

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ КОМПЛЕКСА АНТИГЕНОВ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ НА АКТИВАЦИЮ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРА CD54 КЛЕТКАМИ ПРОМОНОЦИТАРНОЙ ЛИНИИ ЧЕЛОВЕКА U937

Калиниченко Е. О. ¹,
Козырева О. В. ¹,
Сидоров Н. Г. ¹,
Сорокина Е. В. ¹,
Михайлова Н. А. ¹

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

**ASSESSMENT OF THE EFFECT OF A COMPLEX OF ANTIGENS FROM
OPPORTUNISTIC BACTERIA ON THE ACTIVATION OF CD54
RECEPTOR EXPRESSION BY HUMAN PROMONOCYTIC CELL LINE
U937**

Kalinichenko E. O. ^a,
Kozyreva O. V. ^a,
Sidorov N. G. ^a,
Sorokina E. V. ^a,
Mikhailova N. A. ^a

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

Резюме

Условно-патогенные бактерии играют важную роль в развитии респираторных инфекций, характеризующихся высокой заболеваемостью и смертностью. Перспективным направлением является применение препаратов на основе антигенов условно-патогенных бактерий, стимулирующих иммунитет. Важной задачей при их создании становится определение методов оценки и маркеров, отражающих усиление иммунного ответа. Известно, что для таких целей представляет интерес стимуляция миелоидных клеток. В качестве модели для анализа функциональной активности моноцитов и макрофагов широко применяется клеточная линия U937. Экспрессия рецептора молекулы CD54 (ICAM-1), в условиях воспалительной стимуляции значительно возрастает на поверхности иммунных клеток, что позволяет рассматривать его как маркер активации компонентов врождённого иммунитета, включая клетки линии U937. В исследовании изучена активация экспрессии рецептора CD54 (ICAM-1) клетками человеческой промоноцитарной линии U937 под воздействием двух вариантов комплекса антигенов условно-патогенных бактерий: с добавлением иммуностимулирующего сополимера и без него. В состав комплекса антигенов входили антигены из 4 видов условно-патогенных бактерий: *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*. В качестве дополнительного иммуностимулирующего агента использовали сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона гидрохлорида. Для оценки экспрессии CD54 (ICAM-1) на клетках U937 использовали метод проточной цитометрии. Клетки стимулировали пептидогликаном *S. aureus* (положительный контроль) и исследуемыми вариантами комплекса антигенов условно-патогенных бактерий. Активность клеток оценивали с помощью коэффициента активации, отражающего увеличение экспрессии CD54. Значение коэффициента активации положительного контроля считалось убедительным при достижении не менее 50% (активация клеток эталонным антигеном), в то время как активация клеток под действием исследуемых вариантов комплекса антигенов условно-патогенных бактерий признавалась значимой при коэффициенте активации не менее 30%. Показано, что оба варианта и положительный контроль индуцировали дозозависимое увеличение экспрессии CD54. Оптимальная концентрация стимуляции соответствовала 25 мкг/мл. Выявленный эффект подтвердил способность комплекса антигенов условно-патогенных бактерий активировать клетки моноцитарно-макрофагального ряда и усиливать врожденный иммунный ответ. Полученные результаты подчеркивают значимость использования ICAM-1 как маркера активации иммунных клеток. Апробированный метод является перспективным для оценки эффективности препаратов на основе условно-патогенных бактерий.

Ключевые слова: U937, моноциты, активация клеток, врожденный иммунитет, ICAM-1, CD54, антигены условно-патогенных бактерий.

Abstract

Opportunistic pathogens play a significant role in the development of respiratory infections, characterized by high morbidity and mortality. A promising approach involves the use of drugs based on antigens of opportunistic bacteria that stimulate the immune system. An important task in their development is the identification of evaluation methods and markers reflecting the enhancement of the immune response. Stimulation of myeloid cells is known to be of particular interest for this purpose. The U937 human promonocytic cell line is widely used as a model to analyze the functional activity of monocytes and macrophages. The expression of the CD54 (ICAM-1) receptor significantly increases on the surface of immune cells under inflammatory stimulation, making it a suitable marker for assessing innate immune activation, including in U937 cells. This study examined CD54 expression in U937 cells in response to two variants of the antigen complex of opportunistic bacteria: with and without the addition of an immunostimulatory copolymer. The antigen complex included antigens from four species: *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*. The additional immunostimulating agent was a copolymer of 2-methyl-5-vinylpyridine and N-vinylpyrrolidone hydrochloride. CD54 expression on U937 cells was assessed using flow cytometry. Cells were stimulated with *S. aureus* peptidoglycan (positive control) and the two antigen complex variants. Activation was evaluated using an activation coefficient, reflecting the increase in CD54 expression. A coefficient of $\geq 50\%$ for the positive control indicated a robust response, while $\geq 30\%$ was considered significant for the test samples. Both antigen complex variants and the positive control induced dose-dependent increases in CD54 expression, with an optimal concentration of 25 $\mu\text{g/mL}$. The observed effect confirmed the ability of the antigen complex of opportunistic pathogens to activate monocyte-macrophage cells and enhance the innate immune response. The obtained results emphasize the importance of using ICAM-1 as a marker of immune cell activation. The tested method proves to be promising for evaluating the effectiveness of drugs based on opportunistic bacteria.

Keywords: U937, monocytes, cell activation, innate immunity, ICAM-1, CD54, antigens of opportunistic bacteria.

1 Введение

Условно-патогенные бактерии являются значимыми возбудителями респираторных инфекций, характеризующихся широкой распространенностью, высокой заболеваемостью и смертностью во всем мире. Терапевтические стратегии с использованием антибактериальных средств оказались недостаточно эффективными, особенно у иммунокомпрометированных больных [4, 6, 7]. В связи с этим возникла необходимость усилить иммунный ответ с помощью препаратов, стимулирующих систему врожденного иммунитета, в частности, лекарственных средств на основе условно-патогенных бактерий [5].

При разработке таких препаратов важно определить методы оценки и маркеры, которые будут указывать на усиление системы врожденного иммунитета.

Известно, что для таких целей представляет интерес стимуляция миелоидных клеток. В качестве модельных клеток для исследования функций моноцитов и макрофагов часто используется клеточная линия U937, полученная из клеток гистиоцитарной лимфомы человека, так как по своей функциональной активности она схожа с промоноцитами [8, 10].

Согласно литературным данным, рецептор молекулы CD54 (ICAM-1), являясь поверхностным гликопротеином и адгезионным рецептором, играет ключевую роль в привлечении лейкоцитов из кровотока в очаги воспаления. Экспрессия ICAM-1 активно индуцируется на иммунных клетках в ответ на воспалительную стимуляцию [3], что позволяет использовать его как маркер активации клеток врожденного иммунитета, в том числе на клетках U937 [2, 9].

Цель. Исследовать активацию экспрессии рецептора CD54 (ICAM-1) клетками человеческой промоноцитарной линии U937 под воздействием комплекса антигенов условно-патогенных бактерий.

2 Материалы и методы

В работе использовали комплекс антигенов условно-патогенных бактерий (КА), а также КА с добавлением сополимера 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона гидрохлорида (КА + сополимер), в качестве дополнительного иммуностимулятора. КА получали из смеси антигенов условно-патогенных бактерий *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* методом, описанным в патенте [1].

Культура клеток U937 была получена в криоконсервированном виде (ООО «ПраймБиоМед», Россия). Пробирку размораживали на водяной бане при 37 °С, затем клетки отмывали от среды, добавляя их в пробирку с 9 мл среды RPMI-1640 («Панэко», Россия) и центрифугировали 5 мин при 300 g. После этого клетки сеяли в 25-мл флаконы с расчетной плотностью 1 млн/мл в питательную среду RPMI-1640 с добавлением 25 mM HEPES, 10% инактивированной фетальной телячьей сыворотки, L-глутамина (2 mM), пенициллина (50 ЕД/мл) и стрептомицина (50 мкг/мл). Флаконы с культурой

инкубировали в CO₂-инкубаторе MCO 19AIC («Sanyo», Япония) при 37 °C и 5% CO₂, пересеивая клетки в свежую среду раз в 4-7 дней. Для опыта использовали клетки, находившиеся не более чем на 5-м пассаже.

Для эксперимента по активации клеток готовили бедную культуральную среду RPMI-1640, содержащую 0,5% инактивированной фетальной телячьей сыворотки, 25 mM HEPES, L-глутамин (2 mM), пенициллин (50 ЕД/мл) и стрептомицин (50 мкг/мл). Подготовленную среду использовали для отмывания выращенных клеток U937 от среды культивирования, как описано выше, и ресуспендировали в ней до концентрации 2 млн/мл. В 48-луночный культуральный планшет добавляли по 250 мкл суспензии клеток в 21 лунку: 3 лунки предназначались для отрицательного контроля (без добавления ростовых факторов), 9 лунок — для положительного контроля (пептидогликан *S.aureus* в трех разведениях), и еще 9 лунок — для исследуемого КА. Инкубировали 18 ч при 37 °C и 5% CO₂. После этого в лунки отрицательного контроля добавляли по 250 мкл среды, в лунки положительного контроля — по 250 мкл среды с пептидогликаном *S. aureus* («Merck», США) в конечной концентрации 25, 12,5 и 6,25 мкг/мл, а в оставшиеся лунки — исследуемый КА в тех же концентрациях. Инкубировали 18 ч при 37 °C и 5% CO₂.

После этого отбирали по 30 мкл суспензии клеток из каждой лунки и переносили в цитометрические пробирки. В пробирки добавляли по 3 мкл раствора меченых фикоэритрином антител к CD54, и инкубировали 20 мин в отсутствии света. Затем добавляли по 20 мкл раствора OptiLyse C («Beckman Coulter», США) для фиксации клеток и инкубировали 15 мин при комнатной температуре в отсутствии света. Пробы отмывали, добавляя по 5 мл фосфатно-солевого буфера, и центрифугировали со скоростью 1000 об/мин в течение 3 мин на центрифуге LMC-3000 («Biosan», Латвия) и удаляли супернатант. Процедуру повторяли трижды. После отмывки меченые антителами клетки ресуспендировали в 500 мкл фосфатно-солевого буфера и анализировали пробы на проточном цитометре Cytomics FC-500 («Beckman Coulter», США).

Окно клеточной популяции определяли путем оценки фронтального и бокового светорассеивания (ориентируясь на размеры клеток, чтобы исключить из анализа клеточный детрит); в окне оценивали 10000 клеток, измеряя среднюю интенсивность флуоресценции (mean fluorescence intensity, MFI) в канале FL2 по показателю Xmean.

Коэффициент активации клеток в опыте и положительном контроле рассчитывали, как отношение разности средних арифметических значений MFI по трём пробам в соответствующем образце (опыт или положительный контроль) и отрицательном контроле к среднему арифметическому значению MFI в отрицательном контроле. Результат выражали в процентах.

Коэффициент активации положительного контроля считался убедительным при достижении значения не менее 50%. Активация клеток под действием исследуемых вариантов КА признавалась значимой при коэффициенте активации не менее 30%.

Статистический анализ полученных данных был проведен с использованием языка программирования Python. Достоверность различий между группами устанавливали с помощью U-критерия Манна-Уитни. Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

3 Результаты и обсуждение

В проведенных опытах на клетках U937, находящихся на 2–4 пассажах, выявлена экспрессия рецептора CD54 при стимуляции пептидогликаном и обоими вариантами КА (Табл. 1-3). Прирост экспрессии варьировал как в положительном контроле, так и в вариантах с КА, при этом зафиксирован устойчивый дозозависимый эффект на экспрессию CD54, что свидетельствовало об активирующем воздействии исследуемых вариантов КА на клетки моноцитарно-макрофагального ряда. Полученные результаты демонстрировали способность КА стимулировать реакции врожденного иммунного ответа.

Оба исследуемых варианта КА в дозозависимой манере влияли на активацию экспрессии рецептора CD54 (ICAM-1) клетками промоноцитарной линии человека U937. Целевая степень активации устойчиво наблюдалась в концентрации 25 мкг/мл. Таким образом, данный метод и маркер являются перспективными инструментами для оценки активации клеток врожденного иммунитета в ответ на применение лекарственных средств на основе условно-патогенных бактерий.

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Стимуляция экспрессии CD54 на втором пассаже культуры U937.
Table 1. Stimulation of CD54 expression in the second passage of U937 cell culture.

	Дозы, мкг/мл Dose, µg/ml	Комплекс антигенов Antigen complex		Комплекс антигенов + сополимер Antigen complex + copolymer	
		Уровень экспрессии CD54 (MFI) M ± σ CD54 Expression Level (MFI) M ± σ	Рост экспрессии CD54, % Growth of CD54 Expression n , %	Уровень экспрессии CD54 (MFI) M ± σ CD54 Expression Level (MFI) M ± σ	Рост экспрессии CD54, % Growth of CD54 Expression, %
Отрицательный контроль Negative Control	0	13,17±0,61	0	12,87±2,68	0
Положительный контроль Positive Control	6,25	16,1±1,49*	22,25	21,63±1,5*	68,07
	12,5	20,13±0,95*	52,85	31,3±2,39*	143,2
	25	25,47±6,23*	93,39	37,5±1,61*	191,38
Исследуемый препарат Investigated Compound	6,25	15,9±0,66*	20,73	18,13±0,96*	40,87
	12,5	18,03±0,93*	36,9	21,6±1,25*	67,83
	25	18,57±2,02*	41	24,03±1,89*	86,71

Примечание. M – средняя арифметическая; σ – стандартное отклонение; * p < 0,05 – достоверность различий по сравнению с отрицательным контролем (Mann–Whitney U test).

Note. M, the arithmetic mean; σ, the standard deviation; * p < 0.05, the reliability of differences compared to the negative control (Mann–Whitney U test).

Таблица 2. Стимуляция экспрессии CD54 на третьем пассаже культуры U937.
Table 2. Stimulation of CD54 expression in the third passage of U937 cell culture.

	Дозы, мкг/мл Dose, µg/ml	Комплекс антигенов Antigen complex		Комплекс антигенов + сополимер Antigen complex + copolymer	
		Уровень экспрессии CD54 (MFI) M ± σ CD54 Expression Level (MFI) M ± σ	Рост экспрессии CD54, % Growth of CD54 Expression n , %	Уровень экспрессии CD54 (MFI) M ± σ CD54 Expression Level (MFI) M ± σ	Рост экспрессии CD54, % Growth of CD54 Expression n , %
Отрицательный контроль Negative Control	0	15,77±0,55	0	11,78±1,8	0
Положительный контроль Positive Control	6,25	18,93±0,21*	20,04	18,57±0,45*	57,64
	12,5	22,87±0,75*	45,02	23,8±1,21*	102,04
	25	25,47±1,31*	61,51	30,3±1,4*	157,22
Исследуемый препарат Investigated Compound	6,25	18,47±0,86*	17,12	16,27±0,59*	38,12
	12,5	20,3±0,69*	28,73	17±1*	44,31
	25	23,13±0,4*	46,67	20,1±0,53*	70,63

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1

Таблица 3. Стимуляция экспрессии CD54 в четвертом пассаже культуры клеток U937.

Table 3. Stimulation of CD54 expression in the fourth passage of U937 cell culture.

	Дозы, мкг/мл Dose, µg/ml	Комплекс антигенов Antigen complex		Комплекс антигенов + сополимер Antigen complex + copolymer	
		Уровень экспрессии CD54 (MFI) M ± σ CD54 Expression Level (MFI) M ± σ	Рост экспрессии CD54, % Growth of CD54 Expression n , %	Уровень экспрессии CD54 (MFI) M ± σ CD54 Expression Level (MFI) M ± σ	Рост экспрессии CD54, % Growth of CD54 Expression n , %
Отрицательный контроль Negative Control	0	15,2±0,99	0	16,83±0,35	0
Положительный контроль Positive Control	6,25	18,65±0,92*	22,7	21,97±0,78*	30,54
	12,5	22,3±0,14*	46,71	26,3±1,73*	56,27
	25	31,1±0,85*	104,61	33,4±3*	98,45
Исследуемый препарат Investigated Compound	6,25	17,8±0,57*	17,11	19,9±1,68*	18,24
	12,5	19,75±0,64*	29,93	19,63±1,72*	16,64
	25	22,65±1,91*	49,01	23,13±1,17*	37,43

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Сидоров Никита Геннадьевич – аспирант, младший научный сотрудник лаборатории протективных антигенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»;

адрес: Москва, 105064, Россия, Малый Казенный пер., 5а;

телефон/факс: 8(495)917-49-00;

e-mail: deel@yandex.ru

Nikita G. Sidorov – Post-Graduate Student, Junior Researcher, Laboratory of Protective Antigens, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera;

address: 5a Maly Kazenny Lane, Moscow, 105064, Russian Federation;

telephone/fax: 8(495)917-49-00;

e-mail: deel@yandex.ru

Блок 2. Информация об авторах

Калиниченко Е.О. – к.м.н., научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия;

Kalinichenko E.O., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Mechanisms of Regulation of Immunity, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Козырева О.В. – научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия;

Kozyreva O.V., Research Associate, Laboratory of Mechanisms of Regulation of Immunity, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

Михайлова Н.А. – д.м.н., профессор, заведующая лабораторией протективных антигенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия;

Mikhailova N.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Protective Antigens, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

Сорокина Е.В. – д.м.н., профессор, заведующая лабораторией механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия;

Sorokina E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Mechanisms of Regulation of Immunity, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia.

Блок 3. Метаданные статьи

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ КОМПЛЕКСА АНТИГЕНОВ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ НА АКТИВАЦИЮ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРА CD54 КЛЕТКАМИ ПРОМОНОЦИТАРНОЙ ЛИНИИ ЧЕЛОВЕКА U937

ASSESSMENT OF THE EFFECT OF A COMPLEX OF ANTIGENS FROM OPPORTUNISTIC BACTERIA ON THE ACTIVATION OF CD54 RECEPTOR EXPRESSION BY HUMAN PROMONOCYTIC CELL LINE U937

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

АНТИГЕНЫ И ЭКСПРЕССИЯ CD54 В U937

ANTIGENS & CD54 EXPRESSION IN U937

Ключевые слова: U937, моноциты, активация клеток, врожденный иммунитет, ICAM-1, CD54, антигены условно-патогенных бактерий.

Keywords: U937, monocytes, cell activation, innate immunity, ICAM-1, CD54, antigens of opportunistic bacteria.

Школа Клинической Иммунологии "Сочи-2025".

Количество страниц текста – 4,

Количество таблиц – 3,

Количество рисунков – 0.

16.04.2025

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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 или ее doi.
1	Михайлова Н.А., Солдатенкова А.В., Грубер И.М., Курбатова Е.А., Свитич О.А., Зверев В.В., Лазарев С.А., Асташкина Е.А. Способ получения поликомпонентной вакцины на основе антигенов условно-патогенных микроорганизмов. Патент РФ No 2799527. <i>Опубликован 05.07.2023 Бюл. no 19.</i>	Mikhajlova N. A., Soldatenkova A. V., Gruber I. M., Kurbatova E. A., Svitich O. A., Zverev V. V., Lazarev S. A., Astashkina E. A. Method of obtaining a multicomponent vaccine based on antigens of opportunistic microorganisms. Patent RU No 2799527. <i>Publ. 05.07.2023 Bull. no 19.</i>	https://www.elibrary.ru/item.asp?id=54203461
2	Ade N., Martinozzi-Teissier S., Pallardy M., Rousset F. Activation of U937 cells by contact sensitizers: CD86 expression is independent of apoptosis. <i>J Immunotoxicol.</i> , 2006, Vol. 3, no.4, pp.189-197.	—	doi:10.1080/15476910600978038
3	Bui T.M., Wiesolek H.L., Sumagin R. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury	—	doi:10.1002/JLB.2MR0220-549R

	resolution, and tumorigenesis. <i>J Leukoc Biol.</i> , 2020, Vol. 108, no.3, pp. 787-799.		
4	Calderaro A., Buttrini M., Farina B., Montecchini S., De Conto F., Chezzi C. Respiratory Tract Infections and Laboratory Diagnostic Methods: A Review with A Focus on Syndromic Panel-Based Assays. <i>Microorganisms</i> , 2022, Vol. 10, no. 9, 1856.	—	doi:10.3390/microorganisms10091856
5	Cazzola M., Anapurapu S., Page C.P. Polyvalent mechanical bacterial lysate for the prevention of recurrent respiratory infections: a meta-analysis. <i>Pulm Pharmacol Ther.</i> 2012, Vol. 25, no. 1, pp. 62–68.	—	doi: 10.1016/j.pupt.2011.11.002
6	GBD 2021 Upper Respiratory Infections Otitis Media Collaborators. Global, regional, and national burden of upper respiratory infections and otitis media, 1990–2021: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2021.	—	doi: 10.1016/S1473-3099(24)00430-4

	<i>Lancet Infect Dis.</i> 2025, Vol. 25, no.1, pp. 36–51.		
7	Lee R.A., Boucher H.W. Respiratory Tract Infections in the Postpandemic Era: A Return to Basics and Call to Action. <i>Infect Dis Clin North Am.</i> , 2024, Vol. 38, no.1, pp. xiii–xv.	—	doi: 10.1016/j.idc.2023.11.002
8	Nascimento C.R., Rodrigues Fernandes N.A., Gonzalez Maldonado L.A., Rossa Junior C. Comparison of monocytic cell lines U937 and THP-1 as macrophage models for in vitro studies. <i>Biochem Biophys Rep.</i> , 2022, no. 32, 101383.	—	doi: 10.1016/j.bbrep.2022.101383
9	Piroird C., Ovigne J.M., Rousset F., Martinozzi-Teissier S., Gomes C., Cotovio J., Alépée N. The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. <i>Toxicol In Vitro.</i> , 2015, Vol. 29, no. 5, pp. 901-916.	—	doi: 10.1016/j.tiv.2015.03.009

10	Sundström C., Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). <i>Int J Cancer.</i> , 1976, <i>Vol.17, no.5, pp. 565-77.</i>	—	doi: 10.1002/ijc.2910170504
----	---	---	-----------------------------