами.

Влияние инфекционного фактора анализировали на основании лабораторных тестов: микроскопическое исследование (для выявления бактериального вагиноза и вульво-вагинального кандидоза); иммуноферментного анализа и полимеразно-цепной реакции (для выявления генитального герпеса, цитомегаловируса, вируса папилломы человека (ВПЧ) типа 16/18; *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* и *Gardnerella vaginalis*; и *Trichomonas vaginalis*. Данные были получены из медицинских карт обследуемых женщин.

Все женщины принадлежали к русской этнической группе. Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с требованиями 9 Федерального закона от 27.07.06 г. «О персональных данных» №152-53. Получено письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Генотипирование. Образцы ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови с помощью метода фенол-хлороформной экстракции с последующим осаждением этанолом, образцы ДНК хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Типирование однонуклеотидных замен (SNP) Thr31Ser (rs41551813) в экзоне 2, Leu110Ile (rs12722477) и 1597 delC (rs41557518) в экзоне 3 гена HLA-G проводили методом асимметричной

ПЦР с использованием флуоресцентно-меченого олигонуклеотидного зонда с последующим плавлением амплификационных продуктов и анализа кривых плавления в режиме реального времени (рис. 1).

Реакцию амплификации проводили в следующих условиях: начальная денатурация ( $96^{\circ}\text{C} - 3$  мин); затем 54 цикла, включающих денатурацию при  $96^{\circ}\text{C} - 6$  с, отжиг праймеров при  $62^{\circ}\text{C} - 6$  с и последующую элонгацию при  $72^{\circ}\text{C} - 6$  с; регистрировали кривые плавления в диапазоне температур  $30-70^{\circ}\text{C}$ , повышая температуру на  $0,5^{\circ}\text{C}$  в каждом цикле от начальной температуры, каждый шаг сопровождался регистрацией флуоресцентного сигнала в диапазоне, соответствующему интервалу флуорофора. Общий объем реакционной смеси составил 20 мкл: 10 mM Трис-НСl (рН 8,9), 55 mM КСl; 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,01% Tween 20, 0,2 mM dNTP, 20-100 ng ДНК, 1 ед. акт. KlenTaq-ДНК-полимеразы, растворы олигонуклеотидных праймеров и зондов в следующих концентрациях: лимитирующий праймер – 0,1 mM, избыточный праймер – 1 mM и зонд – 0,1 mM (табл. 2).

#### Статистическая обработка данных

Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью пакета статистических программ Statistica for Windows v.8.0, (StatSoft, Inc.) и GenABEL, Genetics программного обеспечения R-project (www.r-project.org). Соответствие частот генотипов гена HLA-G рав-

ТАБЛИЦА 2. ПРАЙМЕРЫ И ЗОНДЫ ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ИССЛЕДОВАНИИ

TABLE 2. SEQUENCE OF PRIMERS AND PROBES USED IN THE STUDY

Полиморфизм Polymorphism	Праймеры Primers	Последовательность праймеров Sequence of primers	Последовательность зонда Sequence of probe
<b>Thr31Ser</b> (rs41551813)	прямой direct	5'-GAGCCCCGCTTCATCGTCA-3'	5'-Fam-TGGACGACACGCAGTTC-BHQ-3'
	обратный reverse	5'-CACGCCGAGTCGCTGTC-3'	
<b>Leu110Ile</b> (rs12722477)	прямой direct	5'- CAGTGGATGATTGGCTGCGA -3'	5'-R6G-CGACGGACGCCTCCTCC-BHQ2-3'
	обратный reverse	5'- CGAGGTAATCCTTGCCATCGT -3'	
<b>1597 delC</b> (rs41557518)	прямой direct	5'-TGAACAGTATGCCTCCGATGG-3'	5'-Rox-AACGAGGACCTGCGCTC-BHQ2-3'
	обратный reverse	5'-CGAGGTAATCCTTGCCATCGT-3'	

новесию Харди–Вайнберга (HWE) оценивали с помощью критерия  $\chi^2$  Пирсона. В этом случае и при использовании других критериев нулевую гипотезу отвергали при  $p \leq 0,05$ .

Силу ассоциации вариантов гена *HLA-G* с самопроизвольными выкидышами – отношение шансов (odds ratio, OR) и его доверительный интервал (CI: 95%) оценивали с помощью логистического регрессионного анализа (функция “glm” программы R). В качестве базовой модели исследовали аддитивную модель наследования признака.

## Результаты

Изучение связи инфекции и НБ у женщин показало, что у обследуемых нами женщин внутриматочная инфекция не являлась самостоятельно значимым фактором риска НБ. Сопоставление частоты случаев внутриматочной инфекции у женщин с НБ и в контроле не выявило статистически значимых отличий между ними (87/93 против 177/231 соответственно;  $\chi^2 = 1,04$ ,  $d(f) = 1$ ;  $p = 0,30$ , табл. 1).

Далее изучали связь генетического фактора с НБ у женщин. Распределение частот генотипов SNP rs41551813, rs12722477 и rs41557518 гена

ТАБЛИЦА 3. ЧАСТОТА ГЕНОТИПОВ ГЕНА *HLA-G* В ИЗУЧАЕМЫХ ГРУППАХ

TABLE 3. FREQUENCY OF *HLA-G* GENOTYPES IN THE STUDY GROUPS

Полиморфизм <i>HLA-G</i> Polymorphism <i>HLA-G</i>	Генотипы/аллели Genotypes/alleles	НБ RM N (f)	Контроль Control N (f)	$\chi^2$ ; d(f); p
<b>Thr31Ser</b> rs41551813	Thr/Thr	171 (0,950)	389 (0,953)	0,53; 1; 0,76
	Thr/Ser	9 (0,050)	19 (0,047)	
	Ser/Ser	–	–	
	MAF (Ser, *01:03)	9 (0,025)	19 (0,023)	
<b>Leu110Ile</b> rs12722477	Leu/Leu	120 (0,667)	355 (0,870)	35,07; 2; < 0,001
	Leu/Ile	56 (0,311)	52 (0,127)	
	Ile/Ile	4 (0,022)	1 (0,003)	
	MAF (Ile, *01:04)	64 (0,178)	54 (0,066)	
<b>1597 delC</b> rs41557518	C/C	169 (0,939)	395 (0,968)	2,03; 1; 0,11
	C/delC	11 (0,061)	13 (0,032)	
	delC/delC	–	–	
	MAF (delC, *01:05N)	11 (0,031)	13 (0,016)	

Примечание. n – количество наблюдений; f – частота встречаемости генотипа/аллеля; MAF – частота встречаемости минорного аллеля.

Note. n, number of observations; f, frequency of genotypes/alleles; MAF, minor allele frequency.

HLA-G у женщин с НБ и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди–Вайнберга ( $p > 0,05$ , данные не показаны).

Сопоставление частот генотипов изучаемых SNP гена HLA-G у женщин с НБ и в контроле показало их значимые отличия только для SNP rs12722477 гена HLA-G ( $\chi^2 = 35,07$ ,  $d(f) = 2$ ;  $p < 0,001$ ). Для SNP rs41551813 и rs41557518 частоты генотипов были сопоставимыми. Данные представлены в таблице 3.

Далее мы предположили, что SNP rs12722477 HLA-G может не только отдельно, но и в сочетании с инфекцией оказывать влияние на риск НБ у женщин. Поэтому далее изучали связь между SNP rs12722477 гена HLA-G и риском НБ с учетом инфекционного фактора (табл. 4). Для того чтобы подтвердить или отвергнуть нашу идею, был использован подход, предложенный В.А. Вавилиным с соавторами (2000) [2].

Так, OR, рассчитанное сопоставлением частот аллелей HLA-G у женщин с персистентной инфекцией в группах НБ и контроль, или, наоборот, рассчитанное только для женщин с отсутствием инфекции в этих группах, показывает влияние аллеля ( $OR_a$ ) на риск НБ, но в разных условиях среды. OR, рассчитанное путем сопоставления частот вариантов HLA-G у

женщин с инфекцией в группе НБ и у женщин контрольной группы без инфекции, учитывает взаимодействие генетического и инфекционного факторов ( $OR_{a+I}$ ). Если влияние этих факторов однонаправлено, то величина  $OR_{a+I}$  будет выше, чем  $OR_a$  для женщин без инфекции. Если же влияние этих факторов разнонаправлено, то величина  $OR_{a+I}$  будет ниже [2].

Обнаружена ассоциация аллеля 110Ile (HLA-G\*01:04) с риском НБ как у женщин с внутриматочной инфекцией ( $OR_a = 4,50$  [2,41-8,38],  $p = 2,09e-06$ ), так и у женщин без инфекции ( $OR_a = 2,46$  [1,44-4,21],  $p = 0,0009$ ). Также обнаружена связь двух факторов с риском НБ у женщин ( $OR_{a+I} = 3,50$  [2,01-6,09],  $p = 8,78e-06$ ). Полученные нами результаты демонстрируют, что аллель 110Ile (HLA-G\*01:04) оказывает значимое влияние на риск НБ, в том числе и на НБ, ассоциированное с инфекцией.

## Обсуждение

В настоящей работе мы изучали связь трех полиморфизмов rs41551813 (Thr31Ser, аллель HLA-G\*01:03), rs12722477 (Leu110Ile, аллель HLA-G\*01:04) и rs41557518 (1597 delC, аллель HLA-G\*01:05N) в кодирующей части гена HLA-G с риском НБ у женщин. Их продукты отличаются

ТАБЛИЦА 4. АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМА RS12722477 HLA-G И ИНФЕКЦИИ С РИСКОМ НЕВЫНАШИВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ (АДДИТИВНАЯ МОДЕЛЬ НАСЛЕДОВАНИЯ)

TABLE 4. ASSOCIATIONS OF THE HLA-G RS12722477 POLYMORPHISM WITH RISK OF RECURRENT MISCARRIAGES (ADDITIVE MODEL OF INHERITANCE, MINOR ALLELE VS COMMON ALLELE)

Leu110Ile rs12722477	Наличие инфекции (+) Presence of infection (+)		Отсутствие инфекции (-) No infection		$OR_{a(+)}$ (CI: 95%), p	$OR_{a(-)}$ (CI: 95%), p	$OR_{a(+)}$ (CI: 95%), p
	НБ RM n = 87	Контроль Control n = 177	НБ RM n = 93	Контроль Control n = 231			
Leu/Leu	54 (0,621)	156 (0,881)	66 (0,710)	199 (0,862)	4,50 (2,41-8,38), 2,09e-06	2,46 (1,44-4,21), 0,0009	3,50 (2,01-6,09), 8,78e-06
Leu/Ile	32 (0,368)	21 (0,119)	24 (0,258)	31 (0,134)			
Ile/Ile	1 (0,011)	–	3 (0,032)	1 (0,004)			
MAF (Ile)	34 (0,195)	21 (0,059)	30 (0,161)	33 (0,071)			

ТАБЛИЦА 5. СРАВНЕНИЕ ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ АЛЛЕЛЕЙ HLA-G У ЛЮДЕЙ ДВУХ РЕГИОНОВ РОССИИ

TABLE 5. COMPARISON OF THE FREQUENCY OF HLA-G ALLELES IN PEOPLE IN TWO REGIONS OF RUSSIA

Аллель Allele	Западно-Сибирский регион West Siberian region (n = 408)	Северо-Западный регион [1] Northwest region [1] (n = 118)	p
HLA-G*01:01	87,9%	86,5%	0,68
HLA-G*01:03	2,3%	2,0%	0,83
HLA-G*01:04	6,6%	8,5%	0,48
HLA-G*01:05N	1,6%	2,9%	0,36

по аминокислотному составу и имеют лишь небольшое сходство в аминокислотной последовательности репертуара предоставляемых пептидов иммунокомпетентным Т- и NK-клеткам [1, 11]. Аллели *HLA-G\*01:01*, *HLA-G\*01:03* и *HLA-G\*01:04* наиболее распространены среди европейцев [11]. В российской популяции ранее были выявлены только аллели *HLA-G\*01:01*, *HLA-G\*01:03*, *HLA-G\*01:04* и *HLA-G\*01:05N* [1]. Мы сопоставили собственные результаты с результатами исследования из Северо-Западного региона. Выяснилось, что статистически значимые отличия в частотах встречаемости аллелей *HLA-G* у относительно здоровых людей в двух регионах России отсутствуют (табл. 5).

Нами обнаружена ассоциация аллеля 110Pe (*HLA-G\*01:04*) с риском НБ как инфекционного, так и неинфекционного генеза, при этом риск НБ выше у женщин с инфекцией (табл. 4). Выявлено однонаправленное взаимодействие генетического и инфекционного факторов у женщин с НБ. Наши результаты согласуются с ранее опубликованными данными относительно связи аллеля *HLA-G\*01:04* с повторяющимися самопроизвольными выкидышами [5, 40] и отторжением аллотрансплантата легкого [14] и почки [27].

Аллель 110Pe *HLA-G* кодирует  $\alpha 2$ -внеклеточный домен G1 изоформы белка, связанного с клеточной мембраной (mHLA-G1). Вместе с  $\alpha 1$ -внеклеточным доменом они образуют антигенсвязывающую полость, содержащую специфичный для каждого человека пептид [5]. Изоформа mHLA-G1 может подвергаться протеолитическому расщеплению матриксными металлопротеиназами и «высвободиться» в виде растворимой (sHLA-G1) формы после отделения от клеточной мембраны [31]. Обе формы mHLA-G1 и sHLA-G1 имеют одинаковую специфичность к рецепторам Т- и NK-клеток [11]. Было предположено, что аминокислотная замена Leu→Ile в положении 110 экзона 3 гена *HLA-G* может структурно изменять представляемый пептид и антигенсвязывающую полость и влиять на эффективность связывания с рецепторами NK- и Т-клеток, изменяя их активность [5, 14, 28].

Эта идея недавно получила подтверждение в исследованиях на клетках линии K652, трансдуцированных вариантами *HLA-G\*01:01*, *HLA-G\*01:03* и *HLA-G\*01:04* (отличаются друг от друга аминокислотными заменами в  $\alpha 2$ -домене АГ) в качестве мишеней, и NK-клетках в качестве эффекторов. Аллель *HLA-G\*01:04* связан с пептидно-опосредованными изменениями АГ, способными влиять на взаимодействие с децидуальными и периферическими NK-клетками. Как оказалось, кодируемые аллелем *HLA-G\*01:04* АГ детерминанты отличаются от остальных в пред-

ставлении профиля якорной последовательности пептида NK-клеткам. Отмечено сходство в презентации пептида *HLA-G\*01:04* с другим неклассическим HLA I класса – *HLA-E\*01:03*, для которого высокая поверхностная экспрессия АГ связана с повышенным ингибированием активности NK-клеток через рецептор CD94/NKG2A [11, 20]. Цитотоксический тест показал, что mHLA-G\*01:04 на K652 клетках обеспечивал им максимальную защиту от лизиса NK-клетками, чем mHLA-G\*01:01 и mHLA-G\*01:03 [11]. В подобном исследовании с децидуальными NK-клетками (dNK CD56<sup>bright</sup>/CD9<sup>+</sup>) было найдено, что sHLA-G\*01:04 и sHLA-G\*01:01 на K652-клетках имели лучшую эффективность связывания с dNK-клетками, чем вариант sHLA-G\*01:03. Премированные dNK-клетки пролиферировали сильнее после их инкубации с клетками K652 с mHLA-G\*01:04, чем с клетками с mHLA-G\*01:01 и mHLA-G\*01:03 [34].

Во время беременности dNK-клетки являются самой большой популяцией (~70-80%) лейкоцитов фетоплацентарного комплекса. В отличие от периферических NK-клеток они обладают пониженной цитотоксичностью и ориентированы на индукцию цитокинов и ангиогенных факторов, необходимых для инвазии трофобласта и сосудистого ремоделирования плаценты [19, 37]. Молекулы HLA-G отсутствуют на dNK-клетках, но они могут их приобретать из клеток трофобласта или других иммунокомпетентных клеток с помощью трофоцитоза. Приобретение молекул HLA-G dNK-клетками приводит к перепрограммированию этих клеток на создание иммуносупрессивной среды, причем они не экспрессируют HLA-G, а лишь временно их демонстрируют [19].

Предполагается, что HLA-G служит лигандом для ингибирующего внутриклеточного рецептора KIR2DL4 NK-клетки, его основным взаимодействующим партнером рассматривается sHLA-G форма [11, 26]. Комплексы HLA-G – KIR2DL4 могут приводить к устойчивой внутриклеточной передаче сигналов после интернализации и поглощения HLA-G [37]. Интернализация и деградация HLA-G, приобретенного NK-клетками, может восстанавливать цитотоксическую способность и высокую воспалительную активность dNK-клеток. Как было показано для цитомегаловирусной инфекции, прерывание цикла трофоцитоз-интернализация-поглощение цитокинами и/или вирусными продуктами обеспечивало dNK-клеткам контроль над инфекцией в фетоплацентарном комплексе [37].

Во время беременности концентрация sHLA-G в плазме крови женщин на порядок выше по сравнению с небеременными женщинами [23] и имеет смешанное происхождение, часть

sHLA-G выделяется клетками трофобласта [15]. Источником материнских sHLA-G служат АПК, чьи функции направлены на поддержание толерантной среды на границе мать-плод [6].

Аллель *HLA-G\*01:04* связан с более высокими концентрациями sHLA-G и sHLA-I в плазме крови доноров [29], а также в слизистой цервикального канала у небеременных женщин [36] по сравнению с другими аллелями *HLA-G*. Повышенная продукция sHLA-G у носителей этого аллеля объясняется уникальной структурой гаплотипов промотора, где присутствует предковый аллель -1155A рядом с областью контроля локуса, отвечающей за регуляцию экспрессии гена [18, 35]. В связи с этим можно было бы ожидать, что опосредованные аллелем 110Pe *HLA-G (HLA-G\*01:04)* механизмы иммуносупрессии должны способствовать успешному развитию беременности, однако исключением могут быть первичные и/или хронические инфекции у матери.

Иммуносупрессивные свойства молекул *HLA-G* используются вирусами и внутриклеточными паразитами для разработки множества стратегий уклонения от иммунного ответа хозяина [12, 18, 19]. Высокие уровни sHLA-G в плазме крови наблюдаются при вирусных (ВИЧ, цитомегаловирус, вирус гепатита С и В) и паразитарных (*Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*) инфекциях, а также в слизистой цервикального канала у небеременных женщин с бактериальным вагинозом [16, 28, 36]. Обнаружены ассоциации аллеля *HLA-G\*01:04* и чувствительностью людей к вирусам ВИЧ-1 [36, 39], гепатита С [22], ВПЧ типа 16 и 18 [32]. У финок этот аллель связан с риском вертикальной передачи папилломавирусной инфекции ребенку при рождении [21].

Воспалительные реакции, опосредованные внутриматочными инфекциями, привлекают и стимулируют дифференциацию и активацию многих иммунных клеток из периферической крови матери. Эти клетки могут служить мишенями для вирусов и способствовать их репликации и распространению [38]. Кроме того, вирусы могут индуцировать присоединение восходящих бактериальных инфекций [13]. Неконтролируемые внутриматочные вирусные и бактериальные инфекции в плаценте создают воспаление, изменяющее функции регуляторных Т-клеток и активность dNK-клеток и CD8<sup>+</sup> dT-клеток памяти, дестабилизирующее иммунотолерантность в системе «мать—плод» и, вероятно, провоцирующее гибель плода [13]. Есть мнение, что менее интенсивная экспрессия гена *HLA-G* у матери может обеспечивать более устойчивый иммунный ответ против вторжения патогенов во время беременности [35].

Хотя кодирующие аллели *HLA-G* отвечают за продукцию и функции молекул *HLA-G*, было обнаружено, что отдельные SNP в 5'URR и 3'UTR регионах гена *HLA-G* оказывают влияние на его экспрессию. Структура гаплотипов, определяемая соответствующими SNP в 5'URR и 3'UTR регионах гена и получившая название *UTR*, сохранена в популяциях людей разных этносов и связана с продукцией sHLA-G [10, 14, 18]. Аллель *HLA-G\*01:04* включает *UTR3*-гаплотип. У бразильцев *HLA-G\*01:04~UTR3* гаплотип ассоциирован с промежуточной продукцией sHLA-G в периферической крови [10]. Исследования легочных заболеваний и трансплантации легкого у людей показали, что *HLA-G\*01:04~UTR3* гаплотип может быть маркером воспаления и ассоциирован с нарушением долгосрочной выживаемости аллотрансплантата и низкими уровнями sHLA-G в сыворотке крови реципиентов [8, 14, 17]. Сплитами *HLA-G\*01:04~UTR3* гаплотипа являются варианты *HLA-G\*01:04:01~UTR3* и *HLA-G\*01:04:04~UTR3*, коррелирующие у здоровых людей с повышенным и пониженным содержанием sHLA-G в сыворотке крови. Как выяснилось, оба аллеля *HLA-G\*01:04:01* и *HLA-G\*01:04:04* отличаются нуклеотидной последовательностью в положении +1827 (G > A, кодон 267) 4 экзона и кодируют одну и ту же аминокислоту пролин. *In silico* было найдено, что замена +1827 G > A создает экзонный криптический акцепторный сайт, в результате транскрипты мРНК *HLA-G\*01:04* могут обрабатываться по-разному и отвечать за продукцию разного количества белка у людей [18, 30]. Известно, что снижение или нарушение продукции sHLA-G в крови у женщин на ранних этапах беременности является фактором риска самопроизвольного выкидыша или будущего осложнения беременности — преэклампсии [6].

Экспрессия гена *HLA-G* дополнительно регулируется внеклеточными факторами, их рецепторами и сигнальными молекулами [24]. Иммуномодулирующие свойства прогестерона связаны с поддержанием иммуносупрессии и защитой плода от отторжения иммунной системой матери [3]. Прогестерон может изменять экспрессию гена *HLA-G* через специфический сайт связывания — неклассическую коровую консенсусную последовательность длиной 15 н.п. элемента ответа на прогестерон (PRE) в 5'URR-регионе, расположенный на 37 н.п. ниже от стартового кодона ATG и перекрывающий TATA-бокс *HLA-G* [19, 24]. *In silico* обнаружено, что по сравнению с другими гаплотипами замена G > A в положении +1827 *HLA-G\*01:04~UTR3* может приводить к изменению сайта PRE и нарушать активацию экспрессии гена, способствуя потере контроля над локальным воспалением [30].

## Заключение

Обнаружена ассоциация аллеля 110Pe (rs12722477, *HLA-G\*01:04*) с риском НБ у женщин. В нашем исследовании внутриматочная инфекция не являлась самостоятельным фактором риска НБ у женщин. В то же время аллель 110Pe (*HLA-G\*01:04*) и инфекция оказывали совместный эффект влияния на предрасположенность к НБ. Нельзя не исключить, что у женщин аллель 110Pe (*HLA-G\*01:04*) может быть одним из ключевых элементов рестрикции механизма иммуно-

толерантности и материнского иммунного ответа на внутриматочную инфекцию во время беременности. Поскольку аллель-зависимая продукция молекул HLA-G дополнительно контролируется полиморфизмом в 5'URR и 3'UTR регионах гена *HLA-G*, исследование UTR-гаплотипов *HLA-G* может помочь расширить наши знания о механизмах иммунных нарушений в системе «мать—плод», поэтому требуется продолжить исследование. Наши результаты могут быть полезными при выборе тактики ведения и лечения женщин с НБ.

## Список литературы / References

1. Аленичев А.С., Насыхова Ю.А., Иващенко Т.Э., Баранов В.С. Характеристика генетической структуры популяции Северо-западного региона РФ по гену HLA-G // Экологическая генетика, 2014. Т. XII. № 2. С. 74-80. [Alenichev A.S., Nasykhova Yu.A., Ivashchenko T.E., Baranov V.S. Population genetic structure of HLA-G gene in North-west Region of Russian Federation. *Ekologicheskaya genetika = Ecological Genetics*, 2014, Vol. XII, no. 2, pp. 47-80. (In Russ.)]
2. Вавилин В.А., Часовникова О.Б., Ляхович В.В., Гавалов С.М., Рябова О.А. Генетический полиморфизм глутатион-S-трансферазы M1 и T1 у детей, больных бронхиальной астмой // Вопросы медицинской химии, 2000. Т. 46, № 4. С. 388-397. [Vavilin V.A., Chasovnikova O.B., Lyakhovich V.V., Gavalov S.M., Ryabova O.A. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and T1 in asthmatic childrens. *Voprosy meditsinskoy khimii = Medical Chemistry Issues*, 2000, Vol. 11, no. 6, pp. 541- 548. (In Russ.)]
3. Герлинская Л.А., Варлачев А.В., Кротов Г.И., Концевая Г.В., Мошкин М.П. Иммуногенетический диалог матери и эмбрионов как фактор становления иммунного статуса потомков // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2018. Т. 22, № 8. С. 1009-1019. [Gerlinskaya L.A., Varlachev A.V., Krotov G.I., Kontsevaya G.V., Moshkin M.P. Mother-fetus immunogenetic dialogue as a factor of progeny immune system development. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2018, Vol. 22, no. 8, pp. 1009-1019. (In Russ.)]
4. Черных Е.Р., Селедцова Н.В., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Курганова Е.В., Хонина Н.А., Останин А.А., Пасман Н.М. Дендритные клетки как возможные регуляторы иммунной перестройки при беременности // Медицинская иммунология, 2009. Т. 11, № 6. С. 541-548. [Chernykh E.R., Seledtsova N.V., Lepkina O.Yu., Tikhonova M.A., Tyrinova T.V., Kurganova E.V., Khonina N.A., Ostanin A.A., Pasman N.M. Dendritic cells as possible regulators of immune reorganization in pregnancy. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2009, Vol. 11, no. 6, pp. 541- 548. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2009-6-541-548.
5. Aldrich C.L., Stephenson M.D., Karrison T., Odem R.R., Branch D.W., Scott J.R., Schreiber J.R., Ober C. HLA-G genotypes and pregnancy outcome in couples with unexplained recurrent miscarriage. *Mol. Hum. Reprod.*, 2001, Vol. 7, no. 12, pp. 1167-1172.
6. Alegre E., Diaz-Lagares A., Lemaout J., López-Moratalla N., Carosella E.D., González A. Maternal antigen presenting cells are a source of plasmatic HLA-G during pregnancy: longitudinal study during pregnancy. *Hum. Immunol.*, 2007, Vol. 68, no. 8, pp. 661-667.
7. Amiot L., Vu N., Samson M. Immunomodulatory properties of HLA-G in infectious diseases. *J. Immunol. Res.*, 2014, Vol. 2014, 298569. doi: 10.1155/2014/298569.
8. Carlini F., Picard C., Garulli C., Piquemal D., Roubertoux P., Chiaroni J., Chanez P., Gras D., Di Cristofaro J. Bronchial epithelial cells from asthmatic patients display less functional HLA-G isoform expression. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 6. doi: 10.3389/fimmu.2017.00006.
9. Carosella E.D., Gregori S., LeMaout J. The tolerogenic interplay(s) among HLA-G, myeloid APCs, and regulatory cells. *Blood.*, 2011, Vol. 118, no. 25, pp. 6499-6505.
10. Castelli E.C., Mendes-Junior C.T., Deghaide N.H.S., de Albuquerque R.S., Muniz Y.C.N., Simões R.T., Carosella E.D., Moreau P., Donadi E.A. The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. *Genes Immun.*, 2010, Vol. 11, no. 2, pp. 134-141.
11. Celik A.A., Simper G.S., Huyton T., Blasczyk R., Bade-Döding C. HLA-G mediated immune regulation is impaired by a single amino acid exchange in the alpha 2 domain. *Hum. Immunol.*, 2018, Vol. 79, no. 6, pp. 453-462.
12. Celsi F., Catamo E., Kleiner G., Tricarico P.M., Vuch J., Crovella S. HLA-G/C, miRNAs, and their role in HIV infection and replication. *Biomed. Res. Int.*, 2013, Vol. 2013, 693643. doi: 10.1155/2013/693643.
13. Crespo Â.C., van der Zwan A., Ramalho-Santos J., Strominger J.L., Tilburgs T. Cytotoxic potential of decidual NK cells and CD8<sup>+</sup> T cells awakened by infections. *J. Reprod. Immunol.*, 2017, Vol. 119, pp. 85-90.

14. Cristofaro J.D., Reynaud-Gaubert M., Carlini F., Roubertoux P., Loundou A., Basire A., Frassati C., Thomas P., Gomez C., Picard C. HLA-G\*01:04~UTR3 recipient correlates with lower survival and higher frequency of chronic rejection after lung transplantation. *Am. J. Transplant.*, 2015, Vol. 15, no. 9, pp. 2413-2420.
15. Dahl M., Klitkou L., Christiansen O.B., Djuricic S., Piosik Z.M., Skovbo P., Møller A.M., Steffensen R., Hviid T.V.F. Human leukocyte antigen (HLA)-G during pregnancy part II: associations between maternal and fetal HLA-G genotypes and soluble HLA-G. *Hum. Immunol.*, 2015, Vol. 76, no. 4, pp. 260-271.
16. d'Almeida T.C., Sadissou I., Sagbohan M., Milet J., Avokpaho E., Gineau L., Sabbagh A., Moutairou K., Donadi E.A., Favier B., Pennetier C., Baldet T., Moiroux N., Carosella E., Moreau P., Rouas-Freiss N., Cottrell G., Courtin D., Garcia A. High level of soluble human leukocyte antigen (HLA)-G at beginning of pregnancy as predictor of risk of malaria during infancy. *Sci Rep.*, 2019, Vol. 9, no. 1, 9160. doi: 10.1038/s41598-019-45688-w.
17. di Cristofaro J., El Moujally D., Agnel A., Mazieres S., Cortey M., Basire A., Chiaroni J., Picard C. HLA-G haplotype structure shows good conservation between different populations and good correlation with high, normal and low soluble HLA-G expression. *Hum Immunol.*, 2013, Vol. 74, no. 2, pp. 203-206.
18. Donadi E.A., Castelli E.C., Arnaiz-Villena A., Roger M., Rey D., Moreau P. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2011, Vol. 68, no. 3, pp. 369-395.
19. Ferreira L.M.R., Meissner T.B., Tilburgs T., Strominger J.L. HLA-G: at the interface of maternal-fetal tolerance. *Trends Immunol.*, 2017, Vol. 38, no. 4, pp. 272-286.
20. Jucaud V., Ravindranath M.H., Terasaki P.I. Immunobiology of HLA class-Ib molecules in transplantation. *SOJ Immunol.*, 2015, Vol. 3, no. 4, pp. 1-15.
21. Louvanto K., Roger M., Faucher M.C., Syrjänen K., Grenman S., Syrjänen S. HLA-G and vertical mother-to-child transmission of human papillomavirus infection. *Hum. Immunol.*, 2018, Vol. 79, no. 6, pp. 471-476.
22. Martinetti M., Pacati I., Cuccia M., Badulli C., Pasi A., Salvaneschi L., Minola E., De Silvestri A., Iannone A.M., Maccabruni A. Hierarchy of baby-linked immunogenetic risk factors in the vertical transmission of hepatitis C virus. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2006, Vol. 19, no. 2, pp. 369-378.
23. Morandi F., Rizzo R., Fainardi E., Rouas-Freiss N., Pistoia V. Recent advances in our understanding of HLA-G biology: lessons from a wide spectrum of human diseases. *J. Immunol. Res.*, 2016, Vol. 2016, 4326495. doi: 10.1155/2016/4326495.
24. Moreau P., Flajollet S., Carosella E.D. Non-classical transcriptional regulation of HLA-G: an update. *J. Cell. Mol. Med.*, 2009, Vol. 13, no. 9B, pp. 2973-2989.
25. Nilsson L.L., Djuricic S., Hviid T.V.F. Controlling the immunological crosstalk during conception and pregnancy: HLA-G in reproduction. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 13, no. 5, 198. doi: 10.3389/fimmu.2014.00198.
26. Persson G., Melsted W.N., Nilsson L.L., Hviid T.V.F. HLA class Ib in pregnancy and pregnancy-related disorders. *Immunogenetics*, 2017, Vol. 69, no. 8-9, pp. 581-595.
27. Pirri A., Contieri F.C., Benvenuti R., Bicalho M.G. A study of HLA-G polymorphism and linkage disequilibrium in renal transplant patients and their donors. *Transpl. Immunol.*, 2009, Vol. 20, no. 3, pp. 143-149.
28. Rebmann V., da Silva Nardi F., Wagner B., Horn P.A. HLA-G as a tolerogenic molecule in transplantation and pregnancy. *J. Immunol. Res.*, 2014, Vol. 2014, 297073. doi: 10.1155/2014/297073.
29. Rebmann V., van der Ven K., Pässler M., Pfeiffer K., Krebs D., Grosse-Wilde H. Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. *Tissue Antigens*, 2001, Vol. 57, pp. 15-21.
30. Ribeyre C., Carlini F., René C., Jordier F., Picard C., Chiaroni J., Abi-Rached L., Gouret P., Marin G., Molinari N., Chanez P., Paganini J., Gras D., Di Cristofaro J. HLA-G Haplotypes Are Differentially Associated with Asthmatic Features. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 278. doi: 10.3389/fimmu.2018.00278.
31. Rizzo R., Gabrielli L., Bortolotti D., Gentili V., Piccirilli G., Chiereghin A., Pavia C., Bolzani S., Guerra B., Simonazzi G., Cervi F., Capretti M.G., Fainardi E., Luca D.D., Landini M.P., Lazzarotto T. Study of Soluble HLA-G in Congenital Human Cytomegalovirus Infection. *J. Immunol. Res.*, 2016, Vol. 2016, 3890306. doi: 10.1155/2016/3890306.
32. Simões R.T., Gonçalves M.A., Castelli E.C., Júnior C.M., Bettini J.S., Discorde M.L., Duarte G., Quintana S.M., Simões A.L., Moreau P., Carosella E.D., Soares E.G., Donadi E.A. HLA-G polymorphisms in women with squamous intraepithelial lesions harboring human papillomavirus. *Mod. Pathol.*, 2009, Vol. 22, no. 8, pp. 1075-1082.
33. Singh M., Rajak J., Kadam S., Rajadhyaksha S.B. Alloimmunization and role of HLA in pregnancy. Available at: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.84211>.
34. Stieglitz F., Celik A.A., von Kaisenberg C., Camps M.A., Blasczyk R., Bade-Döding C. The microstructure in the placenta is influenced by the functional diversity of HLA-G allelic variants. *Immunogenetics*, 2019, Vol. 71, no. 7, pp. 455-463.
35. Tan Z., Shon A.M., Ober C. Evidence of balancing selection at the HLA-G promoter region. *Hum. Mol. Genet.*, 2005, Vol. 14, no. 23, pp. 3619-3628.
36. Thibodeau V., Lajoie J., Labbe A.C., Zannou M.D., Fowke K.R., Alary M., Poudrier J., Roger M. High level of soluble HLA-G in the female genital tract of Beninese commercial sex workers is associated with HIV-1 infection. *PLoS ONE*, 2011, Vol. 6, e25185. doi: 10.1371/journal.pone.0025185.
37. Tilburgs T., Evans J.H., Crespo A.C., Strominger J.L. The HLA-G cycle provides for both NK tolerance and immunity at the maternal-fetal interface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015, Vol. 112, no. 43, pp. 13312-13317.
38. Tilburgs T., Strominger J.L. CD8<sup>+</sup> effector T cells at the fetal-maternal interface, balancing fetal tolerance and antiviral immunity. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2013, Vol. 69, no. 4, pp. 395-407.

39. Turk W.J., Kimani J., Bielawny T., Wachihi C., Ball T.B., Plummer F.A., Luo M. Associations of human leukocyte antigen-G with resistance and susceptibility to HIV-1 infection in the Pumwani sex worker cohort. *AIDS*, 2013, Vol. 27, pp. 7-15.

40. Vargas R.G., Sarturi P.R., Mattar S.B., Bompeixe E.P., Silva J.S., Pirri A., Bicalho M.G. Association of HLA-G alleles and 3' UTR 14 bp haplotypes with recurrent miscarriage in Brazilian couples. *Hum. Immunol.*, 2011, Vol. 72, no. 6, pp. 479-485.

---

**Авторы:**

**Гордеева Л.А.** — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммуногенетики, Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук (Институт экологии человека СО РАН), г. Кемерово, Россия

**Воронина Е.Н.** — к.б.н., научный сотрудник лаборатории фармакогеномики ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия

**Поленок Е.Г.** — к.фарм.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии, Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук (Институт экологии человека СО РАН), г. Кемерово, Россия

**Мун С.А.** — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики, Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук (Институт экологии человека СО РАН), г. Кемерово, Россия

**Нерсисян С.Л.** — врач-генетик медико-генетической консультации ГАУЗ «Кемеровская областная клиническая больница», г. Кемерово, Россия

**Оленникова Р.В.** — врач-генетик медико-генетической консультации ГАУЗ «Кемеровская областная клиническая больница», г. Кемерово, Россия

**Филипенко М.Л.** — к.б.н., заведующий лабораторией фармакогеномики ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия

**Глушков А.Н.** — д.м.н., заместитель директора, Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук (Институт экологии человека СО РАН), г. Кемерово, Россия

**Authors:**

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

**Voronina E.N.**, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Pharmacogenomics, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

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

**Mun S.A.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Immunogenetics, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences (Institute of Human Ecology, SB RAS), Kemerovo, Russian Federation

**Nersesyan S.L.**, Geneticist, Genetic Counseling Center, Kemerovo, Kemerovo Regional Clinical Hospital, Kemerovo, Russian Federation

**Olennikova R.V.**, Geneticist, Genetic Counseling Center, Kemerovo Regional Clinical Hospital, Kemerovo, Russian Federation

**Filipenko M.L.**, PhD (Biology), Head, Laboratory of Pharmacogenomics, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

**Glushkov A.N.**, PhD, MD (Medicine), Deputy Director, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences (Institute of Human Ecology, SB RAS), Kemerovo, Russian Federation

## РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К КЛЕТОЧНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Гельм Ю.В., Абакушина Е.В., Пасова И.А., Гривцова Л.Ю.

Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская обл., Россия

**Резюме.** Для лечения пациентов с онкологическими заболеваниями в последние годы активно развиваются методы клеточной иммунотерапии. Наиболее актуальным становится применение противоопухолевой адаптивной (от англ. adopt – принимать, усыновлять) иммунотерапии (АИТ) на основе активированных *in vitro* лимфоцитов и клеток натуральных киллеров (НК-клеток), противоопухолевый потенциал которых усиливают с помощью культивирования *in vitro* в присутствии цитокинов. При инкубации *in vitro* мононуклеаров периферической крови пациентов с цитокинами получают цитокин-индуцированные киллеры (ЦИК). Именно они являются одним из важных компонентов противоопухолевой защиты и могут использоваться для АИТ. В настоящее время исследования в области противоопухолевой АИТ продолжаются, идет поиск высокотехнологичных и безопасных методов клеточной иммунотерапии в онкологии. В статье представлены результаты *in vitro* активации лимфоцитов периферической крови 19 онкологических больных двумя способами. В присутствии интерлейкинов: IL-2, IL-12 и в присутствии интерлейкинов: IL-2 и IL-15. Методом ИФА выявлены различия в секреции цитокинов (IL-2, IL-4, IL-6 и IL-10, IFN $\alpha$  и IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ ) активированными *in vitro* лимфоцитами. Показано, что для более ранней активации клеток *in vitro* необходимо применять IL-15. Изучена способность клеток цельной крови 20 онкологических больных, после проведения клеточной иммунотерапии и без нее, а также 10 здоровых доноров секретировать цитокины *in vitro* при спонтанном и митоген-индуцированном способе культивирования. Установлено, что клетки периферической крови онкологических больных, получающих АИТ на протяжении года и более, обладают большей способностью реагировать на стимуляцию митогеном, в отличие от больных, которым АИТ никогда не проводили, а так же относительно группы доноров, иммунная система которых также не подвергалась стимуляции. Вероятнее это можно объяснить тем, что при введении активированных *in vitro* ЦИК в организме пациента запускается ряд каскадных реакций межклеточного взаимодействия, приводящих к активации клеток иммунной системы пациента, а именно противоопухолевого иммунитета, пролиферации цитотоксических лимфоцитов и НК-клеток, и подавления иммуносупрессии *in vivo*. Разработанный способ получения ЦИК может быть рекомендован для проведения клеточной АИТ онкологическим больным, как новый подход к активации клеток иммунной системы больного *in vivo*.

**Ключевые слова:** лимфоциты, активация *in vitro*, IL-2, IL-12, IL-15, клеточная иммунотерапия, активность клеток, физиологический резерв

### Адрес для переписки:

Гельм Юлия Витальевна  
Медицинский радиологический научный центр имени  
А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр радиологии» Министерства  
здравоохранения РФ  
249036, Россия, Калужская обл., г. Обнинск,  
ул. Королева, 4.  
Тел.: 8 (484) 392-96-04.  
E-mail: Julia\_marizina@mail.ru

### Address for correspondence:

Gelm Yulia V.  
A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Branch  
of National Medical Research Center of Radiology  
249036, Russian Federation, Kaluga Region, Obninsk,  
Korolev str., 4.  
Phone: 7 (484) 392-96-04.  
E-mail: Julia\_marizina@mail.ru

### Образец цитирования:

Ю.В. Гельм, Е.В. Абакушина, И.А. Пасова,  
Л.Ю. Гривцова «Разработка подходов к клеточной  
иммунотерапии онкологических больных» //  
Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 2. С. 381-388.  
doi: 10.15789/1563-0625-DOA-2135  
© Гельм Ю.В. и соавт., 2021

### For citation:

Yu. V. Gelm, E. V. Abakushina, I. A. Pasova, L. Yu. Grivtsova  
“Development of approaches for cellular immunotherapy  
of cancer patients”, *Medical Immunology (Russia)/  
Meditsinskaya Immunologiya*, 2021, Vol. 23, no. 2,  
pp. 381-388. doi: 10.15789/1563-0625-DOA-2135  
DOI: 10.15789/1563-0625-DOA-2135

## DEVELOPMENT OF APPROACHES FOR CELLULAR IMMUNOTHERAPY OF CANCER PATIENTS

Gelm Yu.V., Abakushina E.V., Pasova I.A., Grivtsova L.Yu.

A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Branch of National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

**Abstract.** To treat the patients with oncological diseases, cellular immunotherapy have been actively developed in recent years. Usage of antitumor adoptive immunotherapy (AIT) based on *in vitro* activated lymphocytes and natural killer cells (NK cells) is the most urgent issue. Their antitumor potential is enhanced by *in vitro* cultivation in the presence of cytokines. *In vitro* incubation of autologous peripheral blood mononuclear cells supplemented with cytokines produces cytokine-induced killer cells (CIK). These cells represent the important component of antitumor protection which may be potentially used for AIT. Currently, the studies in the field of antitumor AIT continues, searching for high-tech and safe methods of cellular immunotherapy in oncology. The article describes results of *in vitro* activation of lymphocytes from cancer patients (n = 19) in the culture media containing IL-2, IL-12 and IL-15. The ELISA assays revealed differences in the cytokine secretion (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) after *in vitro* activation of lymphocytes. It was shown that, for earlier *in vitro* activation of cells, IL-15 should be supplemented. We also studied the ability of whole blood cells from cancer patients (n = 20) receiving cell immunotherapy vs those non-treated with AIT, as well as healthy donors (n = 10), to secrete cytokines in spontaneous and mitogen-induced cultures. Peripheral blood cells of cancer patients receiving AIT for a year or more proved to show a more pronounced ability to respond to mitogen stimulation, in contrast to the patients who have never received AIT, as well as in relation to a group of donors whose immune system has not been stimulated either. Most likely, this may be explained by the fact, that the *in vitro* activated CIKs if introduced into the patient's body, trigger a number of cascade-like intercellular interactions leading to activation of the patient's immune system cells, especially, antitumor immunity, proliferation of cytotoxic lymphocytes and NK cells, like as *in vivo* inhibition of immunosuppression. The developed method of CIK production may be offered for carrying out cellular AIT in oncological patients as a novel approach to *in vivo* activation of the patient's immune system.

*Keywords:* lymphocytes, *in vitro* activation, IL-2, IL-12, IL-15, cell immunotherapy, cell's activity, physiological reserve

### Введение

Адоптивная (от англ. adopt — принимать, усыновлять) сопроводительная иммунотерапия (АИТ) является одним из перспективных направлений современной онкоиммунологии, которая направлена на активацию противоопухолевой активности и усиление эффекторного звена иммунного ответа за счет цитотоксических Т-лимфоцитов и НК-клеток [6, 9, 10, 11, 12, 14]. К таким исследованиям с полным основанием можно отнести работы связанные с развитием новых методов АИТ, которые недавно продемонстрировали положительные результаты в лечении ряда онкологических заболеваний [6, 7, 8, 14]. АИТ направлена на усиление противоопухолевого ответа за счет введения больному различных типов иммунных клеток, включая дендритные клетки (ДК), СТЛs, лимфокин-активированные киллерные клетки, цитокин-индуцированные киллерные клетки (ЦИК) и НК-клетки. Подобные подходы показывают хороший терапевтический ответ у больных с распространенными

формами рака [7]. Основным преимуществом адоптивной иммунотерапии является прямое противоопухолевое действие активированных иммунокомпетентных клеток. В настоящее время исследования в области противоопухолевой АИТ продолжаются, идет поиск высокотехнологичных и безопасных методов клеточной иммунотерапии в онкологии [2, 6, 12, 15].

В регуляции иммунного ответа большую роль на всех этапах его развития играют цитокины. Уровень концентрации цитокинов в сыворотке или плазме крови отражает состояние иммунной системы пациента, в частности работу гуморального и клеточного звена иммунитета, тогда как в ситуациях, сопряженных с дефицитом или дисбалансом регуляторных факторов, необходимо оценить способность клеток крови к секреции цитокинов [1, 3, 4, 5, 13]. При этом спонтанная продукция цитокинов свидетельствует о том, насколько клетки крови уже активированы *in vivo*, в то время как митоген-индуцированная (МИ) продукция позволяет оценить потенциальную способность клеток к секреции цитокинов в от-

вет на стимул, то есть узнать физиологический резерв активности клеток у данного конкретного пациента. Поэтому выявление способности клеток крови онкологических больных до и на этапах проведения адоптивной АИТ к индукции различных цитокинов и их соотношений в крови позволит выявить как дисфункцию, так и степень активности клеток иммунной системы.

## Материалы и методы

Образцы периферической крови получены у 39 онкологических больных (меланома – 20 человек, рак кишечника – 3, рак желудка – 1, рак поджелудочной железы – 1, опухоль пищевода – 1, рак ротоглотки – 2, рак молочной железы – 5, рак легкого – 2, опухоли матки – 3, и опухоли предстательной железы – 1) и у 10 здоровых доноров (контрольные образцы периферической крови). У больных и доноров получено информированное согласие. Дизайн исследования представлен в таблице 1.

### Выделение ПМН, изучение морфологии и жизнеспособности лимфоцитов

Мононуклеары периферической крови выделяли на градиенте плотности фикола ( $\rho = 1,077$ ), из 30 мл гепаринизированной венозной крови, путем центрифугирования при 2000 оборотов/мин, далее дважды отмывали фосфатно-солевым буфером (рН 7,4) и доводили до концентрации 1,5-2 млн/мл. Жизнеспособность культивируемых клеток определяли с помощью 0,4% раствора трипанового синего (Биолот, Россия), а именно в

камере Горяева пересчитывали в процентах долю мертвых, т.е. в которые проник краситель, от общего количества клеток.

### Активация лимфоцитов *in vitro* с помощью ИЛ-2, ИЛ-12, ИЛ-15

Активацию и культивирование выделенных мононуклеаров проводили до 10 дней в пластиковых флаконах с вентилируемой крышкой (в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора) в питательной среде RPMI 1640 (ПанЭко, Россия) с рекомбинантными человеческими (rh) интерлейкинами: в среде 1 (n = 7) с добавлением ИЛ-2 и ИЛ-12, в среде 2 (n = 12) с добавлением ИЛ-2 и ИЛ-15. Через каждые 48-72 часа обновляли половину объема питательной среды. На 3-й и 7-й дни активации отбирали часть активированных лимфоцитов, осаждали центрифугированием, собирали и замораживали супернатант для иммуноферментного анализа (ИФА)

### Спонтанная и митоген-индуцированная (МИ) активация клеток крови

В исследование включены две группы больных. Одну группу (n = 10) составили онкологические больные, получающие непрерывно клеточную АИТ не менее года (группа АИТ+). Вторую группу (n = 10) составили онкологические больные, не получавшие ранее адоптивную клеточную АИТ (группа АИТ-). Контрольная группа – здоровые доноры крови (n = 10).

Для группы больных, получающих АИТ в непрерывном режиме на протяжении года и более, проводилась активация предварительно выделенных лимфоцитов. Для культивирования и

ТАБЛИЦА 1. ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ

TABLE 1. STUDY DESIGN

Оценка влияния интерлейкинов (IL): IL-2, IL-12, IL-15 на цитокинопродукцию иммунокомпетентных клеток (ЦИК) Assessment of the effect of interleukins (IL): IL-2, IL-12, IL-15 on cytokine production of immunocompetent cells (CIK)		Спонтанная и митоген индуцированная активация клеток цельной крови Spontaneous and mitogen-induced activation of whole blood cells		
Среда 1 Medium 1	Среда 2 medium 2	1 группа (АИТ+) Group 1 (АИТ+)	2 группа (АИТ-) Group 1 (АИТ+)	Контрольная группа (доноры) Control Group (donors)
компоненты среды: IL-2 и IL-12 medium components: IL-2 and IL-12	компоненты среды: IL-2 и IL-15 medium components: IL-2 and IL-15	инкубация цельной крови: спонтанная и МИ whole blood incubation: spontaneous and MI		
время инкубации: 7-10 суток incubation time: 7-10 days		время инкубации: 1-е сутки incubation time: 1 <sup>st</sup> day		
n = 7	n = 12	n = 10	n = 10	n = 10
ИФА супернатантов 3-й и 7-й дни, сравнение ELISA of supernatants 3 <sup>rd</sup> and 7 <sup>th</sup> days, comparison		ИФА супернатантов при спонтанном и МИ способе культивирования, сравнение ELISA of supernatants with spontaneous and MI cultivation, comparison		

МИ активации клеток цельной крови больных и доноров по инструкции фирмы производителя использовали специальные наборы реагентов «Цитокин-стимул-бест» (АО «Вектор-Бест»). Митоген содержал фитогемагглютинин – 4 мкг, конканавалин А – 4 мкг и липополисахарид – 2 мкг. Через сутки инкубации флаконы вскрывали, содержимое переносили в пробирки, клетки осаждали центрифугированием при 3000 оборотов/мин в течение 10 минут, собирали и замораживали супернатант для оценки концентрации цитокинов методом ИФА.

#### Имуноферментный анализ (ИФА)

В супернатантах, полученных на этапах инкубации мононуклеаров и цельной крови, определяли концентрации цитокинов: IL-2, IL-4, IL-6 и IL-10, IFN $\alpha$  и IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ , инкубацию проводили с помощью наборов реагентов «Вектор-Бест» по инструкции фирмы производителя. Одновременно в тот же планшет вносили в дублях калибровочные и контрольные образцы. По окончании всех необходимых инкубаций

и промывок вносили стоп-реагент и измеряли оптическую плотность образцов на фотометре ChroMate (Awareness Technology, США) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – 620 нм. Далее вычисляли среднее арифметическое значение оптической плотности для каждой пары лунок, содержащих калибровочные, контрольные и анализируемые образцы. Строили в линейных координатах калибровочный график зависимости среднего арифметического значения оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации цитокина в калибровочных образцах (пг/мл) и определяли по графику концентрацию цитокина в контрольных и анализируемых образцах.

#### Проведение АИТ онкологическим больным цитокин-индуцированными киллерными (ЦИК) клетками

Для получения ЦИК проводили активацию и культивирование мононуклеаров течение 10-14 дней в пластиковых флаконах с вентилируемой крышкой (в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора) в пита-

**ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ В СУПЕРНАТАНТАХ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ (пг/мл) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ И ВРЕМЕНИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>) пг/мл**

TABLE 2. CONCENTRATIONS OF CYTOKINES IN SUPERNATANTS OF CANCER PATIENTS (pg/ml) DEPENDING ON THE CONDITIONS AND TIME OF CULTIVATION, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>) pg/ml

Цитокин Cytokine	Среда 1 (IL-2 + IL-12) Medium 1 (IL-2 + IL-12) n = 7		Среда 2 (IL-2 + IL-15) Medium 2 (IL-2 + IL-15) n = 12	
	3-е сутки (пг/мл) 3 <sup>rd</sup> day (pg/ml)	7-е сутки (пг/мл) 7 <sup>th</sup> day (pg/ml)	3-е сутки (пг/мл) 3 <sup>rd</sup> day (pg/ml)	7-е сутки (пг/мл) 7 <sup>th</sup> day (pg/ml)
IL-2	104,0 (102,0-117,5)	117,0 (105,0-125,0)	86,0 (68,0-117,0)	107,0 (66,3-111,0)
IL-4	2,0 (1,0-3,5)	11,0 (6,5-20,0)*	3,0 (3,0-3,0)	13,0 (5,8-38,5)*
IL-6	57,0 (17,0-177,0)	236,0 (205,0-276,5)	206,5 (204,8-221,8)	214,0 (207,8-224,0)
IL-10	63,0 (58,0-97,5)	91,0 (80,5-105,0)	157,0 (93,0-306,3)**	120,5 (82,8-146,8)
IFN $\alpha$	0,0 (0,0-0,0)	1,0 (0,5-2,0)	0,0 (0,0-0,3)	0,0 (0,0-0,3)
IFN $\gamma$	64,0 (28,0-896,0)	900,0 (702,0-1105,0)	589,0 (282,0-889,0)	1187,5 (1115,0-1294,5)*.***
TNF $\alpha$	25,0 (14,0-143,5)	184,0 (176,5-208,0)*	57,0 (38,3-184,0)	176,5 (144,5-206,0)

Примечание. \* p < 0,05 – цитокинопродукция в супернатантах на 7-е сутки активации по сравнению с 3-ми сутками внутри группы (в среде 1 и в среде 2); \*\* p < 0,05 – цитокинопродукция в супернатантах на 3-и сутки активации лимфоцитов в среде 2 по сравнению со средой 1; \*\*\* p < 0,05 – цитокинопродукция в супернатантах на 7-е сутки активации лимфоцитов в среде 2 по сравнению со средой 1.

Note. \* p < 0.05, cytokine production in supernatants on the 7<sup>th</sup> day of activation compared to 3 days within the group (in medium 1 and in medium 2); \*\* p < 0.05, cytokine production in supernatants on 3<sup>rd</sup> day of lymphocyte activation in medium 2 compared with medium 1; \*\*\* p < 0.05, cytokine production in supernatants on the 7<sup>th</sup> day of lymphocyte activation in medium 2 compared to medium 1.

**ТАБЛИЦА 3. ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ ПРИ СПОНТАННОМ И МИ-СПОСОБЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

TABLE 3. CYTOKINE PRODUCTION OF BLOOD CELLS OF HEALTHY DONORS AND CANCER PATIENTS WITH SPONTANEOUS AND MI CULTIVATION

Цитокин Cytokine	Контрольная группа (доноры), пг/мл Control group (donors), pg/ml (n = 10)		1-я группа (АИТ+), пг/мл Group 1 (AIT+), pg/ml (n = 10)		2-я группа (АИТ-), пг/мл Group 2 (AIT-), pg/ml (n = 10)	
	Спонтанная Spontaneous	МИ MI	Спонтанная Spontaneous	МИ MI	Спонтанная Spontaneous	МИ MI
<b>IL-2</b>	6,1 (0,3-10,3)	109,6 (59,1-182,3)*	3,7 (0,5-8,2)	45,9 (44,3-84,5)*.***	0,0 (0,0-3,5)**	50,6 (7,5-67,1)*.***
<b>IL-4</b>	3,2 (1,0-6,4)	6,0 (5,1-7,5)	0,5 (0,0-1,9)**	5,2 (4,4-5,8)*	0,0 (0,0-0,8)**	5,3 (2,8-8,9)*
<b>IL-6</b>	14,5 (10,5-40,7)	8695,0 (7350,0-9793,8)*	28,3 (15,4-54,5)	11202,5 (8998,8-13751,3)*.***	27,2 (8,1-57,0)	9585,0 (5435,0-18451,3)*
<b>IL-10</b>	2,4 (0,8-3,8)	166,6 (123,1-202,8)*	0,6 (0,0-4,7)	147,3 (123,6-207,4)*	3,0 (0,0-6,9)	167,1 (124,6-197,5)*
<b>IFN<math>\alpha</math></b>	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,2)	0,0 (0,0-0,3)	0,0 (0,0-0,2)
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	0,0 (0,0-2,9)	1324,1 (583,4-3268,5)*	0,0 (0,0-0,0)	1935,2 (1393,4-2847,2)*	0,0 (0,0-0,0)	479,8 (399,5-1525,5)*
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	4,9 (0,1-10,5)	555,0 (162,0-813,0)*	0,4 (0,0-8,4)	977,0 (789,3-1238,5)*.***	0,0 (0,0-12,2)	674,0 (560,5-926,0)*

Примечание. \*  $p < 0,05$  по сравнению МИ способа культивирования со спонтанным внутри каждой группы, \*\* – по сравнению больных без АИТ и после АИТ с группой доноров (спонтанный способ культивирования), \*\*\* – по сравнению больных без АИТ и после АИТ с группой доноров (МИ способ культивирования).

Note \*  $p < 0.05$  compared to MI with spontaneous cultivation within each group; \*\*, compared to patients without AIT and after AIT with a donor group (spontaneous cultivation); \*\*\*, compared to patients without AIT and after AIT with a group donors (MI method of cultivation).

тельной среде с добавлением IL-2 «Биотех» и IL-15 “Cloud-Clone Corp.”. Курс АИТ состоял из 10 внутрикожных инъекций ЦИК, инсулиновым шприцом паравертебрально в 2-4 точки. Курсы адоптивной иммунотерапии проводились в рамках выполнения Госзадания и научных протоколов МРНЦ им. А.Ф. Цыба, одобренных этическим комитетом Центра. Каждый больной подписывал информированное согласие на проведение АИТ.

#### Статистический анализ результатов

Анализ проводили с помощью программы Microsoft Excel 2007, данные представлены как медиана (Me) и диапазон квартильных отклонений ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ). Достоверности различий продукции цитокинов клетками доноров, онкологических больных получивших и не получивших АИТ после спонтанной и МИ активации оценивали по U-критерию Манна–Уитни. Отличия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты

### Влияние IL-2, IL-12, IL-15 на продукцию цитокинов лимфоцитами крови онкологических больных

Жизнеспособность ЦИК-клеток онкологических больных, при выращивании в различных условиях (среда 1 и среда 2) была достаточно высокой (92,0%) и не отличалась от условий культивирования. Ко 2 дню ЦИК начинали прилипать к пластику, и образовывать скопления клеток. На 2-3-и сутки постепенно начинали увеличиваться в размерах и сохраняли морфологию больших гранулярных лимфоцитов на протяжении всего периода выращивания. К 7-10-му дню отмечалась пролиферация лимфоцитов в 1,5-2 раза и их отлипание от поверхности культурального пластика, что указывает на окончание активации клеток *in vitro*, как показано нами ранее [1].

При активации ЦИК больных в среде 1 показано, что на 7-е сутки относительно 3-х суток значимо ( $p < 0,05$ ) увеличивалось содержание IL-4 и TNF $\alpha$  в супернатантах (табл. 2). Парал-

тельно с увеличением IL-4 и TNF $\alpha$  в супернатантах установлено увеличение концентрации IL-6 в 4 раза, и IFN $\gamma$  в 14 раз, однако различия не были достоверными ( $p > 0,05$ ).

При активации клеток больных в среде 2 показано, что на 7-е сутки относительно 3-х суток значимо ( $p < 0,05$ ) увеличивалось содержание цитокинов: IL-4 и IFN $\gamma$ , в супернатантах. Отмечается увеличение TNF $\alpha$  в 3 раза, однако различия не были достоверными (табл. 2). IFN $\alpha$  выявлен в следовых количествах на 3-и и 7-е сутки при разных условиях культивирования.

При сравнении продукции цитокинов в зависимости от условий инкубации установлен ряд отличий. На 3-и сутки клетки больных в среде 1, продуцировали значимо меньшие, чем в среде 2, концентрации IL-10 – в среднем в 2,5 раза ( $p < 0,05$ ); и IL-6 – в 3,6 раза, IFN $\gamma$  – 9,2 раза и TNF $\alpha$  – в 2,3 раза, однако данные различия не были достоверными (табл. 1). На 7-е сутки клетки больных, культивируемые в среде 1, продуцировали практически такие же концентрации цитокинов, что и в среде 2, но значимо меньшие концентрации IFN $\gamma$  ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, обе модели культивирования приемлемы для получения ЦИК-клеток. Стимуляция IL-12 и IL-15 одинаково влияет на продукцию НК-клетками TNF $\alpha$ , и Т-хелперами IL-2 и IL-4 и не влияет на продукцию IFN $\alpha$ . IL-12 *in vitro* в меньшей степени способствует продукции IL-10, который обычно вырабатывается при активации Т-регуляторных клеток. Однако IL-15 *in vitro* способствует более ранней активации цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-хелперов и НК-клеток, которые продуцируют провоспалительный цитокин – IL-6 и противоопухолевый – IFN $\gamma$ .

#### **Продукция цитокинов клетками крови здоровых доноров и онкологических больных без проведения АИТ и после АИТ при спонтанном и МИ способе культивирования**

При стимулировании клеток цельной крови митогеном во всех группах, включая контрольную, отмечается выраженный рост продукции цитокинов ( $p < 0,05$ ): IL-2, IL-4, IL-6 и IL-10, IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ , относительно спонтанного способа культивирования (табл. 3). Продукция IFN $\alpha$  определяется в следовых количествах во всех группах при спонтанном и МИ культивировании.

При митоген-индуцированном способе культивирования установлено, что у онкологических больных обеих групп в сравнении с донорами отмечается схожая тенденция к снижению уровня IL-2 в 2 раза ( $p < 0,05$ ) и повышению уровней IL-6 ( $p < 0,05$  в группе АИТ+) и TNF $\alpha$  ( $p < 0,05$  в группе АИТ+). При сопоставлении групп АИТ+ и АИТ- установлено значительное повышение

уровней IL-6, IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ , а также некоторое снижение уровня IL-10 в группе АИТ+.

## **Обсуждение**

Основными продуцентами IL-4 являются Th2-лимфоциты и НК-клетки, кроме того IL-4 является сильным ростовым фактором для В-лимфоцитов, способен повышать экспрессию антигенов HLA-I и HLA-II, усиливать пролиферацию Т-лимфоцитов. TNF $\alpha$  образуется естественными киллерами, воздействует на опухолевые клетки в условиях *in vivo* за счет апоптоза, генерации активных форм кислорода и окиси азота, участвует в развитии иммунного ответа, обуславливая пролиферацию В- и Т-лимфоцитов и препятствует возникновению иммунологической толерантности [3, 4, 13]. IL-6 является мощным провоспалительным цитокином, обладающий широким спектром биологических воздействий, продуцируется Т-хелперами, НК-клетками, стимулирует пролиферацию и дифференцировку В-клеток, может подавлять апоптоз нейтрофилов, обладающих цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток, а также усиливает образование ЛАК-клеток (лимфокин-активированные киллеры) под влиянием IL-2 и НК-клеток (под действием IFN $\gamma$ ). IFN $\gamma$  обладает тумороцидной и противовирусной активностью, стимулирует активность В-лимфоцитов, НК-клеток, пролиферацию и дифференцировку цитотоксических Т-лимфоцитов [3, 4, 13]. IFN $\alpha$  вырабатывается лейкоцитами, являясь медиатором межклеточных взаимодействий, обладает антипролиферативным эффектом [14]. Увеличение концентрации данного цитокина будет негативно сказываться на пролиферативной активности лимфоцитов. Показано, что в данных моделях клеточной активации продукция IFN $\alpha$  присутствует в следовых количествах.

Для получения ЦИК, для последующей АИТ, было предложено и изучено две модели активации клеток *in vitro* с цитокинами: IL-2/IL-12 и с IL-2/IL-15. Проведен сравнительный анализ цитокинопродукции культивируемых клеток методом ИФА в супернатантах на 3-и и 7-е сутки. Показано, что стимуляция IL-12 и IL-15 одинаково влияет на продукцию НК-клетками TNF $\alpha$ , Т-хелперами IL-2 и IL-4, и не влияет на продукцию IFN $\alpha$ . Модель культивирования с IL-12 в меньшей степени способствует продукции IL-10, который вырабатывается в основном при активации Т-регуляторных клеток. Однако IL-15 в отличие от IL-12 в условиях *in vitro* способствует более ранней продукции IFN $\gamma$  и IL-6, что может указывать на более раннюю активацию данных клеток *in vitro* с IL-15. Таким образом, обе модели культивирования приемлемы для получения

ЦИК, но для более ранней активации клеток *in vitro* необходимо применять именно ИЛ-15, что позволит проводить клеточную АИТ уже после 3 суток от забора крови и начала культивирования.

Установлено, что клетки периферической крови онкологических больных, получающих АИТ на протяжении года и более, обладают большей способностью реагировать на стимуляцию митогеном, в отличие от больных, которым АИТ никогда не проводили, а так же относительно группы доноров, иммунная система которых также не подвергалась стимуляции. На основании того, что ИЛ-6, IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  продуцируются активированными цитотоксическими лимфоцитами и НК-клетками [3, 4, 13], можно предположить, что в организме пациента под действием АИТ в течение года в непрерывном режиме происходит активация противоопухолевого иммунитета, посредством пролиферации цитотоксических

лимфоцитов и НК-клеток, и подавления иммуносупрессии. Что говорит о возрастании физиологического резерва активности клеток пациентов, группы АИТ+, в сравнении с донорами и больными группы АИТ-. Данный факт вероятнее всего можно объяснить тем, что при введении активированных *in vitro* ЦИК в организме пациента запускается ряд каскадных реакций межклеточного взаимодействия, приводящих к активации клеток иммунной системы пациента, а именно противоопухолевого иммунитета, пролиферации цитотоксических лимфоцитов и НК-клеток, и подавления иммуносупрессии *in vivo*.

Разработанный способ получения ЦИК может быть рекомендован для проведения клеточной АИТ онкологическим больным, как новый подход к активации клеток иммунной системы больного *in vivo*.

## Список литературы / References

1. Абакушина Е.В., Маризина Ю.В., Каприн А.Д. Морфофункциональная характеристика лимфоцитов человека после активации *in vitro* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2016. Т. 161, № 5. С. 678-683. [Abakushina E.V., Marizina Yu.V., Kaprin A.D. Morphofunctional characteristics of human lymphocytes after *in vitro* activation. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2016. Vol. 161, no. 5, pp. 731-735. (In Russ.)]
2. Волков Н.М. Иммуноterapia рака // Практическая онкология, 2018. Т. 19, № 1. С. 38-45. [Volkov N.M. Cancer immunotherapy. *Prakticheskaya onkologiya = Practical Oncology*, 2018, Vol. 19, no. 1, pp. 38-45. (In Russ.)]
3. Ешмолов С.Н., Ситников И.Г., Мельникова И.М. Цитокины ФНО- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ , ИЛ-1, ИЛ-4, ИЛ-8 и их роль в иммунном ответе при инфекционном поражении ЦНС у детей // Детские инфекции, 2018. Т. 17, № 1. С. 17-22. [Eshmolov S.N., Sitnikov I.G., Melnikova I.M. The role of cytokines TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-4, IL-8 in the immune response in infectious lesions of CNS in children. *Detskije infektsii = Children's Infections*, 2018, Vol. 17, no. 1, pp. 17-22. (In Russ.)]
4. Симбирцев А.С. Иммунофармакологические аспекты системы цитокинов // Бюллетень сибирской медицины, 2019. Т. 18, № 1. С. 84-95. [Simbirtsev A.S. Immunopharmacological aspects of the cytokine system. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2019, Vol. 18, no. 1, pp. 84-95. (In Russ.)]
5. Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Тодосенко Н.М., Литвинова Л.С. Эффекты  $\gamma$ с-цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-7 и ИЛ-15) на созревание и дифференцировку CD45RO $^+$ CD4 $^+$ /CD8 $^+$ T-лимфоцитов *in vitro* // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 1. С. 45-52. [Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Todosenko N.M., Litvinova L.S. Effects of  $\gamma$ c-cytokines (IL-2, IL-7 and IL-15) upon *in vitro* maturation and differentiation of CD4 $^+$ CD45RO $^+$ /CD8 $^+$ CD45RO $^+$  T cells. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018. Vol. 20, no. 1, pp. 45-52. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-45-52.
6. Abakushina E.V., Gelm Yu.V., Pasova I.A., Bazhin A.V. Immunotherapeutic approaches for the treatment of colorectal cancer. *Biochemistry*, 2019, Vol. 84, no. 7, pp. 720-728.
7. Chodon T., Comin-Anduix B., Chmielowski B. Adoptive transfer of MART-1 T-cell receptor transgenic lymphocytes and dendritic cell vaccination in patients with metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res.*, 2014, Vol. 20, no. 9, pp. 2457-2465.
8. Dahlberg C.I., Sarhan D., Chrobok M. Natural killer cell-based therapies targeting cancer: possible strategies to gain and sustain anti-tumor activity. *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 30, no. 6, 605. doi: 10.3389/fimmu.2015.00605.
9. Forget M.A., Malu S., Liu H. Activation and propagation of tumor-infiltrating lymphocytes on clinical-grade designer artificial antigen-presenting cells for adoptive immunotherapy of melanoma. *Immunotherapy*, 2014, Vol. 9, no. 37, pp. 448-460.
10. Gel'm Yu.V., Kuz'mina E.G., Abakushina E.V. Functional activity of lymphocytes of healthy donors and cancer patients after culturing with IL-2 and IL-15. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2019, Vol. 167, no. 4, pp. 486-491.
11. Granzin M., Wagner J., Kohl U. Shaping of natural killer cell antitumor activity by *ex vivo* cultivation. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 458. doi:10.3389/fimmu.2017.00458.
12. Grivtsova L.Yu. Receptor repertoire of NK-cells as a molecular basis of alloreactivity (literature review). *Hematopoiesis Immunol.*, 2018, Vol. 16, no. 1, pp. 62-108.

13. Waldmann T.A. Cytokines in cancer immunotherapy. *Cold Spring Harb. Perspect Biol.*, 2018, Vol. 10, no. 12, a028472. doi: 10.1101/cshperspect.a028472.

14. Zhen Y.H., Liu X.H., Yang Y. Phase I/II study of adjuvant immunotherapy with sentinel lymph node T lymphocytes in patients with colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2015, Vol. 64, no. 9, pp. 1083-1093.

15. Zhou J. Advances and prospects in cancer immunotherapy. *New J. Sci.*, 2014, no. 1, pp. 1-13, 745808. doi: 10.1155/2014/745808.

---

**Авторы:**

**Гельм Ю.В.** — научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии, Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская обл., Россия

**Абакушина Е.В.** — д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии, Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская обл., Россия

**Пасова И.А.** — врач аллерголог-иммунолог отделения лабораторной медицины, Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская обл., Россия

**Гривцова Л.Ю.** — д.б.н., заведующая отделением лабораторной медицины, Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская обл., Россия

**Authors:**

**Gelm Yu.V.**, Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Branch of National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

**Abakushina E.V.**, PhD, MD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Branch of National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

**Pasova I.A.**, Clinical Allergist-Immunologist, Department of Laboratory Medicine, A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Branch of National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

**Grivtsova L.Yu.**, PhD, MD (Biology), Head, Department of Laboratory Medicine, A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Branch of National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

## **МЕЛАТОНИН В СОСТАВЕ ДЕРМАЛЬНОЙ ПЛЕНКИ ОГРАНИЧИВАЕТ ГИБЕЛЬ ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ**

**Осиков М.В., Симонян Е.В., Агеева А.А., Агеев Ю.И.**

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства  
здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Резюме.** Данные Всемирной организации здравоохранения показывают, что каждый год около 11 млн человек испытывают потребность в получении медицинской помощи после ожогов. В общей структуре ожогов доля термической травмы (ТТ) составляет 80%. Лимфоцитопения при ТТ – фактор риска инфекционных осложнений и ограничения репарации, а разработка новых средств терапии ТТ с использованием дермальных пленок востребована в современной комбустиологии. Цель исследования – провести оценку изменения показателей лимфоцитов крови – количественного состава и их гибели при экспериментальном термическом повреждении в условиях применения оригинальной дермальной пленки с мелатонином (МТ) – достигнута на 49 крысах линии Wistar. ТТ IIIA степени и площадью 3,5% моделировалась путем контакта с кипящей водой в течение 12 с. Дермальные пленки на основе натрия карбоксиметилцеллюлозы с МТ в концентрации 0,005 г/г применяли ежедневно в течение 5 суток. В крови оценивалось общее количество лимфоцитов, количество CD45RA<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>, количество лимфоцитов с признаками частичного некроза, раннего и позднего апоптоза. Рассчитывали относительное уменьшение площади и скорость эпителизации ожоговой раны. При ТТ на 5-е, 10-е и 20-е сутки в крови количество лимфоцитов уменьшается, включая CD45RA<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>, количество лимфоцитов с признаками некроза, позднего и раннего апоптоза увеличивается. Площадь ожоговой раны к 20-м суткам уменьшается на 11,5%. Применение дермальных пленок с МТ увеличивает в крови на 5-е и 10-е сутки количество CD3<sup>+</sup>, на 5-е, 10-е и 20-е сутки – CD45RA<sup>+</sup>, вызывает снижение количества лимфоцитов с признаками раннего апоптоза на 5-е, 10-е и 20-е сутки, также с признаками некроза и позднего апоптоза – на 5-е сутки ТТ, ускоряет заживление ожоговой раны на 5-е, 10-е и 20-е сутки ТТ с уменьшением ее площади на 20-е сутки на 20%. Скорость эпителизации ожоговой раны в условиях применения дермальной пленки с МТ на 5-е, 10-е и 20-е сутки увеличивается по мере увеличения в крови количества CD3<sup>+</sup> и снижения количества лимфоцитов с признаками раннего апоптоза.

*Ключевые слова:* мелатонин, дермальная пленка, термическая травма, лимфоциты, апоптоз, некроз

### **Адрес для переписки:**

Осиков Михаил Владимирович  
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный  
медицинский университет» Министерства  
здравоохранения РФ  
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.  
Тел.: 8 (919) 122-37-99.  
Факс: 8 (351) 260-77-55.  
E-mail: prof.osikov@yandex.ru

### **Address for correspondence:**

Osikov Mikhail V.  
South Ural State Medical University  
454092, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovskogo str., 64.  
Phone: 7 (919) 122-37-99.  
Fax: 7 (351) 260-77-55.  
E-mail: prof.osikov@yandex.ru

### **Образец цитирования:**

М.В. Осиков, Е.В. Симонян, А.А. Агеева,  
Ю.И. Агеев «Мелатонин в составе дермальной  
пленки ограничивает гибель лимфоцитов в крови  
при экспериментальной термической травме» //  
Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 2. С. 389-394.  
doi: 10.15789/1563-0625-MIT-2158

© Осиков М.В. и соавт., 2021

### **For citation:**

M.V. Osikov, E.V. Simonyan, A.A. Ageeva, Yu.I. Ageev  
“Melatonin in the dermal film limits the blood lymphocyte  
death in experimental thermal trauma”, Medical Immunology  
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 2,  
pp. 389-394. doi: 10.15789/1563-0625-MIT-2158

DOI: 10.15789/1563-0625-MIT-2158

## MELATONIN IN THE DERMAL FILM LIMITS THE BLOOD LYMPHOCYTE DEATH IN EXPERIMENTAL THERMAL TRAUMA

Osikov M.V., **Simonyan E.V.**, Ageeva A.A., Ageev Yu.I.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Abstract.** According to WHO data, about 11 million people need medical care after burns every year. In the overall structure of burns, the share of thermal trauma (TT) is 80%. Lymphocytopenia in TT is a risk factor for infectious complications and limited repair, and the development of new tools for TT therapy using dermal films is demanded in combustiology. The aim of the study was to evaluate changes in blood lymphocyte parameters, i.e., quantitative composition and their death during experimental thermal damage under the influence of the originally developed dermal film with melatonin (MT) in 49 inbred rats. The grade IIIA TT of 3.5% body surface was modeled by contact with boiling water for 12 s. Dermal films based on sodium carboxymethylcellulose supplemented with MT at a concentration of 0.005 g/g were applied daily for 5 days. The total numbers of lymphocytes, CD45RA<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> cells, counts of lymphocytes with signs of partial necrosis, early and late apoptosis were assessed in blood. Relative decrease in the area and rate of the burn wound epithelization were also calculated. In animals with TT, the number of blood lymphocytes decreased on days 5, 10 and 20, including CD45RA<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>, along with increased amounts of lymphocytes with signs of necrosis, late and early apoptosis. By the term of 20 days, the burn wound area was reduced by 11.5%. Usage of dermal films with MT increased the amount of CD3<sup>+</sup> cells in blood on days 5 and 10, CD45RA<sup>+</sup> on days 5, 10 and 20, being associated with decreased number of lymphocytes showing signs of early apoptosis on days 5, 10 and 20, as well as features of necrosis and late apoptosis on days 5 following TT, accelerates the healing of a burn wound on days 5, 10 and 20 after TT. with a 20 cent reduction of its area by the day 20. Epithelization rate of the burn wound when applying MT-supplemented dermal film on days 5, 10 and 20 increases, along with higher amounts of CD3<sup>+</sup> in the blood, and reduced counts of lymphocytes with signs of early apoptosis.

*Keywords:* melatonin, dermal film, thermal trauma, lymphocytes, apoptosis, necrosis

### Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно около 11 млн человек испытывают потребность в получении медицинской помощи после ожогов. В общей структуре ожогов около 80% — доля термической травмы (ТТ). У 65% больных площадь ожога составляет менее 1/10 поверхности тела. Наиболее распространенные причины ТТ — пламя и горячая жидкость. До 70% осложнений ТТ связаны с инфекцией и сепсисом, обусловлены избыточными иммуносупрессивными реакциями, лимфоцитопенией, одним из механизмов которой может выступать активация гибели лимфоцитов в крови [8, 13, 15]. Сохраняется необходимость в совершенствовании и разработке новых методов терапии ТТ, особое внимание при поиске уделяется эндогенным регуляторам гомеостаза, в частности мелатонину (МТ) — производному триптофана с плейотропными эффектами [1, 2, 5]. Кератиноциты, меланоциты, дермальные фибробласты, лимфоциты, фагоциты синтезируют МТ и экспрессируют его рецепторы [12, 14]. Продемонстрировано антиоксидантное действие МТ, про- и противовоспалительное, иммуномодулирующее, антиапоптогенное, регулирующее пролиферацию и дифференцировку клеток, что является предпо-

сылкой его применения при ТТ [6]. Эффективность системного введения МТ ограничена низкой биодоступностью, разрушением в печени, ограничением очага ТТ от системного кровотока, поэтому предпочтение должно отдаваться его локальным формам [13]. Трансдермальный путь доставки лекарств при ТТ ограниченной площади — один из самых успешных и перспективных [7]. В доступной литературе сведения о локальном использовании МТ в составе дермальных пленок (ДП) при ТТ отсутствуют. **Цель** — оценить изменения количественного состава и гибели лимфоцитов крови в динамике экспериментального термического повреждения кожи в условиях применения оригинальной дермальной пленки с мелатонином.

### Материалы и методы

Проведено экспериментальное исследование на 49 крысах-самцах линии Wistar половозрелых самцах, массой тела 200-220 г, которые содержались в экспериментально-биологической клинике (виварий) ЮУГМУ, в стандартных условиях, с соблюдением норм гуманного отношения к животным, выведение животных из опыта и эвтаназия выполнялись согласно общепринятым методическим рекомендациям.

Дизайн исследования – 49 животных разделены случайным образом на 3 группы: 1-я группа ( $n = 7$ ) – интактный контроль; 2-я группа ( $n = 21$ ) – животные с ТТ с ежедневным наложением на ожоговую поверхность асептической повязки; 3-я группа ( $n = 21$ ) – ТТ с наложением на область ожоговой поверхности ДП с МТ. Для воспроизведения ТТ IIIA степени участок кожи между лопаток погружали в воду с температурой 97–99 °С на 12 с. Для верификации глубины ожога использовали морфологические методы. Для анестезии животных применяли препарат “Zoletil-100” (тилетамин, золазепам) (Virbac Sante Animale, Франция) в дозе 0,02 г/кг. В группе 3 сразу после ТТ на область ожога наносили ДП, фиксируя асептической повязкой, ДП применяли в течение 5 суток. Контроль за животными и перевязку в группах 2 и 3 осуществляли ежедневно. В предварительных исследованиях разработан специальный состав ДП на основе натрия карбоксиметилцеллюлозы, в состав которой включен МТ в концентрации 0,005 г/г (0,03 г на 1 ДП массой 6 г), проведены фармацевтико-технологические испытания в соответствии с ОФС.1.4.1.0035.18 (заявка на изобретение №2020118766 от 29.05.2020 г.). Общее количество лимфоцитов в крови определяли на анализаторе “BC-2800 Vet” (Mindray, Китай). Анализ субпопуляционного спектра лимфоцитов после выделения их из крови проводили на проточном цитофлуориметре “Navios” (Beckman Coulter, США) с применением специфических моноклональных (крысиных) антител с фенотипом CD45RA<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup> (Cloud-Clone Corp., Китай), которые являются у крыс маркерами преимущественно В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов соответственно [17]. Проводили окраску 7-аминоактиномицином D (7-AAD) и связанным с флуорохромом аннексином-5 (Annexin-5-FITC) (Cloud-Clone Corp., Китай) для оценки гибели лимфоцитов с дифференцировкой интактных клеток (Annexin-5-FITC-/7-AAD-), клеток с маркерами апоптоза и частичного некроза (Annexin-5-FITC+/7-AAD+), с ранними маркерами апоптоза (Annexin-5-FITC+/7-AAD-). Измеряли площадь ожоговой раны методом цифровой планиметрии и стандартного пакета программы “Microsoft Office Visio” (Microsoft, США), рассчитывали относительное уменьшение площади и скорость эпителизации. Для статистической обработки применяли программное обеспечение “IBM.SPSS.Statistics v. 23” (IBM, США). Показатели представлены в виде медианы (Me), нижнего ( $Q_{0,25}$ ) и верхнего ( $Q_{0,75}$ ) квартилей. Критерии Вальда–Вольфовитца, Манна–Уитни, Краскела–Уоллиса использовались с целью оценки значимости различий между группами, коэффици-

ент корреляции Спирмена (R) – для выявления связи между изучаемыми параметрами. Финансирование – исследование выполнено при финансовой поддержке ФГБУ «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере» по программе У.М.Н.И.К. (договор № 15583ГУ/2020 от 05.07.2020 г.), РФФИ и Челябинской области (проект № 20-415-740016).

## Результаты и обсуждение

Результаты оценки количественного состава лимфоцитов в крови и экспрессии маркеров их гибели представлены в таблице 1. Общее количество лимфоцитов в крови снижается на 5-е и 10-е сутки, при этом отличий от группы интактных животных на 20-е сутки ТТ нет. Количество CD45RA<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup> уменьшается на 5-е, 10-е и 20-е сутки ТТ в сравнении с группой интактных животных. В динамике при ТТ общее количество лимфоцитов статистически значимо ( $p < 0,05$ ) меньше на 10-е сутки, чем на 5-е сутки. Общее количество лимфоцитов, количество CD3<sup>+</sup> на 20-е сутки больше ( $p < 0,05$ ) в сравнении с 10-ми сутками. При ТТ количество клеток с маркерами некроза и апоптоза (ранними и поздними) на 5-е, 10-е и 20-е сутки значимо увеличивается по сравнению с группой интактных животных. Как следствие снижается количество интактных лимфоцитов. В динамике при ТТ отмечается увеличение ( $p < 0,05$ ) на 10-е и 20-е сутки относительно 5-х суток количества клеток с признаками некроза и апоптоза (ранними и поздними). На 10-е сутки отмечается минимальное количество лимфоцитов в крови, а на 5-е сутки ТТ – максимальное содержание лимфоцитов с маркерами апоптоза и некроза. В динамике ТТ площадь ожога сокращается, ее относительное уменьшение, а также скорость эпителизации ожоговой раны на 10-е сутки значимо выше, чем на 5-е сутки, а на 20-е сутки выше, чем на 5-е и 10-е сутки ТТ (табл. 2). Указанные изменения количественного состава лимфоцитов, показателей гибели лимфоцитов в крови и их предполагаемые механизмы описаны нами ранее при экспериментальной ТТ [3, 4].

Использование МТ в составе ДП при экспериментальной ТТ приводит к изменению количественного состава лимфоцитов в крови (табл. 1). На всех сроках наблюдения общее количество лимфоцитов увеличивается и на 5-е и 10-е сутки не отличается от показателей интактных животных. На 5-е и 10-е сутки в крови увеличивается количество CD3<sup>+</sup>, а также увеличивается количество CD45RA<sup>+</sup> на 5-е, 10-е и 20-е сутки ТТ. Количество CD3<sup>+</sup> достигает уровня интактных животных только на 20-е сутки, а количество CD45RA<sup>+</sup> на всех сроках ТТ ниже, чем в группе интактных животных. Полученные данные дают

ТАБЛИЦА 1. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ПРИ ТТ, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

TABLE 1. QUANTITATIVE COMPOSITION OF BLOOD LYMPHOCYTES IN TT, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

Показатели, 10 <sup>9</sup> /л Indicators, 10 <sup>9</sup> /l	Группа 1 Group 1 (n = 7)	Группа 2 Group 2			Группа 3 Group 3		
		5-е сутки 5 <sup>th</sup> day (n = 7)	10-е сутки 10 <sup>th</sup> day (n = 7)	20-е сутки 20 <sup>th</sup> day (n = 7)	5-е сутки 5 <sup>th</sup> day (n = 7)	10-е сутки 10 <sup>th</sup> day (n = 7)	20-е сутки 10 <sup>th</sup> day (n = 7)
Лимфоциты Lymphocytes	3,02 (1,93-3,49)	2,60 (1,63-3,17)*	2,21 (1,18-2,93)*	2,82 (2,04-3,92)	2,94 (2,68-3,81)#	3,32 (2,87-3,56)#	2,88 (1,99-3,35)
CD3 <sup>+</sup>	1,843 (1,707-2,618)	1,188 (0,895-1,841)*	1,115 (0,726-1,610)*	1,436 (1,201-2,260)*	1,415 (1,003-2,134)* #	1,383 (0,851-2,628)* #	1,617 (1,434-2,404)
CD45RA <sup>+</sup>	0,410 (0,270-0,065)	0,144 (0,110-0,297)*	0,174 (0,143-0,329)*	0,151 (0,097-0,246)*	0,259 (0,237-0,353)* #	0,282 (0,122-0,502)* #	0,272 (0,234-0,335)* #
Annexin-5-FITC-/ 7-AAD-	2,710 (1,630-2,787)	1,569 (0,945-3,371)*	1,277 (1,682-2,332)*	1,681 (1,085-2,963)*	2,586 (2,339-3,251)#	2,896 (2,248-4,512)#	2,253 (1,672-3,151)#
Annexin-5-FITC+/ 7-AAD-	0,419 (0,224-0,578)	1,516 (0,869-3,281)*	0,578 (0,318-0,791)*	0,645 (0,271-1,078)*	0,382 (0,303-1,339) #	0,409 (0,245-0,542)#	0,375 (0,215-0,663)#
Annexin-5-FITC+/ 7-AAD+	0,002 (0,000-0,027)	0,064 (0,032-0,135)*	0,006 (0,002-0,016)*	0,007 (0,003-0,033)*	0,007 (0,005-0,210)* #	0,004 (0,002-0,012)	0,003 (0,001-0,007)

Примечание. \* – значимые (p < 0,01) различия с группой 1, # – с группой 2.

Note. \*, significant (p < 0.01) differences with group 1; #, with group 2.

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ РЕПАРАЦИИ ПРИ ТТ, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

TABLE 2. TT REPAIR RATES, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

Показатели Indicators	Группа 2 Group 2			Группа 3 Group 3		
	5-е сутки 5 <sup>th</sup> day (n = 7)	10-е сутки 10 <sup>th</sup> day (n = 7)	20-е сутки 20 <sup>th</sup> day (n = 7)	5-е сутки 5 <sup>th</sup> day (n = 7)	10-е сутки 10 <sup>th</sup> day (n = 7)	20-е сутки 20 <sup>th</sup> day (n = 7)
Уменьшение площади ожоговой раны, % Reduction of the burn wound area, %	2,61 (2,58-2,65)	3,68 (3,53-4,24)*	11,49 (11,43-11,65)* **	9,8 (9,64-10,13)#	16,1 (14,62-17,87)#	19,98 (19,2-20,4)#
Скорость эпителизации, %/сутки Epithelialization rate, %/day	0,89 (0,86-0,89)	1,90 (1,88-1,95)*	2,26 (2,10-2,59)* **	1,33 (1,28-1,35)#	6,57 (5,89-6,97)#	14,3 (13,17-15,40)#

Примечание. \* – значимые (p < 0,01) различия с группой 2 на 5-е сутки, \*\* – с группой 2 на 10-е сутки, # – между группами 2 и 3 на соответствующие сутки.

Note. \*, significant (p < 0.01) differences with group 2 on 5<sup>th</sup> day; \*\*, with group 2 on 10<sup>th</sup> day; #, with groups 2 and 3 on relevant day.

возможность говорить о частичном восстановлении количества CD45RA<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup> в крови при ТТ в условиях применения дермальной пленки с МТ. Полагаем, что ограничение гибели клеток путем некроза и апоптоза является одним из механизмов изменения количества лимфоцитов в крови при ТТ под влиянием локального применения МТ. Установлено, что на 5-е, 10-е и 20-е сутки ТТ значительно снижается количество лимфоцитов с ранними признаками апоптоза, на 5-е сутки ТТ снижается количество клеток с поздними признаками апоптоза, признаками некроза, и, как следствие, на 5-е, 10-е и 20-е сутки ТТ количество

интактных лимфоцитов в крови увеличивается (табл. 1). В условиях применения МТ при ТТ на 5-е, 10-е и 20-е сутки наблюдается значимое снижение площади и увеличение скорости эпителизации ожоговой раны с максимальной выраженностью эффекта на 20-е сутки ТТ, когда скорость эпителизации возростала в 6,3 раза, а площадь ожоговой раны уменьшалась на 64% по сравнению с группой ТТ без применения МТ (табл. 2).

Полагают, что при ТТ снижение количества лимфоцитов в крови, в том числе, связано с активацией их гибели в условиях увеличения продукции TNF $\alpha$ , повышения активности каспаз,

цитохрома с, снижения мембранного потенциала митохондрий [11]. Снижение количества лимфоцитов в крови и очаге ТТ ограничивает их участие в репарации раны благодаря секреции факторов роста, ограничению сосудисто-экссудативных реакций, активации ангиогенеза и др. реакций. Защитное действие МТ в очаге ТТ может быть реализовано за счет прямого и опосредованного антиоксидантного действия: поглощения АФК, стимуляции синтеза глутатиона, активации глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, СОД, каталазы, гемоксидазы-1, снижения активности eNOS, регуляции митохондриального гомеостаза, увеличения продукции АТФ, а не АФК [16]. Противовоспалительное действие МТ связывают с сиртуин-1-опосредованным ограничением NF-κB-зависимых и NLRP3-зависимых путей внутриклеточной сигнализации [10]. Антиапоптогенный эффект МТ реализуется за счет снижения выхода цитохрома с из митохондрий, активации каспаз 9, 3 и 7, увеличения экспрессии p53 [9]. Описанные механизмы приводят к ограничению под влиянием МТ зоны вторичной альтерации при ТТ, снижению продукции в очаге повреждения аутокоидов, в том числе проапоптогенного действия, их выделения в системный кровоток и воздействия на циркулирующие лимфоциты. Ограничение деструктивных процессов в очаге ТТ, увеличение количества лимфоцитов в кровотоке и, как следствие, в очаге ТТ и их участия в регуляции репарации приводит к ускорению заживления ожоговой раны. Установлена корреляция между скоростью эпителизации ожо-

говой раны и количеством в крови CD3<sup>+</sup> (на 5-е и 10-е сутки R = 0,67, R = 0,67; p < 0,05; на 20-е сутки R = 0,54; p < 0,05), количеством лимфоцитов с признаками раннего апоптоза (на 5-е сутки R = -0,74; p < 0,05; на 10-е сутки R = -0,51; p < 0,05; на 20-е сутки R = -0,37; p > 0,05).

## Выводы

1. Показано, что на 5-е, 10-е и 20-е сутки экспериментальной ТТ снижается в крови количество лимфоцитов, в том числе CD45RA<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>, увеличивается количество лимфоцитов с признаками некроза, раннего и позднего апоптоза. Площадь ожоговой раны к 20-м суткам после ТТ уменьшается на 11,5%.

2. Ежедневное в течение 5 суток применение МТ в составе оригинальной ДП при ТТ приводит к снижению в крови количества лимфоцитов с признаками некроза и позднего апоптоза на 5-е сутки, признаками раннего апоптоза – на 5-е, 10-е и 20-е сутки. Применение МТ в составе ДП при ТТ сопровождается увеличением в крови на 5-е, 10-е и 20-е сутки количества CD45RA<sup>+</sup>, на 5-е и 10-е сутки – ТТ количества клеток CD3<sup>+</sup>, ускорением заживления ожоговой раны на 5-е, 10-е и 20-е сутки ТТ с уменьшением площади ожоговой раны на 20-е сутки на 20%.

3. При экспериментальной ТТ в условиях применения МТ в составе ДП скорость эпителизации ожоговой раны на 5-е, 10-е и 20-е сутки нарастает по мере увеличения в крови количества CD3<sup>+</sup> и снижения количества в крови лимфоцитов с признаками раннего апоптоза.

## Список литературы / References

1. Осиков М.В. Роль орозомукоида в регуляции активности систем плазменного протеолиза при экспериментальной почечной недостаточности // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2009. Т. 148, № 7. С. 27-30. [Osikov M.V. The role of orosomucoid in the regulation of the activity of plasma proteolysis systems in experimental renal failure. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2009, Vol. 148, no. 7, pp. 27-30. (In Russ.)]
2. Осиков М.В., Гизингер О.А., Огнева О.И. Механизм влияния мелатонина на иммунный статус при экспериментальном десинхронозе в условиях светодиодного освещения // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 6. С. 517-524. [Osikov M.V., Gizinger O.A., Ogneva O.I. Mechanisms of melatonin effects upon immune state in experimental desynchronoses produced under the led illumination conditions. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 6, pp. 517-524. (In Russ.)]
3. Осиков М.В., Симонян Е.В., Саедгалина О.Т., Бивалькевич В.А. Влияние локального применения эритропоэтина на показатели гибели лимфоцитов в крови в динамике экспериментальной термической травмы // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11 (20), № 2. С. 185-188. [Osikov M.V., Simonyan E.V., Saedgalina O.T., Bivalkevich V.A. The effect of local application of erythropoietin on death indicators of lymphocytes in the blood in the dynamics of experimental thermal injury. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11 (20), no. 2, pp. 185-188. (In Russ.)]
4. Осиков М.В., Симонян Е.В., Саедгалина О.Т., Федосов А.А. Механизм влияния эритропоэтина на количественный состав лимфоцитов в крови при экспериментальной термической травме // Современные проблемы науки и образования, 2016. № 2. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=24275> (дата обращения: 09.10.2020). [Osikov M.V., Simonyan E.V., Saedgalina O.T., Fedosov A.A. Mechanism of influence of erythropoietin on the quantitative composition of lymphocytes in the blood during experimental thermal trauma. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems*

of Science and Education, 2016, no. 2. [Electronic resource]. Access mode: URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=24275> (date of the application 09.10.2020).

5. Осиков М.В., Телешева Л.Ф., Агеев Ю.И. Влияние эритропоэтина на апоптоз лимфоцитов при экспериментальной хронической почечной недостаточности // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2015. Т. 159, № 3. С. 326-328. [Osikov M.V., Telesheva L.F., Ageev Yu.I. Effect of erythropoietin on lymphocyte apoptosis in experimental chronic renal failure. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2015, Vol. 159, no. 3, pp. 326-328. (In Russ.)]

6. Acuna-Castroviejo D., Noguiera-Navarro M.T., Reiter R.J., Escames G. Melatonin actions in the heart: more than a hormone. *Melaton. Res.*, 2018, Vol. 1, no. 1, pp. 21-26.

7. Alkilani A.Z., McCrudden M.T.C., Donnelly R.F. Transdermal drug delivery: innovative pharmaceutical developments based on disruption of the barrier properties of the stratum corneum. *Pharmaceutics*, 2015, Vol. 7, no. 4, pp. 438-470.

8. Duke J.M., Randall S.M., Wood F.M., Boyd J.H., Fear M.W. burns and long-term infectious disease morbidity: a population-based study. *Burns*, 2017, Vol. 43, no. 2, pp. 273-281.

9. Galano A., Tan D.X., Reiter R.J. Melatonin: a versatile protector against oxidative DNA damage. *Molecules*, 2018, Vol. 23, no. 3, pii: E530. doi: 10.3390/molecules23030530.

10. Hardeland R. Aging, melatonin, and the pro- and anti-inflammatory networks. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 5, pii: 1223. doi: 10.3390/ijms20051223.

11. Huang H., Cui Y., Tian Z. et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced protein 8-like 2 downregulation reduces CD4<sup>+</sup> T lymphocyte apoptosis in mice with thermal injury. *Med. Sci. Monit.*, 2019, Vol. 25, pp. 7547-7556.

12. Rusanova I., Martínez-Ruiz L., Florido J., Rodríguez-Santana C., Guerra-Librero A., Acuña-Castroviejo D., Escames G. Protective effects of melatonin on the skin: future perspectives. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 19, pii: E4948. doi: 10.3390/ijms20194948.

13. Kim A., Lang T., Xue M., Wijewardana A., Jackson C., Vandervord J. The Role of Th-17 Cells and  $\gamma\delta$  T-Cells in modulating the systemic inflammatory response to severe burn injury. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, Vol. 18, no. 4, pii: E758. doi: 10.3390/ijms18040758.

14. Markus R.P., Fernandes P.A., Kinker G.S., da Silveira Cruz-Machado S., Marçola M. Immune-pineal axis – acute inflammatory responses coordinate melatonin synthesis by pinealocytes and phagocytes. *Br. J. Pharmacol.*, 2018, Vol. 175, no. 16, pp. 3239-3250.

15. Munoz B., Suarez-Sanchez R., Hernandez-Hernandez O., Franco-Cendejas R., Cortes H., Magana J.J. From traditional biochemical signals to molecular markers for detection of sepsis after burn injuries. *Burns*, 2019, Vol. 45, pp. 16-31.

16. Reiter R.J., Rosales-Corral S., Tan D.X., Jou M.J., Galano A., Xu B. Melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant: one of evolution's best ideas. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2017, Vol. 74, pp. 3863-3881.

17. Ringheim G.E., Lee L., Laws-Ricker L., Delohery T. Teriflunomide attenuates immunopathological changes in the Dark Agouti rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Front. Neurol.*, 2013, Vol. 169, no. 4, pp. 1-12.

---

**Авторы:**

**Осиков М.В.** – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Симомян Е.В.** – к.фарм.н., доцент, заведующий кафедрой фармации и химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Агеева А.А.** – ассистент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Агеев Ю.И.** – к.м.н., старший преподаватель кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

---

**Authors:**

**Osikov M.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pathological Physiology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Simonyan E.V.**, PhD (Pharmacy), Associate Professor, Head, Department of Pharmacy and Chemistry, Pharmaceutical Faculty, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Ageeva A.A.**, Assistant Professor, Department of Pathological Physiology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Ageev Yu.I.**, PhD (Medicine), Senior Lecturer, Department of Pathological Physiology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

---

Поступила 20.11.2020  
Принята к печати 10.01.2021

---

Received 20.11.2020  
Accepted 10.01.2021

## ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ИНФОРМАТИВНОСТЬ IL-17 ПРИ НЕЙРОИНТОКСИКАЦИИ ПАРАМИ РТУТИ

Бодиенкова Г.М., Боклаженко Е.В.

ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», г. Ангарск, Иркутская обл., Россия

**Резюме.** Известно, что при хроническом воздействии паров металлической ртути наблюдаются изменения в клеточном и гуморальном звеньях иммунной системы. В динамике развития и течения хронической ртутной интоксикации (ХРИ) в предыдущих исследованиях нами выявлены выраженные закономерные изменения медиаторов воспаления (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$ ), показана важная роль аутоиммунных реакций относительно белков нервной ткани. В последние годы возрастает интерес к открытому в начале XXI века интерлейкину 17 (IL-17) при ряде воспалительных и аутоиммунных заболеваний. Однако сведения о роли его при нейроинтоксикации ртутью отсутствуют. Учитывая, что IL-17 обладает провоспалительной активностью и стимулирует выработку отдельных цитокинов, на следующем этапе исследований целью работы явилось выявление изменений концентрации IL-17 в сыворотке крови у пациентов с нейроинтоксикацией ртутью различной степени выраженности для обоснования дополнительных критериев ранней и эффективной диагностики заболевания. Проведено обследование мужчин, подвергавшихся хроническому воздействию паров металлической ртути и имеющих ранние признаки нейроинтоксикации парами металлической ртути (n = 37), лиц с установленным диагнозом ХРИ (n = 40) и «условно здоровых» мужчин (n = 34). Критериями включения в основные группы являлось наличие установленного во время работы в контакте с вредным производственным фактором диагноза, отсутствие коморбидной патологии. Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 (StatSoft, США). В результате исследования установлено статистически значимое возрастание сывороточных концентраций IL-17 как у пациентов с ранними проявлениями нейроинтоксикации парами металлической ртути, так и у лиц с ХРИ при сопоставлении с группой сравнения, что свидетельствует о его активации и согласуется с результатами отдельных авторов, свидетельствующих о возрастании IL-17 при иммуновоспалительных заболеваниях. Результаты корреляционного анализа продемонстрировали связь между IL-17 и медиаторами воспаления (у пациентов с ранними признаками нейроинтоксикации возрастание продукции IL-17 сопровождалось нарастанием противовоспалительного IL-10, а у лиц с ХРИ при увеличении концентрации IL-17 наблюдалось снижение провоспалительного TNF $\alpha$ ), что подтверждает его роль в иммунопатогенезе нейроинтоксикации парами ртути. Дальнейшее изучение участия IL-17 в инициации и поддержании хронического воспаления будет не только способствовать лучшему пониманию природы болезни, но и, самое главное, появлению новых, более эффективных методов лечения.

**Ключевые слова:** IL-17, иммунная система, диагностика, ртуть, ранние проявления нейроинтоксикации, хроническая ртутная интоксикация

### Адрес для переписки:

Бодиенкова Галина Михайловна  
ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований»  
665827, Россия, Иркутская обл., г. Ангарск, 12а микрорайон, 3  
Тел.: 8 (3955) 58-69-10 (доб. 1411).  
E-mail: immun11@yandex.ru

### Address for correspondence:

Bodienkova Galina M.  
East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research  
665827, Russian Federation, Irkutsk Region, Angarsk, District 12a, 3.  
Phone: 7 (3955) 58-69-10 (доб. 1411).  
E-mail: immun11@yandex.ru

### Образец цитирования:

Г.М. Бодиенкова, Е.В. Боклаженко «Диагностическая информативность IL-17 при нейроинтоксикации парами ртути» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 2. С. 395-400.  
doi: 10.15789/1563-0625-DVO-2139  
© Бодиенкова Г.М., Боклаженко Е.В., 2021

### For citation:

G.M. Bodienkova, E.V. Boklazhenko "Diagnostic value of IL-17 in neurointoxication with mercury", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 2, pp. 395-400.  
doi: 10.15789/1563-0625-DVO-2139  
DOI: 10.15789/1563-0625-DVO-2139

## DIAGNOSTIC VALUE OF IL-17 IN NEUROINTOXICATION WITH MERCURY

**Bodienkova G.M., Boklazhenko E.V.**

*East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research, Angarsk, Irkutsk Region, Russian Federation*

**Abstract.** It is known that sufficient changes are observed in cellular and humoral links of immune system upon chronic exposure vapors of metallic mercury. In previous studies, upon development and in the course of the chronic mercury intoxication (CMI) we revealed pronounced regular changes of inflammatory mediators (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$ ), and showed an important role of autoimmune reactions affecting nervous tissue proteins. Over last 20 years, an increased interest was shown for interleukin 17 (IL-17) and its role in a number of inflammatory and autoimmune diseases. However, there is no data on its role in neurointoxication with mercury. Considering that IL-17 has proinflammatory activity and stimulates production of the individual cytokines, the goal of our work at the next stage of research, was to identify quantitative changes of serum IL-17 in patients with mercury neurointoxication of various severity, aiming to substantiate additional criteria for early and effective diagnosis of the disease.

The study was performed in males chronically exposed to metallic mercury vapors with early signs of neurointoxication (n = 37), individuals diagnosed with CMI (n = 40), and “conditionally healthy” men (n = 34). Proper diagnosis confirmed by history of working contacts with a harmful industrial factor, and absence of comorbid pathologies served as inclusion criteria. Statistical processing of the results was carried out using the STATISTICA 6.0 application package (StatSoft, USA). The study has revealed a statistically significant increase in serum IL-17 concentrations, both in the patients with early signs of neurointoxication with metallic mercury vapors, and individuals with CMI, when compared with the comparison group, thus indicating its activation, and being consistent with results of several workers who showed an IL-17 increase in immunoinflammatory diseases. Correlation analysis has shown an association between IL-17 and inflammatory mediators, i.e., the patients with early signs of neurointoxication had an increased production of IL-17 accompanied by an increase in anti-inflammatory IL-10, whereas the CMI patients with an increase in IL-17 concentration showed a decrease in pro-inflammatory TNF $\alpha$ , thus confirming its role in immunopathogenesis of mercury neurointoxication. Further study of IL-17 involvement in the initiation and maintenance of chronic inflammation will not only contribute to better understanding of the disease origin, but also, most importantly, implication of novel, more effective treatments.

*Keywords: IL-17, immune system, diagnostics, mercury, early manifestations of neurointoxication, chronic mercury intoxication*

### Введение

До настоящего времени ртуть продолжает оставаться значимым фактором риска нарушений здоровья человека [6]. Согласно современным представлениям, развитие и течение клинической картины ХРИ зависит от продолжительности, интенсивности воздействия, индивидуальных особенностей организма. При этом определенные трудности вызывает разграничение стадий заболевания [4]. Нарушения в нервной системе при хроническом воздействии паров ртути сопровождаются изменениями как в клеточном, так и гуморальном звеньях иммунитета. В предыдущих исследованиях нами выявлены выраженные закономерные изменения медиаторов воспаления (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$ ) [12], а также показана важная роль аутоиммунных реакций в динамике развития хронической ртутной интоксикации (ХРИ) [11]. В по-

следние годы отмечен рост интереса к открытому в начале XXI века IL-17, однако сведения о роли его при нейроинтоксикации ртутью отсутствуют. Известно, что IL-17 продуцируется различными иммунокомпетентными клетками, однако наиболее выраженный синтез его осуществляют Т-хелперы 17-го типа (Th17). IL-17 относится к провоспалительным цитокином и способен стимулировать выработку различных хемокинов [9]. В последние годы установлено, что Th17-клетки играют важную роль в патогенезе аутоиммунных и аллергических заболеваний [8, 15]. Чрезмерная продукция этого цитокина ассоциирована с иммуновоспалительными, аутоиммунными заболеваниями (псориаз, псориазный артрит, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, системная красная волчанка) [7, 10]. IL-17 стал важной терапевтической мишенью при лечении различных хронических воспалительных заболе-

ваний человека [5]. Учитывая, что IL-17 проявляет выраженную провоспалительную активность, способен индуцировать синтез различных цитокинов, в том числе TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, тем самым способствуя развитию аутоиммунных патологических реакций, актуальным является изучение роли IL-17 в патогенезе ХРИ для обоснования дополнительных критериев ранней и эффективной диагностики заболевания.

В связи с вышеизложенным, **целью работы** явилось выявление изменений концентрации IL-17 в сыворотке крови у пациентов с нейротоксикацией ртутью различной степени выраженности для обоснования дополнительных критериев ранней и эффективной диагностики заболевания.

## Материалы и методы

Проведено обследование пациентов, подвергавшихся хроническому воздействию паров металлической ртути, которые находились на обследовании и лечении в клинике института. В первую группу включены мужчины ( $n = 37$ ) в возрасте  $49,2 \pm 4,4$  лет и стажем работы в контакте с ртутью  $18,1 \pm 5,6$  лет, имеющие ранние признаки нейротоксикации парами металлической ртути, проявляющиеся в основном ( $80,0 \pm 8,9\%$  случаев) астеническим расстройством, которое сопровождалось в  $56,7 \pm 7,5\%$  синдромом вегетативной дистонии. Вторая группа состояла из мужчин ( $n = 40$ ) с установленным диагнозом хронической ртутной интоксикации, у которых в 100% случаев выявлена токсическая энцефалопатия и в  $74,2 \pm 8,6\%$  органическое расстройство личности. Средний возраст обследованных составил  $53,4 \pm 0,8$  года, стаж —  $15,6 \pm 0,8$  лет. Критериями включения в основные группы являлось наличие установленного во время работы в контакте с вредным производственным фактором диагноза, отсутствие коморбидной патологии, которая могла бы повлиять на обмен цитокинов (ожирение, сахарный диабет, артериальная гипертензия). Постановка диагноза осуществлялась в соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра (МКБ-10). В группу сравнения включены мужчины ( $n = 34$ ) сопоставимые по возрасту ( $47,2 \pm 4,7$  года) и общему трудовому стажу ( $14,2 \pm 1,2$  года), не имеющие клинических признаков острых или хронических заболеваний любой природы и контакта в условиях производства с веществами нейротоксического действия. Забор крови у пациентов проводили до проведения лечения. Концентрации IL-17 в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов реагентов производства ЗАО «БиоХимМак»: (ИФА-IL-17), кат. № BMS2017,

чувствительность: 2 пг/мл, диапазон измерений: 0–500 пг/мл. Оценивали корреляционные зависимости между IL-17 и другими цитокинами (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10). Исследования выполнены на автоматическом анализаторе Alisei Q.S. (SEAC, Италия). Полученные результаты выражали в пг/мл. Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 (StatSoft, США). Межгрупповые различия оценивали с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. За уровень статистической значимости различий принимали  $p < 0,05$ . Результаты исследований представлены в виде медианы нижнего (25%) и верхнего (75%) квартилей — Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ). Возраст и стаж работы обследованных пациентов представлены в виде средней (M) и ее ошибки (m). Корреляционный анализ проводили методом ранговой корреляции Спирмена (r). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Обследование пациентов соответствовало этическим стандартам в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (2000) и «Правилами клинической практики в РФ», утвержденными Приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 г. Исследования выполнены с информированного согласия пациентов на участие в них и одобрены Этическим комитетом ВСНЦ ЭЧ СО РАМН (Протокол № 5 от 14.11.12).

## Результаты и обсуждение

Предыдущими исследованиями выявлены особенности функционирования иммунной системы у обследованных пациентов с нейротоксикацией парами ртути, характеризующиеся возрастанием количества CD3<sup>+</sup>T-лимфоцитов, CD4<sup>+</sup> лимфоцитов-хелперов, CD16<sup>+</sup> натуральных киллеров, CD9<sup>+</sup> пре-B-лимфоцитов, CD20<sup>+</sup> лимфоцитов с одновременным повышением концентрации провоспалительных цитокинов — IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-2, IL-6 и противовоспалительного IL-4 относительно группы сравнения [2, 3]. Учитывая заинтересованность компонентов иммунной системы, в частности гиперактивацию CD4<sup>+</sup> клеток и усиленную выработку провоспалительных цитокинов, а также современные представления о выраженной провоспалительной активности IL-17, способного индуцировать синтез различных медиаторов воспаления, на следующем этапе исследования определен интерес представляла оценка его концентрации в сыворотке крови пациентов с начальными проявлениями нейротоксикации парами ртути и лиц с установленным диагнозом ХРИ (табл. 1).

Результаты сравнительного анализа сывороточных концентраций IL-17 у пациентов, в зави-

симости от степени выраженности нейроинтоксикации, позволили установить статистически значимое ( $p = 0,008$ ) возрастание уровней IL-17 в сыворотке крови пациентов с ранними проявлениями нейроинтоксикации парами металлической ртути при сопоставлении с группой сравнения. У пациентов с установленным диагнозом ХРИ также наблюдалось увеличение уровня IL-17 ( $p = 0,0003$ ). В зависимости от степени выраженности интоксикации ртутью статистически значимых различий концентрации IL-17 между группами отмечено не было, хотя имела место тенденция к его нарастанию у лиц с ХРИ. Данные наших исследований согласуются с результатами других авторов, свидетельствующих об активации IL-17 при других иммуновоспалительных заболеваниях [7, 8, 9, 15]. Ингибирование иммунных реакций, зависящих от IL-17 в последние годы, представляет собой перспективное направление в лечении широкого круга хронических заболеваний, в связи с чем актуальным являлось выявление взаимосвязи IL-17 с другими медиаторами воспаления. Результаты корреляционного анализа между IL-17 и IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  в группе сравнения позволили выявить прямую статистически значимую ( $r = 0,767$ ;  $p = 0,015$ ) зависимость между IL-17 и противовоспалительным IL-4. В группах лиц с ранними проявлениями нейроинтоксикации и ХРИ происходит ее рассогласование и у первых появляется новая взаимосвязь с другим противовоспалительным цитокином – IL-10 ( $r = -0,388$ ;  $p = 0,017$ ). Следует отметить, что IL-10 относится к основному иммуносупрессивному цитокину, который редуцирует реакции воспаления, но одновременно ослабляет

противовирусный иммунитет [13]. Особого внимания заслуживает появление у пациентов с ХРИ сильной патогенетически значимой отрицательной зависимости между IL-17 и TNF $\alpha$  ( $r = -0,796$ ;  $p = 0,042$ ). Исследованиями Просековой Е.В. и соавт. [8] показано, что семейству IL-17, наряду со значительным количеством иммунорегуляторных функций, свойственна инициация и стимуляция провоспалительных реакций. Способствуя воспалению, IL-17 действует совместно с фактором некроза опухолей [15]. Синергетический эффект TNF $\alpha$  и IL-17 на мРНК детально изучен на примере мРНК хемокина CXCL1 [14]. Показано, что TNF $\alpha$  стимулирует инициацию транскрипции мРНК, а IL-17 стабилизирует уже синтезированную мРНК. Авторами были также найдены еще 12 генов с таким же механизмом регуляции их экспрессии.

Зарегистрированный факт зависимости у пациентов с ХРИ между повышением продукции IL-17 и снижением фактора некроза опухоли согласуется и с ранее выполненными исследованиями, свидетельствующими о том, что при хроническом воздействии паров металлической ртути у стажированных работников и лиц с начальными проявлениями нейроинтоксикации установлена гиперпродукция TNF $\alpha$ , а с нарастанием тяжести патологического процесса при ХРИ наблюдается снижение его концентрации, способствующее поддержанию патологического процесса и прогрессивному течению нейроинтоксикации [1].

Таким образом, у пациентов с ранними проявлениями нейроинтоксикации парами ртути и лиц с хронической ртутной интоксикацией установлено повышение сывороточной концентрации

**ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИИ IL-17 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ ВЫРАЖЕННОСТИ НЕЙРОИНТОКСИКАЦИИ ПАРАМИ РТУТИ**

TABLE 1. SERUM IL-17 CONCENTRATIONS DEPENDING ON SEVERITY OF NEUROINTOXICATION WITH MERCURY VAPOR

Обследуемые группы Survey samples	Количество обследованных Number of surveyed	Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ), пг/мл Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ), pg/ml	Показатель статистической значимости (p) Indicator of the statistical importance (p)
Пациенты с ранними признаками нейроинтоксикации парами ртути Patients with early signs of neurointoxication with mercury vapor	37	14,07 (0,01-30,90)*	$p_{1-3} = 0,008$
ХРИ ChMI	40	17,5 (0,01-32,55)*	$p_{2-3} = 0,0003$
Группа сравнения Group of comparison	34	0,01 (0,01-11,10)	

Примечание. \* – различия при сопоставлении с группой сравнения статистически значимы при  $p < 0,05$ .

Note. \*, differences compared with the comparison group are statistically significant at  $p < 0.05$ .

IL-17 при сопоставлении с группой сравнения, что свидетельствует о его информативной значимости в качестве дополнительного диагностического критерия. Полученные результаты продемонстрировали связь между IL-17 и медиаторами воспаления, что подтверждает его роль в иммуннопатогенезе нейротоксикации парами ртути.

Выполненные пилотные исследования свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения участия IL-17 в инициации и поддержании хронического воспаления, которое будет не только способствовать лучшему пониманию природы болезни, но и, самое главное, появлению новых, более эффективных методов лечения.

## Список литературы / References

1. Бодиенкова Г.М., Боклаженко Е.В. Динамика изменений цитокинового профиля при воздействии паров металлической ртути в условиях производства // Российский аллергологический журнал, 2012. № S5. С. 30-31. [Bodienkova G.M., Boklazhenko E.V. Dynamics of changes in cytokine profile when exposed to vapors of metallic mercury in the production of. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergy Journal*, 2012, no. S5, pp. 30-31. (In Russ.)]
2. Бодиенкова Г.М., Рукавишников В.С., Боклаженко Е.В. Оценка иммунорегуляторных маркеров в течении нейротоксикации ртутью в постконтактном периоде // Гигиена и санитария, 2016. Т. 95, № 12. С. 1138-1141. [Bodienkova G.M., Rukavishnikov V.S., Boklazhenko E.V. The evaluation of immunoregulatory markers in the course of neurointoxication by mercury over the post-exposure period. *Gigiena i sanitariya = Hygiene and Sanitation*, 2016, Vol. 95, no. 12, pp. 1138-1141. (In Russ.)]
3. Боклаженко Е.В., Бодиенкова Г.М. Влияние хронической ртутной интоксикации в постконтактном периоде на фенотипический состав лимфоцитов периферической крови // Гигиена и санитария, 2019. Т. 98, № 10. С. 1091-1095. [Boklazhenko E.V., Bodienkova G.M. Phenotypic composition of peripheral blood lymphocytes and their cooperation in patients with chronic mercury intoxication in a post-contact period. *Gigiena i sanitariya = Hygiene and Sanitation*, 2019, Vol. 98, no. 10, pp. 1091-1095. (In Russ.)]
4. Катаманова Е.В., Шевченко О.И., Лахман О.Л. Некоторые итоги изучения нейропсихологических особенностей лиц, подвергавшихся хроническому воздействию ртути в условиях химического производства // Медицина труда и промышленная экология, 2010. № 1. С. 19-23. [Katamanova E.V., Shevchenko O.I., Lakhman O.L. Neuropsychologic traits in individuals with chronic exposure to mercury at work. *Meditina truda i promyshlennaya ekologiya = Occupational Medicine and Industrial Ecology*, 2010, no. 1, pp.19-23. (In Russ.)]
5. Костарева О.С., Габдулхаков А.Г., Коляденко И.А., Гарбер М.Б., Тищенко С.В. Интерлейкин-17: функциональные и структурные особенности; использование в качестве терапевтической мишени // Успехи биологической химии, 2019. Т. 59. С. 393-349. [Kostareva O.S., Gabdulkhakov A.G., Kolyadenko I.A., Garber M.B., Tishchenko S.V. Interleukin-17: functional and structural features; use as a therapeutic target. *Uspekhi biologicheskoy khimii = Advances in Biological Chemistry*, 2019, Vol. 59, pp. 393-349. (In Russ.)]
6. Малов А.М., Сибиряков В.К., Муковский Л.А., Семенов Е.В. Ртуть как фактор риска для здоровья человека. Известия Самарского научного центра Российской академии, 2014. Т. 16, № 5 (2). С. 907-910. [Malov A.M., Sibiryaev V.K. Mukovskiy L.A., Semenov E.V. Mercury as risk factor for human health. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii = News of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*, 2014, Vol. 16, no. 5 (2), pp. 907-910. (In Russ.)]
7. Мельников М.В., Белоусова О.О., Жетишев Р.Р., Пашенков М.В., Бойко А.Н. Влияние катехоламинов на Th17-клетки при рассеянном склерозе // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 2016. Т. 116, № 10-2. С. 16-20. [Melnikov M.V., Belousova O.O., Zhetishev R.R., Pashenkov M.V., Boyko A.N. The influence of catecholamines on Th17-cells in multiple sclerosis. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova = S Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2016, Vol. 116, no. 10-2, pp. 16-20. (In Russ.)]
8. Просекова Е.В., Турянская А.И., Долгополов М.С. Семейство интерлейкина-17 при атопии и аллергических заболеваниях // Тихоокеанский медицинский журнал, 2018. № 2. С. 15-20. [Prosekova E.V., Turyanskaya A.I., Dolgoplov M.S. Interleukin-17 family in atopy and allergic diseases. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2018, no. 2, pp. 15-20. (In Russ.)]
9. Шилова Л.Н., Паньшина Н.Н., Чернов А.С., Трубенко Ю.А., Хортиева С.С., Морозова Т.А., Паншин Н.Г. Иммунопатологическое значение интерлейкина-17 при псориазическом артрите // Современные проблемы науки и образования, 2015. № 6. Режим доступа: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=23040>. [Shilova L.N., Panshina N.N., Chernov A.S., Trubenko Yu.A., Khortieva S.S., Morozova T.A., Panshin N.G. Immunopathological significance of interleukin-17 in psoriatic arthritis. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2015, no. 6. (In Russ.)] Access mode: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=23040>.
10. Beringer A., Noack M. IL-17 in chronic inflammation: from discovery to targeting. *Trends Mol. Med.*, 2016, Vol. 22, no. 3, pp. 230-241.
11. Bodienkova G.M., Boklazhenko E.V. Changes in antibodies against nervous tissue proteins in patients with chronic mercury intoxication in the post-contact period. *Neurochem. J.*, 2020, Vol. 14, no. 1, pp. 108-115.

12. Bodienkova G., Alekseev R., Boklazhenko E., Kurchevenko S. Inflammation mediators in employees in chronic exposure to neurotoxicants. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*, 2014, Vol. 27, no. 4, pp. 619-626.
13. Guarda G., Braun M., Staehli F., Tardivel A., Mattmann., Forster I., Farlik M., Decker T., du Pasquier R., Tschopp J. Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity*, 2011, Vol. 34, no. 2, pp. 2013-223.
14. Hartupee J., Liu C., Novotny M., Li X., Hamilton T. IL-17 enhances chemokine gene expression through mRNA stabilization. *J. Immunol.*, 2007. Vol. 179, pp. 4135-4414.
15. Juszcak M., Głabinski A. Th17 cells in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)*, 2009, Vol. 63, pp. 492-501. (In Polish)

---

**Авторы:**

**Бодиенкова Г.М.** — д.м.н., профессор, заведующая лабораторией иммуно-биохимических и молекулярно-генетических исследований в гигиене ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», г. Ангарск, Иркутская обл., Россия

**Боклаженко Е.В.** — к.м.н., научный сотрудник лаборатории иммуно-биохимических и молекулярно-генетических исследований в гигиене ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», г. Ангарск, Иркутская обл., Россия

**Authors:**

**Bodienkova G.M.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Immunobiochemical and Molecular Genetic Studies in Hygiene, East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research, Angarsk, Irkutsk Region, Russian Federation

**Boklazhenko E.V.**, PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Immunobiochemical and Molecular Genetic Studies in Hygiene, East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research, Angarsk, Irkutsk Region, Russian Federation

---

Поступила 08.10.2020  
Принята к печати 09.01.2021

Received 08.10.2020  
Accepted 09.01.2021

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ИМУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ ТРОМБОЦИТАРНО-МОНОЦИТАРНЫХ КОМПЛЕКСОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРОМЕТРИИ

Павлов О.В.<sup>1</sup>, Чепанов С.В.<sup>1</sup>, Селютин А.В.<sup>1</sup>, Зайнулина М.С.<sup>2,3</sup>,  
Еремеева Д.Р.<sup>2,3</sup>, Сельков С.А.<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> СПб ГБУЗ «Родильный дом № 6 имени профессора В.Ф. Снегирева», 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.** Активированные тромбоциты образуют комплексы с циркулирующими лейкоцитами посредством мембраносвязанных молекул. Взаимодействие тромбоцитов с моноцитами лежит в основе патофизиологических механизмов, связывающих процессы тромбообразования и воспаления. Определение и анализ тромбоцитарно-моноцитарных комплексов (ТМК) позволяют выявить их физиологическую и патогенетическую роль, а также имеют важное диагностическое значение при изучении различных патологических состояний, в том числе акушерских. Цель исследования состояла в разработке метода определения количественного содержания ТМК в периферической крови, позволяющего сохранить основные фенотипические характеристики тромбоцитов и моноцитов и выявить их изменения при анализе биоматериала *ex vivo*. Предлагаемый метод сочетает в себе немедленную фиксацию образцов крови, иммуноцитохимическое флуоресцентное окрашивание дифференцировочных и активационных маркеров тромбоцитов и моноцитов с последующим лизисом эритроцитов и анализ с помощью проточной цитофлуориметрии. Было исследовано 14 образцов периферической крови, полученных от пациенток с отягощенным акушерским анамнезом в первом триместре текущей беременности. Показано, что процедура фиксации позволяет сохранить количественные и качественные характеристики ТМК, существующие *in vivo*, тогда как при отсутствии фиксации наблюдается многократное увеличение количества ТМК и уровня экспрессии активационных маркеров тромбоцитов и моноцитов *ex vivo*. Используемая панель моноклональных антител и примененные стратегии гейтирования обеспечивают оценку относительного и абсолютного количества ТМК и их фенотипических характеристик как в общей популяции (CD45<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>) моноцитов, так и в субпопуляциях «классических» (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>), «промежуточных» (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) и «неклассических»

### Адрес для переписки:

Павлов Олег Владимирович  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
акушерства, гинекологии и репродуктологии имени  
Д.О. Отта»  
199034, Россия, Санкт-Петербург,  
Менделеевская линия, 3.  
Тел.: 8 (812) 328-98-50.  
Факс: 8 (812) 323-75-45.  
E-mail: ovpavlov@hotmail.com

### Address for correspondence:

Pavlov Oleg V.  
D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and  
Reproductive Medicine  
199034, Russian Federation, St. Petersburg,  
Mendeleev line, 3.  
Phone: 7 (812) 328-98-50.  
Факс: 7 (812) 323-75-45.  
E-mail: ovpavlov@hotmail.com

### Образец цитирования:

О.В. Павлов, С.В. Чепанов, А.В. Селютин,  
М.С. Зайнулина, Д.Р. Еремеева, С.А. Сельков  
«Определение и иммунофенотипирование  
тромбоцитарно-моноцитарных комплексов  
в периферической крови с помощью проточной  
цитофлуориметрии» // Медицинская иммунология,  
2021. Т. 23, № 2. С. 401-410.  
doi: 10.15789/1563-0625-FCD-2124

© Павлов О.В. и соавт., 2021

### For citation:

O.V. Pavlov, S.V. Chepanov, A.V. Selutin, M.S. Zainulina,  
D.R. Ereemeeva, S.A. Selkov "Flow cytofluorimetric detection  
and immunophenotyping of platelet-monocyte complexes  
in peripheral blood", Medical Immunology (Russia)/  
Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 2,  
pp. 401-410.  
doi: 10.15789/1563-0625-FCD-2124

DOI: 10.15789/1563-0625-FCD-2124

(CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>) моноцитов. Выработанный подход позволяет оценить вклад отдельных субпопуляций моноцитов в формирование ТМК и степень их участия в физиологических и патофизиологических процессах. В отдельных образцах было выявлено увеличение количества ТМК, сопровождавшееся существенным повышением в них экспрессии активационного маркера тромбоцитов CD62P и снижением экспрессии его моноцитарного лиганда CD162. Данные перемены могут свидетельствовать об изменении активационного статуса комплексообразующих клеток и возможном участии ТМК в патофизиологических механизмах некоторых акушерских осложнений. Иммунофенотипирование ТМК позволяет дополнительно охарактеризовать их провоспалительный, прокоагулянтный и адгезионный потенциал и может быть применено как в фундаментальных исследованиях, так и в целях диагностики. В частности, данный метод может быть использован для определения и характеристики ТМК при акушерских осложнениях, сопровождающихся воспалением и нарушениями гемостаза.

*Ключевые слова:* тромбоцитарно-моноцитарные комплексы, тромбоциты, моноциты, периферическая кровь, иммунофенотипирование, проточная цитофлуориметрия

## FLOW CYTOFLUORIMETRIC DETECTION AND IMMUNOPHENOTYPING OF PLATELET-MONOCYTE COMPLEXES IN PERIPHERAL BLOOD

Pavlov O.V.<sup>a</sup>, Chepanov S.V.<sup>a</sup>, Selutin A.V.<sup>a</sup>, Zainulina M.S.<sup>b, c</sup>,  
Eremeeva D.R.<sup>b, c</sup>, Selkov S.A.<sup>a, c</sup>

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

<sup>b</sup> V. Snegirev Maternity Hospital No. 6, St. Petersburg, Russian Federation

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

**Abstract.** Activated platelets aggregate with monocytes by their binding to membrane-bound molecules. Platelet-monocyte interaction is considered to underlie pathophysiological mechanisms bridging thrombosis and inflammation. Detection and analysis of platelet-monocyte complexes (PMC) provide means for revealing their physiological and pathogenetic roles and are instrumental in diagnostics of various pathological conditions, including obstetric complications. The aim of present study was to develop a technique for quantitative determination of PMCs in peripheral blood, that preserving phenotypic features of platelets and monocytes, and to reveal their changes by *ex vivo* analysis. The suggested procedure includes immediate fixation of blood sample, immunocytochemical staining with fluorochrome-conjugated specific antibodies against distinct activation and differentiation markers, followed by erythrocyte lysis, and flow cytometric analysis. We have analyzed fourteen samples of peripheral blood from the patients with a history of complicated pregnancies. The samples were taken in first trimester of the ongoing pregnancy. We have shown that quantitative and qualitative *in vivo* characteristics of PMC remained unchanged in pre-fixed samples, whereas the number of PMCs and expression levels of the platelet and monocyte activation markers dramatically increased in unfixed blood specimens. The set of monoclonal antibodies and gating strategies used in this study allows phenotyping and evaluation of percentage/absolute PMC counts in the total monocyte population (CD45<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>) and in the subpopulations of classical (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>), intermediate (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>), and non-classical (CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>) monocytes. This approach provides insight into participation of different monocyte subsets in PMC formation, and their roles in physiological and pathophysiological processes. In some samples, elevated PMC proportion was observed, accompanied by significantly increased expression of CD62P platelet activation marker, and a decrease in its monocytic ligand CD162 expression. These changes suggested altered activation of PMC and their participation in pathophysiological mechanisms of some pregnancy complications. Immunophenotyping of PMC affords an opportunity to characterize their proinflammatory, procoagulant and adhesive properties; these results can be used for research and diagnostics. In particular, the method is suitable for detection and phenotyping of PMC in pregnancy complications and other pathological conditions associated with disorders of hemostasis and thrombosis.

*Keywords:* platelet-monocyte complexes, platelets, monocytes, peripheral blood, immunophenotyping, flow cytometry

## Introduction

Circulating platelet-leukocyte complexes (PLC) come into focus of researchers in recent years. Activated platelets exhibit apparent capacity to form aggregates with leukocytes, in particular with monocytes and neutrophils [4]. Formation of PLC is predominantly mediated by the interaction of P-selectin (CD62P), expressed on the surface of activated platelets, with ligand PSGL-1 (CD162), which is constitutively expressed by leucocytes. The formed PLC are further stabilized by interaction between platelet membrane molecules CD40L, GPIb $\alpha$ , ICAM-2 and their leukocyte counterparts CD40, Mac-1 (CD11b/CD18), LFA-1, respectively [18].

Platelet-monocyte interaction is considered to be a pivotal event that underlies pathophysiological mechanisms bridging thrombosis and inflammation, in particular, proinflammatory effects, mediated by activated platelets [5]. It is accepted that platelet-monocyte complexes (PMC) are a more sensitive marker of *in vivo* platelet activation than commonly accepted parameter – CD62P expression level [15]. Quantitative detection of PMC as well as characterization of pro-inflammatory, pro-coagulant, and adhesive phenotypes are intended to reveal their physiological and pathophysiological roles. Moreover, this approach may be applied for diagnostic purposes.

Circulating monocytes are divided into three subsets by expression of surface markers CD14 and CD16 [19]. Determination and phenotyping of PMC in these subpopulations provide additional information about their activation and participation in the interaction with platelets.

Changes in the levels of total PMC and aggregates, formed by different monocyte subsets, were found in the circulation of patients with various inflammatory and thrombophilic disorders including acute myocardial infarction [12], cardiovascular diseases [2, 3], chronic obstructive pulmonary disease [2], antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus, and rheumatoid arthritis [10], tuberculosis [11]. Increased levels of PMC in pre-eclampsia suggest their pathogenetic role in this disorder [13]. We propose that other pregnancy complications, associated with prothrombotic state, are accompanied by activation of platelets and monocytes and manifest themselves as quantitative and qualitative changes in the characteristics of PMC.

Being engaged in the study of PMC roles in recurrent pregnancy loss, we faced with a choice of methodical approach. Currently, there is no conventional protocol of PMC determination in peripheral blood. Diversity of procedures employed by different research groups resulted in disparate data on the amount and phenotype of circulating PMC. Flow cytometry is widely used as an accessible and

reliable analytical approach for identification and immunophenotyping of PMC. Methodical discrepancies mainly refer to sample preparation, selection of monoclonal antibodies/fluorochromes, and gating strategy. The most significant problem is platelet activation that results in *ex vivo* PMC formation. The phenomenon reflects neither physiological nor pathophysiological events and thus significantly interferes with determination of *in vivo* characteristics of PMC. It was demonstrated that spontaneous PMC formation began just after blood sampling and proceeded at high rate – 0.3-0.4% per minute. [8, 12]. In practice, it takes at least half an hour to proceed from blood sampling to analysis. Moreover, this interval may extend up to 1 h or more, if minimal transportation of the samples is needed. However, in the most existing protocols this point is overlooked, although PMC number may significantly increase during that time in comparison with their *in vivo* level.

**The purpose of our study** was development of the method of detection and quantification of PMC in peripheral blood samples, ensuring prevention of *ex vivo* platelet activation, preservation of phenotype characteristics of platelets, monocytes and PMC, and evaluation of their *in vivo* changes.

## Materials and methods

Samples of peripheral blood were obtained from patients with history of pregnancy complications (recurrent pregnancy loss, non-developing pregnancy, intrauterine fetal death, antiphospholipid syndrome) in first trimester of ongoing pregnancy. Venous blood was sampled by venipuncture using 21-gauge needle and collected into vacutainer containing anticoagulant (3.8% sodium citrate). To avoid post-traumatic cell aggregation, first portion of blood (3-5 ml) was discarded. Since spontaneous platelet activation and formation of PLC occur *in vitro* in the absence of agonists, it is critical to fixate cells and aggregates as close as possible to the moment of blood sampling. Within 1-2 minutes after collection 0.5 ml blood was mixed with equal volume of CellFix (BD Biosciences).

After 1 hour 50  $\mu$ l of fixed blood were immunolabeled with 5  $\mu$ l of following fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies: CD45-PerCP, CD14-Alexa Fluor<sup>®</sup>700, CD41a-APC, CD16-PE-Cy7<sup>™</sup>, CD62P-FITC, CD40-APC-H7, CD162-PE, CD142-PE, CD11b-PE (all BD Biosciences). To exclude non-specific binding and cell autofluorescence, isotype controls, conjugated with relevant fluorochromes, were used in addition to internal control, that provided optimal parameters for data acquisition. Samples were incubated for 20 min in dark at room temperature. Red blood cells were lysed by tenfold dilution of the samples with BD FACS<sup>™</sup> Lysing Solution (BD Biosciences).

Samples were analyzed using FACSCanto II (Becton Dickinson) flow cytometer with FACSDiva software (BD Biosciences). Ten thousand events were collected in the platelet gate. For the analysis of monocytes and PMC, at least 5,000 events with relevant immunophenotype were collected in the monocyte gate. Leukocyte and platelet counts were determined with automated blood analyzer ADVIA 60 CT (Siemens). Statistical analyses were performed using Microsoft Office software package.

## Results

Immediate and prolonged fixation of blood samples is a key issue of the suggested procedure. In preliminary experiments we compared PMC content and expression of activation markers of platelets and monocytes in unfixed blood and in the samples subjected to the immediate fixation. When compared to fixed blood, 2.5-4 fold increase in PMC percentage was observed after 1 hour without fixation, CD62P expression level in PMC increased twofold (from 9.7 to 18.7%), and CD11b demonstrated 8.5 fold increase, amounting up to 100%. Moreover, it was demonstrated that prolongation of fixation time up to 1 hour did not significantly affect such measured parameters as PMC amount and expression levels of platelet and monocyte markers.

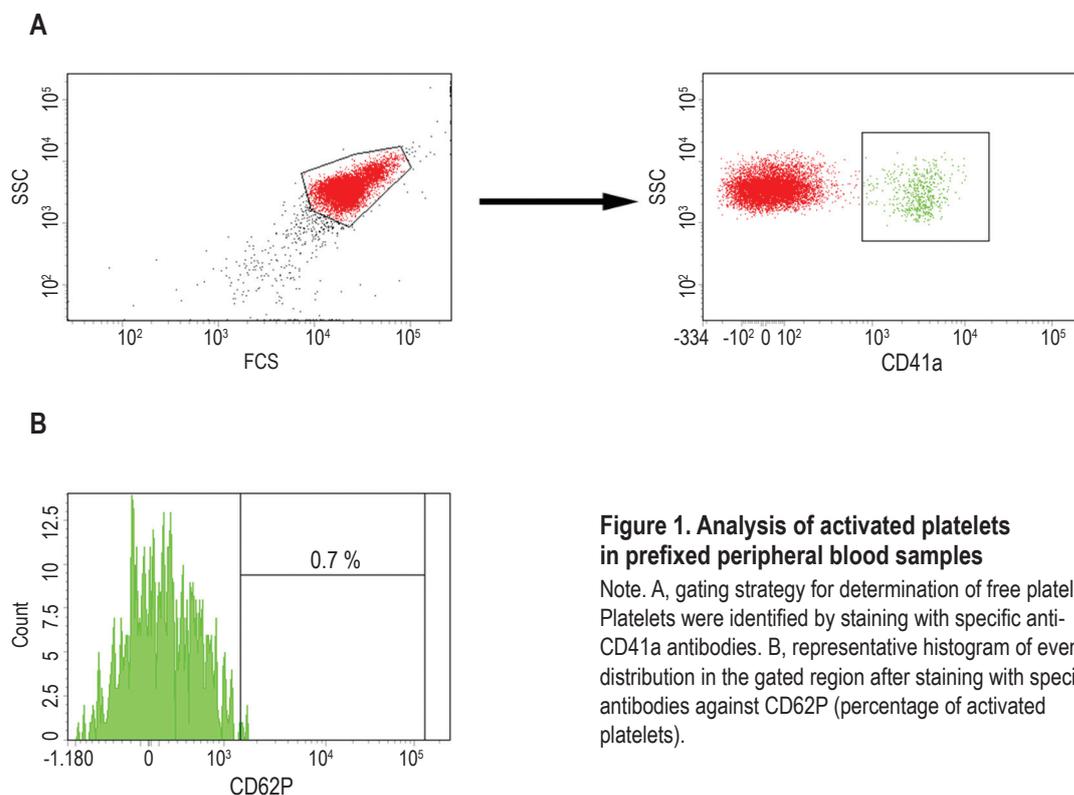
We analyzed 14 peripheral blood samples obtained by the procedure described above.

Monocyte and platelets were determined with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies against specific antigenic markers.

Platelets were identified from the expression of CD41a, monocytes were recognized from the expression of both CD45 and CD14. Platelet-monocyte aggregates were recognized as CD14 and CD41a double positive events. Monocyte subsets were determined from differential CD14 and CD 16 expression.

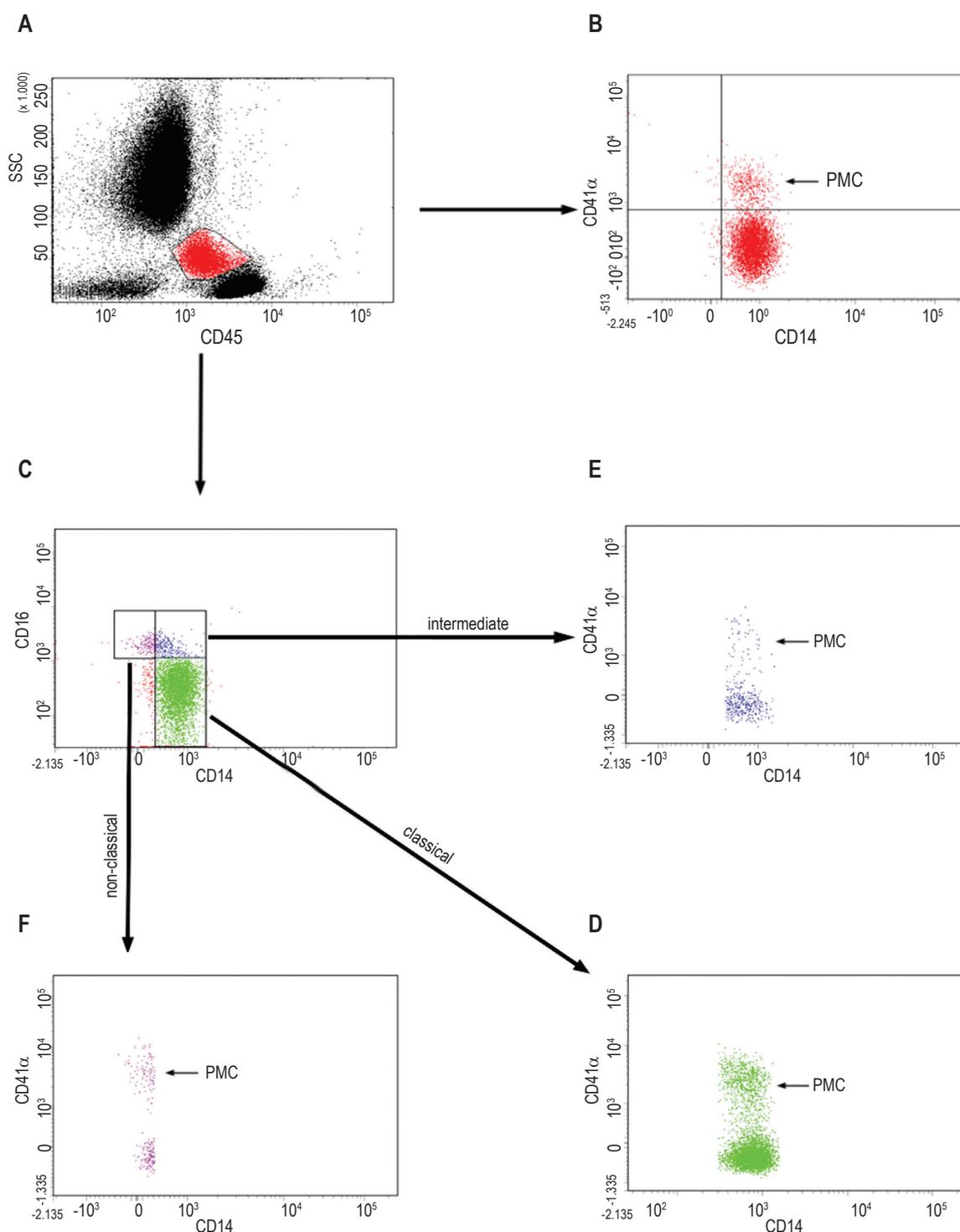
Gating strategy used for determination of unaggregated platelets and representative histogram, demonstrating CD62P expression in this population, are shown in Figure 1. P-selectin (CD62P) is a marker of platelet activation, and levels of CD62P expression in free platelets may be compared to the levels of CD62P expressed by platelets, aggregated with monocytes (PMC). Median percentage of CD62P<sup>+</sup> free platelets in the analyzed samples was 2,7% (0,1-4,6%).

Gating strategy for detection of free monocytes and PMC is shown in Figure 2. This approach ensures quantification of PMC and determination of surface antigenic markers in total monocyte population and monocyte subsets: classical (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>), intermediate (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>), and non-classical (CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>). In the analyzed samples, median percentage of PMC in the total monocyte population was



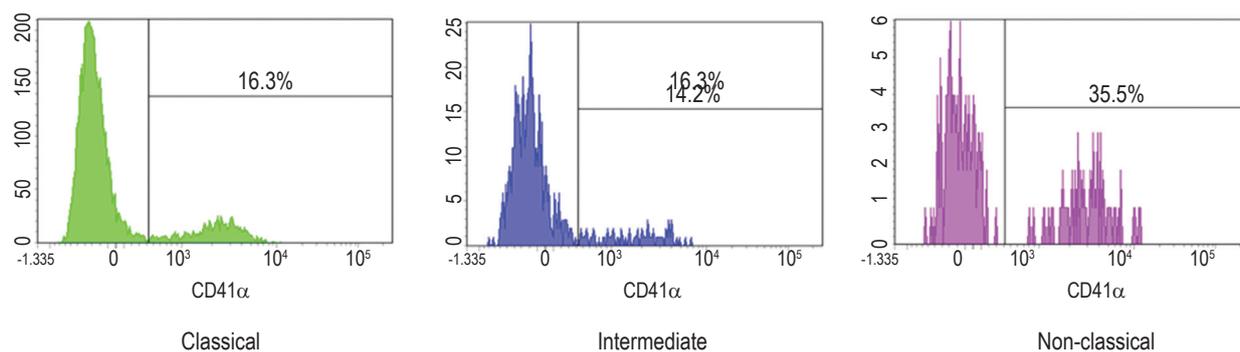
**Figure 1. Analysis of activated platelets in prefixed peripheral blood samples**

Note. A, gating strategy for determination of free platelets. Platelets were identified by staining with specific anti-CD41a antibodies. B, representative histogram of event distribution in the gated region after staining with specific antibodies against CD62P (percentage of activated platelets).



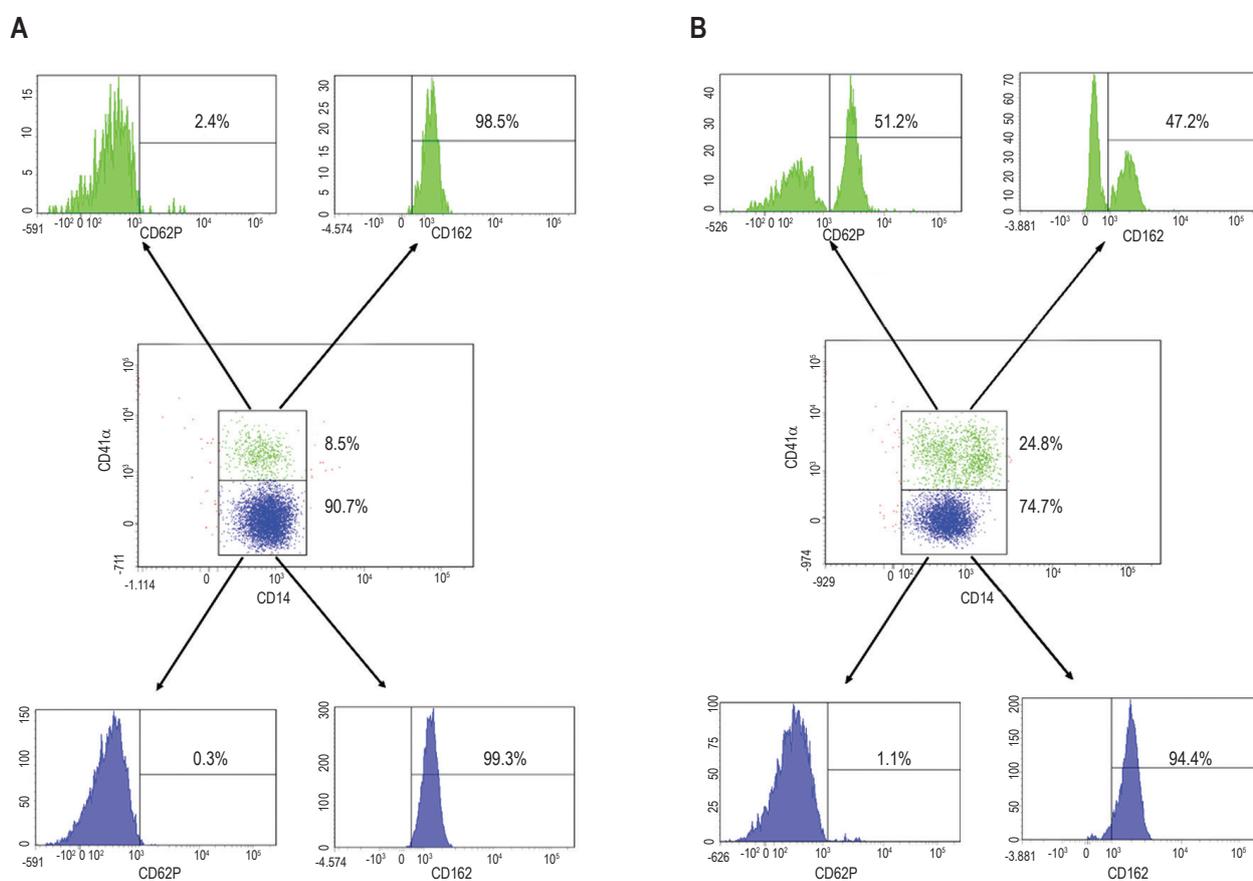
**Figure 2. Gating strategies for the analysis of PMC in the total monocyte population (upper panel) and monocyte subsets (middle and lower panel)**

Note. On SSC/CD45 dot plot the region, corresponding to morphological and phenotypic characteristics of monocytes, was set (A). In the total monocyte population, PMC were identified by co-staining with anti-CD14 and anti-CD41a antibodies (B). Monocyte subsets identified with anti-CD14 and anti-CD16 antibodies (C), were classified as classical (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) (D), intermediate (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) (E), and non-classical (CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>) (F). In the monocyte subsets, PMC were identified as CD41a-positive events.



**Figure 3. Representative histograms of PMC distribution in the monocyte subsets**

Note. Percentages of PMC in the monocyte subsets are shown on the figures.



**Figure 4. Analysis of PMC formation and expression of surface markers of platelets and monocytes in different samples of prefixed peripheral blood**

Note. The marker of platelet activation CD62P (P-selectin) and its ligand CD162 (PGSL-1) were determined on the surface of PMC and free monocytes by staining with corresponding specific antibodies. A, monocyte marker CD162 was expressed by both PMC and free monocytes, whereas platelet marker CD62 was detected in less than 5% PMC. B, PMC, but not free monocytes, demonstrated 50% increase in CD62P expression accompanied by comparable decrease in CD162 level.

12.5% (5.5-16.7%). Representative histograms demonstrate potential of the method to quantify the differences between monocyte subsets in their ability to form complexes with platelets:  $CD14^+CD16^-CD41\alpha^+$ ,

$CD14^{low}CD16^+CD41\alpha^+$ , and  $CD14^+CD16^+CD41\alpha^+$ . Figure 3 demonstrates that in the sample, non-classical ( $CD14^{low}CD16^+$ ) monocytes formed more than twice as many aggregates with platelets as two other

monocyte subsets (classical and intermediate) and total monocyte population.

The suggested method is not only applicable for detection of PMC in total monocyte population and monocyte subsets, but for quantitative characterization of platelet-monocyte interaction in PMC by measuring expression of relevant molecules. Binding of platelet P-selectin (CD62P) to CD162 on the monocyte surface plays a key role in PMC formation. In the majority of peripheral blood samples, analyzed in our study, CD62P expression levels did not exceed 5%, whereas all free monocytes and PMCs were CD162-positive (Figure 4A). However, in two samples significant increase in CD62P expression and decrease in CD162 expression by ~50% was observed (Figure 4B). Noteworthy is that these changes were observed in PMCs (CD14<sup>+</sup>CD41 $\alpha$ <sup>+</sup>), but not in free monocytes (CD14<sup>+</sup>CD41 $\alpha$ <sup>-</sup>). Moreover, percentage of PMC increased, and percentage of free monocytes decreased (Figure 4B). No correlation was revealed between this phenomenon and clinical findings of the patients.

In the analyzed samples, no significant CD40 and CD142 expression was determined. CD11b expression level varied from 1.2 to 35.1% with median value of 14%.

Percentage values obtained with flow cytometry can be converted into absolute values by using data obtained with blood analyzer. Thus, concentrations of PMC and free cells with specific phenotypes can be calculated.

## Discussion

Based on earlier described procedures assuming pre-fixation of blood samples [2, 6, 12], we developed the method of quantifying and phenotypical characterization of PMC in the peripheral blood that can be used for studying the role of platelet-monocyte interactions in the pathogenesis of pregnancy complications.

We used sodium citrate as anticoagulant since it was demonstrated to have a minimal effect on PMC formation [8]. In our preliminary experiments with different anticoagulants we came to the same conclusion. Sodium citrate is anticoagulant of choice in many studies on PMC detection and characterization [2, 7, 11, 12, 16].

In platelet research, special requirements are set in sampling and sample preparation. The procedures should be performed in such a way as to minimize *ex vivo* platelet activation. On the other hand, immunocytochemical staining implies best preservation of native conformation and expression density of the antigenic determinants, recognized by monoclonal antibodies. Mild fixation of biomaterial, containing the cells of interest, meets the requirements. It is achieved

by applying fixing agent (paraformaldehyde) at lower concentrations than those used in the standard protocols. The procedure of immediate fixation, used in our study, provided preservation of antigenic phenotype from blood sampling to laboratory analysis.

The described method excludes undesirable sample handling including sedimentation by centrifugation, cell separation in density gradient, washing with buffer solutions. Thus, immunocytochemical staining with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies was carried out directly in the fixed blood sample.

The panel of specific antibodies and conjugated fluorochromes was set for differential counting of PMC and free platelets and monocytes as well as for effective determination of the levels of expression of inducible antigenic markers on the surface of the cells and aggregates.

The results of the study demonstrate that the suggested method offers a means for a reliable identification of PMC and determination of their activation state in total monocyte population and in the monocyte subsets.

Increased amount of PMC, detected in some samples, accompanied by increased expression of platelet activation marker CD62P and decreased expression of its ligand CD162, suggest changes of activation state of PMC and their roles in pathophysiological mechanisms of some pregnancy complications. To reveal correlation between changes in these parameters and clinical signs of certain pregnancy complications, it is necessary to analyze a considerable amount of blood samples obtained from patients with physiological pregnancy and complicated pregnancies.

Likewise, shift in balance of PMC formed by different monocyte subsets apparently reflects the different roles of these subpopulations in physiological and pathological processes. It is evident that PMC and phenotypic markers of activation should be determined not only in total monocyte population, but also in the monocyte subsets since the alterations occurring in the minor subpopulation may be undetectable in the whole population.

In our study, we used specific antibodies against the surface antigens, that are the hallmarks of proinflammatory and procoagulant monocyte phenotype. CD40L receptor CD40 mediates platelet-monocyte interaction in inflammation and thrombosis [9]. Tissue factor (CD142) plays a key role in the initiation of blood coagulation [17]. Although we did not find significant expression of these factors in the analyzed samples, we believe that determination of CD40 and CD142 should be included in the analysis of PMC in patients with thrombophilic state. Detection of CD11b seems to be useful to characterize adhesive phenotype of free monocytes and PMC. This molecule is a part of leukocyte integrin Mac-1 (CR3, CD18/CD11b)

and mediates various monocyte functions including PMC stabilization by interacting with platelet glycoprotein GPIb [14], binding to complement components, fibrinogen, and ICAM-1 molecules expressed on the surface of endothelial cells.

## Conclusion

We developed accessible and reproducible method, that provides preservation of phenotypic characteristics of PMC and ensures delayed analysis of blood

samples, quantifying of PMC, and determination of activation state. The suggested procedure includes immediate mild fixation, minimal sample handling, optimal gating strategies, and relevant panel of specific antibodies for identification of the differentiation and activation antigenic markers using flow cytometry. We believe that the suggested method can be used for detection and characterization of platelet-monocyte complexes in patients with various pathologies accompanied by inflammation and thrombosis, including pregnancy complications.

## References

1. Aleva F.E., Temba G., de Mast Q., Simons S.O., de Groot P.G., Heijdra Y.F., van der Ven A. Increased platelet-monocyte interaction in stable COPD in the absence of platelet hyper-reactivity. *Respiration*, 2018, Vol. 95, no. 1, pp. 35-43.
2. Allen N., Barrett T.J., Guo Y., Nardi M., Ramkhelawon B., Rockman C.B., Hochman J.S., Berger J.S. Circulating monocyte-platelet aggregates are a robust marker of platelet activity in cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 2019, Vol. 282, pp. 11-18.
3. Dopheide J.F., Rubrech J., Trumpp A., Geissler P., Zeller G.C., Bock K., Dunschede F., Trinh T.T., Dorweiler B., Munzel T., Radsak M.P., Espinola-Klein C. Leukocyte-platelet aggregates-a phenotypic characterization of different stages of peripheral arterial disease. *Platelets*, 2016, Vol. 27, no. 7, pp. 658-667.
4. Finsterbusch M., Schrottmaier W.C., Kral-Pointner J.B., Salzmann M., Assinger A. Measuring and interpreting platelet-leukocyte aggregates. *Platelets*, 2018, Vol. 29, no. 7, pp. 677-685.
5. Freedman J.E., Loscalzo J. Platelet-monocyte aggregates: bridging thrombosis and inflammation. *Circulation*, 2002, Vol. 105, no. 18, pp. 2130-2132.
6. Gerrits A.J., Frelinger A.L. 3<sup>rd</sup>, Michelson A.D. Whole blood analysis of leukocyte-platelet aggregates. *Curr. Protoc. Cytom.*, 2016, Vol. 78, pp. 6.15.1-6.15.10.
7. Granja T., Schad J., Schussel P., Fischer C., Haberle H., Rosenberger P., Straub A. Using six-colour flow cytometry to analyse the activation and interaction of platelets and leukocytes – a new assay suitable for bench and bedside conditions. *Thromb. Res.*, 2015, Vol. 136, no. 4, pp. 786-796.
8. Harding S.A., Din J.N., Sarma J., Jessop A., Weatherall M., Fox K.A., Newby D.E. Flow cytometric analysis of circulating platelet-monocyte aggregates in whole blood: methodological considerations. *Thromb. Haemost.*, 2007, Vol. 98, no. 2, pp. 451-456.
9. Hermann A., Rauch B.H., Braun M., Schror K., Weber A.A. Platelet CD40 ligand (CD40L)-subcellular localization, regulation of expression, and inhibition by clopidogrel. *Platelets*, 2001, Vol. 12, no. 2, pp. 74-82.
10. Joseph J.E., Harrison P., Mackie I.J., Isenberg D.A., Machin S.J. Increased circulating platelet-leucocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Br. J. Haematol.*, 2001, Vol. 115, no. 2, pp. 451-459.
11. Kullaya V., van der Ven A., Mpagama S., Mmbaga B.T., de Groot P., Kibiki G., de Mast Q. Platelet-monocyte interaction in Mycobacterium tuberculosis infection. *Tuberculosis*, 2018, Vol. 111, pp. 86-93.
12. Loguinova M., Pinegina N., Kogan V., Vagida M., Arakelyan A., Shpektor A., Margolis L., Vasileva E. Monocytes of different subsets in complexes with platelets in patients with myocardial infarction. *Thromb. Haemost.*, 2018, Vol. 118, no. 11, pp. 1969-1981.
13. Macey M.G., Bevan S., Alam S., Verghese L., Agrawal S., Beski S., Thuraisingham R., MacCallum P.K. Platelet activation and endogenous thrombin potential in pre-eclampsia. *Thromb. Res.*, 2010, Vol. 125, no. 3, pp. e76-e81.
14. McEver R.P. Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2002, Vol. 14, no. 5, pp. 581-586.
15. Michelson A.D., Barnard M.R., Krueger L.A., Valeri C.R., Furman M.I. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of *in vivo* platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation*, 2001, Vol. 104, no. 13, pp. 1533-1537.
16. Passacuale G., Vamadevan P., Pereira L., Hamid C., Corrigan V., Ferro A. Monocyte-platelet interaction induces a pro-inflammatory phenotype in circulating monocytes. *PLoS ONE*, 2011, Vol. 6, no. 10, e25595. doi: 10.1371/journal.pone.0025595.
17. Shantsila E., Lip G.Y. The role of monocytes in thrombotic disorders. Insights from tissue factor, monocyte-platelet aggregates and novel mechanisms. *Thromb. Haemost.*, 2009, Vol. 102, no. 5, pp. 916-924.

18. Serebryanaya N.B., Shanin S.N., Fomicheva E.E., Yakutseni P.P. Blood platelets as activators and regulators of inflammatory and immune reactions. Part 2. Thrombocytes as participants of immune reactions. *Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 9-20. doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-9-20.

19. Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S., Dalod M., Grau V., Hart D.N., Leenen P.J., Liu Y.J., MacPherson G., Randolph G.J., Scherberich J., Schmitz J., Shortman K., Sozzani S., Strobl H., Zembala M., Austyn J.M., Lutz M.B. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 2010, Vol. 116, no. 16, pp. e74-e80.

---

**Авторы:**

**Павлов О.В.** — д.б.н., ведущий научный сотрудник отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

**Чепанов С.В.** — к.м.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

**Селютин А.В.** — к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

**Зайнуллина М.С.** — д.м.н., главный врач СПб ГБУЗ «Родильный дом № 6 имени профессора В.Ф. Снегирева»; профессор кафедры акушерства, гинекологии и репродуктологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Authors:**

**Pavlov O.V.**, PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

**Chepanov S.V.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Department of Immunology and Cell Interaction, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

**Selutin A.V.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

**Zainulina M.S.**, PhD, MD (Medicine), Head Physician, V. Snegirev Maternity Hospital No. 6; Professor, Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine, First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Еремеева Д.Р.** — к.м.н., заместитель главного врача по качеству СПб ГБУЗ «Родильный дом № 6 имени профессора В.Ф. Снегирева»; ассистент кафедры акушерства, гинекологии и репродуктологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Eremeeva D.R.**, PhD (Medicine), Deputy Head Physician for Quality, V. Snegirev Maternity Hospital No. 6; Assistant Professor, Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine, First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Сельков С.А.** — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующий отделом иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**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 Reproductive Medicine; Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

---

Поступила 27.08.2020  
Принята к печати 09.01.2020

---

Received 27.08.2020  
Accepted 09.01.2020

# ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://mimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Медицинская иммунология» и «Инструкцией по подготовке и отправке статьи», представленной на сайте.

**С 2016 г. в журнале публикуются статьи на русском и на английском языках.**

В журнал принимаются следующие виды публикаций:

## Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками. Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т. д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел **«Благодарности»** не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

## Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано выше.

Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

## Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции

## Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

### Описание статьи из журнала:

Варюшина Е.А., Александров Г.В., Сазонова Т.А., Симбирцев А.С. Изучение влияния местного применения рекомбинантного человеческого интерлейкина-1 $\beta$  на репарацию язвенных повреждений слизистой оболочки желудка // Цитокины и воспаление, 2012. Т. 11, № 1. С. 64-69. [Varyushina E.A., Alexandrov G.V., Sazonova T.A., Simbirtsev A.S. Study of the effect of local application of recombinant human interleukin-1 $\beta$  in the repair of ulcerative lesions of gastric mucosa. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no. 1, pp. 64-69. (In Russ.)]

### Описание статьи из книги (монографии):

Соколова Г.Н., Потапова В.Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис, 2009. 328 с. [Sokolova G.N., Potapova V.B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. Moscow: Anacharsis, 2009. 328 p.]

### Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Wells S.M., Kantor A.B., Stall A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B-cell subsets. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5503-5515.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G., Appleton and Lange, 1994, pp. 66-79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

## Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL»,

а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.), регламентированного международными правилами.

### Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, то есть ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором. Весь иллюстративный материал присылается в двух экземплярах и на диске в виде отдельных файлов.

### Размеры иллюстраций:

- максимальная высота – 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца – 82 мм, для 2 столбцов – 170 мм

**Таблицы.** Каждая таблица печатается на отдельном листе (в отдельном файле на диске) через 2 интервала. Нумерация таблиц дается арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (\*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (\*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

**Рисунки (графики и фотографии).** В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их использования в тексте статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка на отдельную страницу. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. На обороте каждой иллюстрации подписывается фамилия первого автора, название статьи и порядковый номер. Для публикации в журнале принимаются только оригиналы фотографий (не ксерокопии) хорошего качества, максимально приближенные к вышеуказанным размерам.

Фотографии не должны иметь больших полей, т.е. фотографический материал должен занимать всю площадь фотографии. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tiff (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

### Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Медицинская иммунология» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

### Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

- А. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Также авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Медицинская иммунология» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации, книги или монографии. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
- Б. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
- В. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
  - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
    - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках).
    - Название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах).

- Почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках).
  - Телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail.
  - Фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности.
  - Полное название статьи, направляемой в редакцию.
  - Количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц.
  - Указать, для какого раздела журнала предназначена работа: оригинальные статьи, лекции, обзоры, «точка зрения», краткие сообщения, новые иммунологические методы, случаи из практики, дневник иммунолога, книжное обозрение.
  - Дата отправления работы.
- 2) Отсканированная копия файла с метаданными, подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)
- 3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:
- название статьи (без использования каких-либо сокращений) (на русском и английском языках);
  - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность всех авторов (полностью) (на русском и английском языках);
  - подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа (если в работе участвовали авторы из разных учреждений, это должно быть отмечено звездочками) (в русском и официально принятом английском вариантах);
  - сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания) (на русском и английском языках);
  - не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
  - адрес для переписки с указанием телефона, номера факса и адреса e-mail.
- 4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме 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

Абакумова Т.В. ....	339	Гривцова Л.Ю. ....	381	Мелашенко Е.С. ....	207	Сидоров И.А. ....	353
Абакушина Е.В. ....	381	Долгова Е.В. ....	257	Мелашенко О.Б. ....	207	Сизиков А.Э. ....	327
Агарков Н.М. ....	303	Дрожжина М.Б. ....	237	Милютин Ю.П. ....	275	Симонов А.Н. ....	293
Агеева А.А. ....	389	Дружинина Ю.Г. ....	257	Моренкова А.Ю. ....	327	<u>Симоныч Е.В.</u> ....	389
Агеев Ю.И. ....	389	Дьяков И.Н. ....	245	Москалева Е.О. ....	303	Снегирева Н.А. ....	245
Александрова Е.П. ....	275	Еремеева Д.Р. ....	401	Мун С.А. ....	369	Соколов Д.И. ....	275
Андросова Л.В. ....	293	Жигарев Д.И. ....	223	Мучукова О.М. ....	353	Станевич О.В. ....	311
Антонеева И.И. ....	339	Журавлева Н.В. ....	353	Нерсесян С.Л. ....	369	Сулутьян А.Э. ....	327
Арсентьева Н.А. ....	311	Зайнулина М.С. ....	401	Норкин И.К. ....	207	Суслова Е.В. ....	237
Базарный В.В. ....	345	Карзакова Л.М. ....	353	Одинцова А.В. ....	353	Тихонова М.А. ....	327
Балабас О.А. ....	275	Кирикович С.С. ....	257	Оленникова Р.В. ....	369	Тоголян Арег А. ....	311
Баторов Е.В. ....	327	Клюшник Т.П. ....	293	Осиков М.В. ....	389	Тыринова Т.В. ....	327
Бацунов О.К. ....	311	Коломиец В.И. ....	303	Останин А.А. ....	257, 327	Усеинова Р.Х. ....	231
Белоглазов В.А. ....	231	Корневский А.В. ....	275	Павлов О.В. ....	401	Ухтерова Н.Д. ....	353
Березкина М.Э. ....	275	Корнеева С.И. ....	303	Пасова И.А. ....	381	Филипенко М.Л. ....	369
Богачев С.С. ....	257	Коробова З.Р. ....	311	Пашков Е.П. ....	245	Хазиахматова О.Г. ....	207
Бодиенкова Г.М. ....	395	Кудряшов С.И. ....	353	Певцов Д.Э. ....	311	Хлусов И.А. ....	207
Боклаженко Е.В. ....	395	Куликов А.Н. ....	311	Поленок Е.Г. ....	369	Хорева М.В. ....	223
Вараксин Н.А. ....	257	Лебедева А.А. ....	311	Полушина Л.Г. ....	345	Чепанов С.В. ....	401
Воробьева С.В. ....	311	Левитес Е.В. ....	257	Пономарева Н.В. ....	293	Черных Е.Р. ....	257, 327
Воробьев Е.А. ....	311	Леплина О.Ю. ....	257	Проскурина А.С. ....	257	Чернышова И.Н. ....	245
Воронина Е.Н. ....	369	Лиознов Д.А. ....	311	Риттер Г.С. ....	257	Чумасова О.А. ....	327
Гаврилова М.В. ....	245	Литвинова Л.С. ....	207	Рузанова В.С. ....	257	Шарапова М.А. ....	311
Гаврилова Э.С. ....	353	Луткова Т.С. ....	353	Рыжикова С.Л. ....	257	Шевела Е.Я. ....	257
Ганковская Л.В. ....	223	Любимова Н.Е. ....	311	Рябичева Т.Г. ....	257	Шуныкин Е.О. ....	207
Гельм Ю.В. ....	381	Макконен К.Ф. ....	303	Светлакова Е.Н. ....	345	Юрова К.А. ....	207
Генинг С.О. ....	339	Максимова А.Ю. ....	345	Свитич О.А. ....	245	Яцков И.А. ....	231
Генинг Т.П. ....	339	Малашенко В.В. ....	207	Сельков С.А. ....	275, 401		
Глушков А.Н. ....	369	Мандра Ю.В. ....	345	<u>Селютин А.В.</u> ....	401		
Гордеева Л.А. ....	369	Маркова К.Л. ....	275	<u>Сидорова Е.В.</u> ....	245		

# ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

активация <i>in vitro</i> ....	381	моноцитарные миелоидные		цитокины ....	208, 238, 258, 312
активность клеток ....	381	супрессорные клетки ....	328	чувствительность ....	345
ангиогенез ....	339	моноциты ....	276, 402	экспрессия ....	232
анкилозирующий спондилит ....	328	мультиплексный анализ ....	312	V1-клетки ....	245
апоптоз ....	389	невынашивание беременности ....	370	CCL18 ....	238
артериальная гипертензия ....	304	нейтрофилы ....	339	COVID-19 ....	312
атопический дерматит ....	238	некроз ....	389	CXCL9 ....	238
аутоиммунные заболевания ....	328	ОВИН ....	354	CXCL10 ....	238
белок TWEAK ....	238	острый миелоидный лейкоз ....	224	HLA-G ....	370
воспаление ....	232, 276, 328	периферическая кровь ....	402	IFN $\gamma$ ....	238
генетический полиморфизм ....	370	пожилые ....	304	IgA ....	245
гены ....	208	полиморфизм ....	232	IgM ....	245
гипометилирующие препараты ....	224	поствакцинальный иммунитет ....	354	IL-1 $\beta$ ....	339
гранулоцитарные миелоидные		протеомный анализ ....	276	IL-2 ....	381
супрессорные клетки ....	328	противоопухолевый иммунитет ....	224	IL-4 ....	238
декстран ....	245	проточная цитофлуориметрия ....	402	IL-5 ....	238
дендритные клетки ....	258	псориаз ....	238	IL-6 ....	339
дермальная пленка ....	389	рак эндометрия ....	339	IL-12 ....	381
диагностика ....	395	ранние проявления		IL-13 ....	238
иммунная система ....	395	нейроинтоксикации ....	395	IL-15 ....	381
иммунный ответ ....	276	регистр первичных		IL-17 ....	395
иммунофенотипирование ....	402	иммунодефицитов ....	354	IL-17A ....	339
источник клеток ....	208	реконвалесценты ....	312	IL-22 ....	238
кишечник ....	245	ротовая жидкость ....	345	IL-25 ....	238
кластерный анализ ....	294	ртуть ....	395	IL-31 ....	238
клеточная иммунотерапия ....	381	селективный дефицит IgA ....	354	KIR-рецепторы ....	224
лимфоциты ....	381, 389	специфичность ....	345	LPS ....	232
макрофаг-активирующий фактор		сывороточные интерлейкины ....	304	MALDI-масс-спектрометрия ....	276
(GcMAF-RF) ....	258	T-независимый антиген 2-го типа ....	245	NF-kB-сигналинг ....	339
макрофаги ....	258, 276	термическая травма ....	389	NK-клетки ....	224
маркеры воспаления ....	294	тромбоцитарно-моноцитарные		S100A ....	238
маркеры дифференцировки ....	208	комплексы ....	402	SARS-CoV-2 ....	312
мелатонин ....	389	тромбоциты ....	402	TLR4 ....	232
метаболический синдром ....	304	условно здоровые люди ....	294	VEGF-A ....	339
механотрансдукция ....	208	факторы транскрипции ....	208	X-сцепленная агаммаглобулинемия ..	354
миелодиспластический синдром ....	224	физиологический резерв ....	381	$\gamma\delta$ T-клетки ....	245
миелоидные супрессорные клетки		хемокины ....	208, 312, 345		
ранних стадий дифференцировки ....	328	ХОБЛ ....	232		
микровезикулы ....	276	хроническая ртутная интоксикация ..	395		
миома матки ....	339	хронический пародонтит ....	345		