

ISSN 1028-7221

Том 24, № 3. С. 349-448

2021

Официальный журнал  
Российского Научного Общества Иммунологов

25  
лет

РОССИЙСКИЙ  
ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ  
ЖУРНАЛ



RUSSIAN JOURNAL  
OF IMMUNOLOGY

Official Journal  
of Russian Society of Immunology

Volume 24  
Number 3

2021



# ПанЭко

ВСЁ ДЛЯ ВАШЕЙ ЛАБОРАТОРИИ

## Питательные среды для культивирования лимфоцитов



Научно-производственное  
предприятие

### «ПанЭко»

Было организовано на базе Медико-генетического научно-го центра РАМН в 1990 г.

Наша специализация - полное обеспечение работ с культурами клеток. Имеется собственное производство сухих и жидких питательных сред.

Контроль качества осуществляется на всех стадиях технологического процесса: от входного контроля сырья до готового продукта в соответствии с ISO 13485-2017.

Мы изготавливаем питательные среды, растворы, диссоциирующие агенты, митогены, наборы для цитогенетики и среды для ЭКО.

Предлагаем питательные среды и реактивы для выделения и культивирования лимфоцитов из цельной крови и клеток амниотической жидкости.

Культивированные *in vitro* клетки применяются в цитогенетических исследованиях и других диагностических целях.

#### Фиколла раствор

Для выделения лимфоцитов, моноцитов и нейтрофилов из цельной крови.



#### Лимфоген\*

Для культивирования лимфоцитов крови с целью их последующего использования в диагностических целях.

#### Лимфокар-2

Содержит ФГА для культивирования лимфоцитов крови с целью получения делящихся клеток и последующего анализа метафазных хромосом.



#### Амниокар

Для культивирования клеток амниотической жидкости и хориона с целью получения обогащенной популяции клеток и последующего анализа метафазных хромосом.



\* - Продукт имеет Регистрационное Удостоверение Росздравнадзора.

\* - Продукт находится на стадии регистрации.



[www.paneco-ltd.ru](http://www.paneco-ltd.ru)



[info@paneco.ru](mailto:info@paneco.ru)



8-800-550-72-31

РОССИЙСКОЕ НАУЧНОЕ ОБЩЕСТВО ИММУНОЛОГОВ  
(РНОИ)

---

# РОССИЙСКИЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

июль-сентябрь

**2021, том 24**

**№. 3**

---

Основан в 1996 году

## Главный редактор

**Черешнев Валерий Александрович** – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, научный руководитель Института иммунологии и физиологии, президент Российского Научного Общества Иммунологов, Екатеринбург, Россия

## Заместитель главного редактора

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

**Козлов Иван Генрихович** – доктор медицинских наук, профессор, Национальный медицинский исследовательский Центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, заведующий лабораторией экспериментальной и клинической фармакологии, Москва, Россия

## Редакционная коллегия

**Бен Мари** – доктор медицинских наук, профессор, руководитель гематологической лаборатории Клинического Центра Университета Нанта, Нант, Франция

**Бочаров Геннадий Алексеевич** – доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник Института вычислительной математики РАН, Москва, Россия

**Ганковская Людмила Викторовна** – доктор медицинских наук, профессор, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, заведующая кафедрой иммунологии, Москва, Россия

**Григорова Ирина** – ассистент профессора отдела микробиологии и иммунологии, Медицинская школа, Мичиганский Университет, Эйн Арбор, США

**Кадагидзе Заира Григорьевна** – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии опухолей НИИ клинической онкологии имени академика Н.Н. Трапезникова НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина, Москва, Россия

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

**Круглов Андрей Алексеевич** – руководитель лаборатории хронического воспаления, Исследовательский Ревматологический Центр Германии, Берлин, Германия

**Купраш Дмитрий Владимирович** – член-корреспондент РАН, профессор, доктор биологических наук, Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, лаборатория передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии, главный научный сотрудник, МГУ имени Ломоносова, профессор кафедры иммунологии, Москва, Россия

**Лагарькова Мария Андреевна** – член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор МГУ имени М.В. Ломоносова, заведующая лабораторией клеточной биологии Федерального научно-клинического Центра физико-химической медицины, Москва, Россия

**Лядова Ирина Владимировна** – доктор медицинских наук, Центральный НИИ туберкулеза, заведующая лабораторией биотехнологии отдела иммунологии, Москва, Россия

**Невинский Георгий Александрович** – профессор, доктор химических наук, заведующий лабораторией ферментов репарации Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

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

**Петров Рэм Викторович** – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом иммунологии Института биорганотической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

**Полторак Александр** – профессор, Школа биомедицинских наук имени Саклера, Университет Тафта, Бостон, США

**Продеус Андрей Петрович** – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой педиатрии РНИМУ имени Н.И. Пирогова, руководитель отделения иммунологии и ревматологии детей и подросткового ФНКЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии, Москва, Россия

**Руденский Александр** – Медицинский Институт Говарда Хьюза, Чери Чейз, США

**Села Михаэль** – профессор, Институт наук Вейцмана, Реховот, Израиль

**Сенников Сергей Витальевич** – доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии НИИ фундаментальной и клинической иммунологии Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

**Симбирцев Андрей Семенович** – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник ГосНИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

**Сотникова Наталья Юрьевна** – доктор медицинских наук, профессор Ивановской государственной медицинской академии, заведующая научно-практическим отделением клинической иммунологии Ивановского НИИ материнства и детства, Иваново, Россия

**Стокингер Ганс** – Венский медицинский университет, Центр патофизиологии, инфекционной и иммунологии, Вена, Австрия

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

**Хайтов Муса Рахимович** – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия

**Хайтов Рахим Мусаевич** – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, научный руководитель ФБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (Москва), главный специалист аллерголог-иммунолог Минздрава России, президент Российской Ассоциации Аллергологов и Клинических Иммунологов, Москва, Россия

## Ответственные секретари:

Ризопулу А.П., д.б.н. (Москва)  
Ракитянская Н.В. (Санкт-Петербург)  
E-mail: rusimmun@gmail.com

## Редактор перевода:

Исаков Д.В., к.м.н. (Санкт-Петербург)

## Редактор электронной версии:

Ерофеева В.С. (Санкт-Петербург)

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

**Адрес для корреспонденции:**

Редакция журнала «Российский иммунологический журнал»  
197101, Санкт-Петербург, а/я 130

**Электронная версия:** www.rusimmun.ru

© Российский иммунологический журнал

Журнал зарегистрирован Министерстве РФ по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций (свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ №77-11525 от 04.01.2002 г.)

**Хайдуков Сергей Валерьевич** – доктор биологических наук, ФГБУН Институт биорганотической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, старший научный сотрудник; ФГБУ Российская Детская Клиническая Больница, Центральная клиническая лаборатория, Москва, Россия

**Шварц Герберт** – Школа медицины Йонг Лу Лин Национального университета Сингапура

## Редакционный совет

**Арион Виталий Яковлевич** – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии и биохимии Федерального научно-клинического Центра физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

**Балмасова Ирина Петровна** – доктор медицинских наук, профессор, Российский университет дружбы народов, кафедра аллергологии и иммунологии ФПК; Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова, заведующая лабораторией патогенеза и методов лечения инфекционных заболеваний, Москва, Россия

**Гариб Фируз Юсупович** – доктор медицинских наук, профессор, Российская медицинская академия последипломного образования, кафедра иммунологии; Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра иммунологии; Первый МГМУ имени С.М. Сеченова, кафедра клинической иммунологии и аллергологии, Москва, Россия

**Глушков Андрей Николаевич** – доктор медицинских наук, профессор, директор Института экологии человека Федерального исследовательского Центра угля и углехимии СО РАН, Кемерово, Россия

**Гущин Игорь Сергеевич** – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, академик РАЕН, заведующий отделом № 80 клинической иммунологии и аллергологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия

**Детгарева Марина Васильевна** – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой неонатологии Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

**Зурочка Александр Владимирович** – доктор медицинских наук, профессор, Институт иммунологии и физиологии УРО РАН, лаборатория иммунологии воспаления, ведущий научный сотрудник, Челябинск, Россия

**Карамов Здуард Владимирович** – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией иммунохимии ФИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

**Колесникова Наталья Владиславовна** – доктор биологических наук, профессор, Кубанский государственный медицинский университет, кафедра клинической иммунологии и аллергологии, Краснодар, Россия

**Нестерова Ирина Вадимовна** – доктор медицинских наук, профессор, Российский университет дружбы народов, кафедра аллергологии и иммунологии ФПК; Институт иммунофизиологии, Москва, Россия

**Раев Михаил Борисович** – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов УРО РАН, Пермь, Россия

**Румянцев Александр Григорьевич** – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, президент Национального медицинского исследовательского центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

**Свитич Оксана Анатольевна** – доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, директор НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия

**Спешиашвили Реваз Исмаилович** – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, академик Академии наук Грузии, заведующий кафедрой аллергологии и иммунологии Российского университета дружбы народов, директор Института иммунофизиологии, Москва, Россия

**Сизякина Людмила Петровна** – доктор медицинских наук, профессор, директор НИИ клинической иммунологии Ростовского государственного медицинского университета Минздрава России, заведующая кафедрой клинической иммунологии и аллергологии факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов Ростовского государственного медицинского университета, Ростов-на-Дону, Россия

**Топтыгина Анна Павловна** – доктор медицинских наук, НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Н. Габричевского Роспотребнадзора, заведующая лабораторией цитокинов, ведущий научный сотрудник, Москва, Россия

**Тузанкина Ирина Александровна** – доктор медицинских наук, профессор, Институт иммунологии и физиологии УРО РАН, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления, главный детский иммунолог-аллерголог Минздрава Свердловской области, руководитель регионального Центра клинической иммунологии, Екатеринбург, Россия

**Тутельян Алексей Викторович** – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией госпитальных инфекций и эпидемиологического анализа, Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

**Федосова Татьяна Германовна** – доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия

**Чекнёв Сергей Борисович** – доктор медицинских наук, заместитель директора по научной работе ФИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ, заведующий лабораторией межклеточных взаимодействий, Москва, Россия

**Черешнева Маргарита Владимировна** – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник Института иммунологии и физиологии УРО РАН, Екатеринбург, Россия

**Ширинский Валерий Степанович** – доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией клинической иммунофармакологии НИИ фундаментальной и клинической иммунологии Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

**Шмагель Константин Владимирович** – доктор медицинских наук, заведующий лабораторией экологической иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов, профессор кафедры иммунологии Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера, Пермь, Россия

## Издательство «Человек»

199004, Россия, Санкт-Петербург, Малый пр. В.О., 26, оф. 3.

E-mail: mail@mirmed.ru

Тел./факс: (812) 325-25-64.

Подписано в печать 20.09.2021 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 12,5. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.)

Заказ № 212

Напечатано в ООО «АРТЕМИДА».

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

Тел.: (812) 950-10-99.

**«Российский иммунологический журнал» входит в «Перечень российских рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК РФ, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук», а также в базу Russian Science Citation Index (RSCI), полностью интегрированную с платформой Web of Science**

RUSSIAN SOCIETY OF IMMUNOLOGY  
(RSI)

---

**RUSSIAN  
JOURNAL OF IMMUNOLOGY**

**ROSSIYSKIY  
IMMUNOLOGICHESKIY  
ZHURNAL**

July-September

**2021, volume 24**

**No. 3**

---

Published since 1996

## Editor-in-chief

**Valery A. Chereshev** – PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Institute of Immunology and Physiology, Scientific Adviser, Yekaterinburg, Russian Federation, President of Russian Immunology Society Deputy editor-in-chief

## Deputy Editor-in-Chief

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

**Ivan G. Kozlov** – PhD, MD (Medicine), Professor, Chief, Laboratory of Experimental and Clinical Pharmacology, Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russian Federation

## Editorial board

**Marie C. Bene** – Professor, Chief of Service d'Hématologie Biologique, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Nantes, France

**Gennady A. Bocharov** – Doctor of Physical and Mathematical Sciences, Leading Researcher, Marchuk Institute of Numerical Mathematics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Irina S. Freidlin** – PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, Institute of Experimental Medicine, Head Researcher, St. Petersburg, Russian Federation

**Ludmila V. Gankovskaya** – MD, PhD, Prof., Head of the Immunology Department, Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU), Moscow, Russian Federation

**Irina Grigорова** – PhD, Assistant Professor, Department of Microbiology and Immunology, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, United States

**Zaira G. Kadagidze** – MD, PhD, Prof., Head of the Laboratory of Clinical Immunology of Tumors, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation

**Alexander V. Karaulov** – MD, PhD, Prof., Full Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Clinical Immunology and Allergology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

**Sergei V. Khaidukov** – Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Musa R. Khaïtov** – MD, PhD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director, State Scientific Center "Institute of Immunology", FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation

**Rakhim M. Khaïtov** – State Research Center Institute of Immunology FMBA, Moscow, Russian Federation, PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Institute of Immunology, Scientific Adviser, Moscow, 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

**Andrey A. Kruglov** – PhD, Chief, Laboratory of Chronic inflammation, German Rheumatism Research Centre (DRFZ), Berlin, Germany

**Dmitry V. Kuprash** – PhD, Professor, RAS Corresponding Member, Department of Immunology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

**Mariya A. Lagarkova** – PhD, Professor of Lomonosov Moscow State University, RAS Corresponding Member, Chief, Laboratory of Cellular Biology, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation

**Irina V. Lyadova** – PhD, MD, Professor, Central Institute of Tuberculosis, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation

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

**Georgiy A. Nevinsky** – Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation

**Rem V. Petrov** – State Research Center Institute of Immunology FMBA, Moscow, Russian Federation

**Alexander Poltorak** – Professor, Graduate Program in Immunology, Tufts University Sackler School of Biomedical Sciences, Boston, USA, Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russian Federation

**Andrey P. Prodeus** – PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Department of Immunology and Rheumatology, National Scientific-Practical Center of Pediatric Hematology, Moscow, Russian Federation

**Alexander Rudensky** – Howard Hughes Medical Institute, Chevy Chase, United States

**Michael Sela** – Professor, Weizmann Institute of Science Israel, Rehovot, Israel

**Serguei V. Sennikov** – Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Herbert Schwarz** – Yong Loo Lin School of Medicine, Singapore City, Singapore

**Andrey S. Simbirsev** – PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, St. Petersburg Institute of Pure Biochemicals, Head Researcher, St. Petersburg, Russian Federation

**Nataliya Yu. Sotnikova** – MD, PhD, Prof., Ivanovo State Medical Academy, Head of the Department of Scientific and Practical Clinical Immunology, Ivanovo Research Institute of Maternity and Childhood (Ivanovo, Russia), Russian Federation

## Managing Editors:

Anna Rizopulu, PhD (Biology) (Moscow)

Natalia Rakitianskaia, (St. Petersburg)

E-mail: rusimmun@gmail.com

## Translation editor:

Dmitrii V. Isakov, PhD (Medicine) (St. Petersburg)

## Online version editorial manager:

Vera S. Erofeeva (St. Petersburg)

**Editorial Office: phone/fax (812) 233-08-58**

**Address for correspondence:**

Editorial Office of the "Russian Journal of Immunology"  
197101, St.Petersburg, post box 130

**Electronic version:** www.rusimmun.ru

© Russian Journal of Immunology

Journal registered with the Ministry of the Russian Federation for Press, Broadcasting and Mass Media (certificate of registration of mass media PI No. 77-11525 of January 4, 2002)

**Hannes Stockinger** – Medizinische Universität Wien, Zentrum für Pathophysiologie, Infektiologie und Immunologie, Vienna, Austria

## Editorial Council

**Vitaliy Ya. Arion** – MD, PhD, Professor, Head Researcher, Laboratory of Molecular Immunology and Biochemistry, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation

**Irina P. Balmasova** – MD, PhD, Professor, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation

**Sergey B. Cheknyov** – PhD, MD (Medicine), N.F. Gamaleya Federal Center of Epidemiology and Microbiology, Deputy Director on Science, Head of the Laboratory of Cellular Interactions, Moscow, Russian Federation

**Margarita V. Cheresheva** – Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

**Tatiana G. Fedoskova** – PhD, MD (Medicine), Professor, State Research Center Institute of Immunology FMBA, Moscow, Russian Federation

**Firuz Yu. Garib** – MD, PhD, Professor, Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

**Andrey N. Glushkov** – MD, PhD, Professor, Director of Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry of SB RAS, Kemerovo, Russian Federation

**Igor S. Gushchin** – MD, PhD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Natural Sciences, Head of the Department of Clinical Immunology and Allergology №60, State Scientific Center "Institute of Immunology", FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation

**Marina V. Degtyareva** – MD, PhD, Professor, Department of Neonatology, chief, Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU), Moscow, Russian Federation

**Edward V. Karamov** – PhD, Professor, Head of the Laboratory of Immunochimistry, N. F. Gamaleya Institute of Epidemiology and Microbiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation

**Natalya V. Kolesnikova** – PhD, Professor, Department of Clinical Immunology and Allergology, Kuban State Medical Academy, Krasnodar, Russian Federation

**Irina V. Nesterova** – MD, PhD, Professor, Department of Allergology and Immunology, RUDN University, Moscow, Russian Federation

**Mikhail B. Rayev** – PhD, Professor, Leading Researcher, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm, Russian Federation

**Alexander G. Rumyantsev** – PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, President of National Scientific-Practical Center of Pediatric Hematology, Moscow, Russian Federation

**Revaz I. Sepiashvili** – MD, PhD, Prof., Academician of the Georgian National Academy of Sciences, Head of the Department of Allergology and Immunology, Peoples' Friendship University of Russia, Head of the Institute of Immunophysiology (Moscow, Russia) Russian Federation

**Ludmila P. Sizyagina** – MD, PhD, Professor, Head of the Institute of Clinical Immunology, Rostov State Medical University, Head of the Department of Clinical Immunology and Allergology, Faculty of Postgraduate Professional Training of Physicians, Rostov State Medical University (Rostov-on-Don, Russia) Russian Federation

**Valeriy S. Shirinskii** – PhD, MD (Medicine), Professor, Chief, Laboratory of Clinical Pharmacology, Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Konstantin V. Shmigel** – Doctor of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Professor, Department of Immunology, Perm State University named after Academician E.A. Wagner, Perm, Russian Federation

**Oksana A. Svitich** – MD, PhD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera RAMS, Moscow, Russian Federation

**Anna P. Toptygina** – MD, PhD, Professor, Chief, Laboratory of Cytokines, Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

**Aleksey V. Tutelyan** – PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, Chief, Laboratory for Hospital Infections and Epidemiological Analysis, Central Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation

**Irina A. Tuzankina** – MD, PhD, Prof., General Secretary of the Russian Society of Immunologists and Ural Society of Immunologists, Allergists and Immunorehabilitologists, Chief Researcher, Laboratory of Inflammation Immunology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Head of the Regional Center for Clinical Immunology, Children Regional Hospital, Chief Immunologist of the Sverdlovsk Region and Ural Federal District, Yekaterinburg, Russian Federation

**Alexander V. Zurochka** – MD, PhD, Professor, Leading Researcher, Laboratory of Inflammation, Institute of Immunology and Physiology, Chelyabinsk Russian Federation

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 20.09.2021. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing. Printed sheets 12.5. Circulation 2000 copies. (1<sup>st</sup> edition – 1000 copies.)

Print in LLC «ARTEMIDA»

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

Phone: (812) 950-10-99

*According to the decision of the Higher Attestation Commission of the Ministry of Education of Russia, the Russian Journal of Immunology has been regularly included in the "List of periodical scientific and scientific-technical publications published in the Russian Federation, in which publication of the main results of dissertations for the degree of Doctor of Science is recommended" and included in Russian Science Citation Index (RSCI) database fully integrated with the Web of Science platform*

## СОДЕРЖАНИЕ

### Краткие сообщения

<i>Абакумова Т.В., Генинг Т.П., Антонеева И.И., Генинг С.О., Гноевых В.В.</i> <b>НЕЙТРОФИЛОКИНЫ И МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ОПУХОЛЯХ ЯИЧНИКОВ</b> .....	355
<i>Бердюгина О.В.</i> <b>ГЕТЕРОГЕННОСТЬ НК-КЛЕТОК ПРИ ТУБЕРКУЛЕМАХ ЛЕГКИХ, В ТОМ ЧИСЛЕ С НАЛИЧИЕМ В СТРУКТУРЕ КОМОРБИДНОСТИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ</b> .....	363
<i>Шабалдин А.В., Деева Н.С., Сухих А.С., Вавин Г.В., Крюков П.М.</i> <b>ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ МЕМБРАНЫХ МОЛЕКУЛ HLA-G У ЖЕНЩИН, ИМЕЮЩИХ ДЕТЕЙ С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА, ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ФРАКЦИИ ГАММА-ГЛОБУЛИНОВ, ПОЛУЧЕННОЙ ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ МНОГОРОЖАВШИХ ЖЕНЩИН</b> .....	373
<i>Шабалдин А.В., Целокина А.В., Шмудевич С.А., Понасенко А.В.</i> <b>ОСОБЕННОСТИ СОЧЕТАНИЙ ПОЛИМОРФНЫХ САЙТОВ ГЕНОВ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ (TLR) У ДЕТЕЙ С ДЕФЕКТОМ МЕЖЖЕЛУДОЧКОВОЙ ПЕРЕГОРОДКИ</b> .....	377
<i>Гордеева Л.А., Воронина Е.Н., Гареева Ю.В., Поленок Е.Г., Мун С.А., Глушков А.Н.</i> <b>ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗИ МАТЕРИНСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА HLA-G, ВНУТРИМАТОЧНОЙ ИНФЕКЦИИ С РИСКОМ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ РАЗВИТИЯ У РЕБЕНКА</b> .....	381
<i>Долгих О.В., Дианова Д.Г., Кривцов А.В.</i> <b>ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК СПЕРМАТОЗОИДОВ И ОБЩАЯ АНТИРАДИКАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ СПЕРМЫ У МУЖЧИН С ОТЯГОЩЕННЫМ АНАМНЕЗОМ</b> .....	387
<i>Арефьева А.С., Бабаян А.А., Калинина Е.А., Николаева М.А.</i> <b>ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ СЕМЕННОЙ ПЛАЗМЫ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОГРАММ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ</b> .....	391
<i>Вторушина В.В., Кречетова Л.В., Инвиеева Е.В., Тетрашвили Н.К.</i> <b>ФАКТОР, IN VITRO ПОДАВЛЯЮЩИЙ МИГРАЦИЮ МАКРОФАГОВ, В КРОВИ ЖЕНЩИН С ПРИВЫЧНЫМ ВЫКИДЫШЕМ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ, РАЗВИВАЮЩЕЙСЯ ПОСЛЕ ИММУНОЦИТОТЕРАПИИ</b> .....	399
<i>Аванесова Т.Г., Левкович М.А., Ермолова Н.В., Крукиер И.И., Дударева М.В.</i> <b>РОЛЬ НАРУШЕНИЙ ПРОЦЕССОВ АПОПТОЗА ПРИ НАРУЖНОМ ГЕНИТАЛЬНОМ ЭНДОМЕТРИОЗЕ</b> .....	409
<i>Безнощенко О.С., Шпилюк М.А., Иванец Т.Ю., Кречетова Л.В., Пырегов А.В., Кодацкий Д.С., Тавлуева Е.В., Мелкумян А.Р., Городнова Е.А., Долгушина Н.В.</i> <b>ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ И ДЛИТЕЛЬНОСТЬ ЦИРКУЛЯЦИИ ВОЛЧАНОЧНОГО АНТИКОАГУЛЯНТА У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19</b> .....	413
<i>Шилова Н.В., Бовин Н.В., Нокель А.Ю., Зиганшина М.М., Хасбиуллина Н.Р., Вускович М., Хуфлейт М.Э.</i> <b>ГЛИКОЭРРЕИ В ДИАГНОСТИКЕ И ТЕРАПИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ОРГАНОВ ЖЕНСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ</b> .....	419
<i>Вторушина В.В., Перминова С.Г., Кречетова Л.В.</i> <b>ИСХОДЫ ПРОГРАММ ВРТ НА ФОНЕ ВНУТРИМАТОЧНОГО ВВЕДЕНИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК У ЖЕНЩИН С ПОВТОРНЫМИ НЕУДАЧАМИ ИМПЛАНТАЦИИ</b> .....	425
<i>Зиганшина М.М., Шилова Н.В., Хасбиуллина Н.Р., Тютюнник Н.В., Кан Н.Е., Наумов В.А., Тютюнник В.Л.</i> <b>ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ УРОВНЕМ АНТИГЛИКАНОВЫХ АНТИТЕЛ КРОВИ И КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫМИ ПАРАМЕТРАМИ ПАЦИЕНТОК С НОРМАЛЬНОЙ И ОСЛОЖНЕННОЙ УМЕРЕННОЙ ПРЕЭКЛАМПСИЕЙ БЕРЕМЕННОСТЬЮ</b> .....	435
<b>Правила для авторов</b> .....	445
<b>Авторский указатель</b> .....	448
<b>Предметный указатель</b> .....	448

## CONTENTS

### Short communications

<i>Abakumova T.V., Gening Tatyana P., Antoneeva I.I., Gening S.O., Gnoevykh V.V.</i> <b>NEUTROPHILOKINES AND THE MORPHOFUNCTIONAL STATE OF CIRCULATING NEUTROPHILS IN OVARIAN TUMORS .....</b>	<b>355</b>
<i>Berdyugina O.V.</i> <b>HETEROGENEITY OF NK CELLS IN PULMONARY TUBERCULOUS GRANULOMAS, INCLUDING ASSOCIATION WITH HIV INFECTION .....</b>	<b>363</b>
<i>Shabaldin A.V., Deeva N.S., Sukhikh A.S., Vavin G.V., Kryukov P.M.</i> <b>ALTERED EXPRESSION OF CELL MEMBRANE HLA-G MOLECULES IN MOTHERS OF CHILDREN WITH INBORN HEART DEFECTS UPON EXPOSURE TO PLASMA GAMMAGLOBULIN FROM MULTIPAROUS WOMEN .....</b>	<b>373</b>
<i>Shabaldin A.V., Tsepokina A.V., Shmulevich S.A., Ponasenko A.V.</i> <b>FEATURES OF POLYMORPHIC SITE COMBINATIONS OF TOLL-LIKE RECEPTOR (TLR) GENES IN CHILDREN WITH VENTRICULAR SEPTAL DEFECTS .....</b>	<b>377</b>
<i>Gordeeva L.A., Voronina E.N., Gareeva Yu.V., Polenok E.G., Mun S.A., Glushkov A.N.</i> <b>STUDY OF RELATIONSHIPS BETWEEN MATERNAL HLA-G GENE POLYMORPHISM AND INTRAUTERINE INFECTION WITH RISK OF CONGENITAL MALFORMATIONS .....</b>	<b>381</b>
<i>Dolgikh O.V., Dianova D.G., Krivtsov A.V.</i> <b>SPERM DNA FRAGMENTATION AND TOTAL ANTIRADICAL ACTIVITY OF SPERM IN MEN WITH EXAGGERATED ANAMNESIS .....</b>	<b>387</b>
<i>Arefieva A.S., Babayan A.A., Kalinina E.A., Nikolaeva M.A.</i> <b>CYTOKINE PROFILE OF SEMINAL PLASMA AND EFFECTIVENESS OF ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY PROGRAMS .....</b>	<b>391</b>
<i>Vtorushina V.V., Krechetova L.V., Inviyaeva E.V., Tetrushvili N.K.</i> <b>MACROPHAGE INHIBITING FACTOR IN WOMEN WITH HABITUAL MISCARRIAGE IN PREGNANCY FOLLOWING IMMUNOCYTOTHERAPY .....</b>	<b>399</b>
<i>Avanesova T.G., Levkovich M.A., Ermolova N.V., Krukier I.I., Dudareva M.V.</i> <b>ROLE OF APOPTOSIS DISTURBANCES IN EXTERNAL GENITAL ENDOMETRIOSIS .....</b>	<b>409</b>
<i>Beznoshchenko O.S., Shpiluk M.A., Ivanets T.Yu., Krechetova L.V., Pyregov A.V., Kodatsky D.S., Tavlyuyeva E.V., Melkumyan A.R., Gorodnova E.A., Dolgushina N.V.</i> <b>DETECTION FREQUENCY AND DURATION OF LUPUS ANTICOAGULANT CIRCULATION IN COVID-19 PATIENTS .....</b>	<b>413</b>
<i>Shilova N.V., Bovin N.V., Nokel A.Yu., Ziganshina M.M., Khasbiullina N.R., Vuskovic M., Huflejt M.E.</i> <b>GLYCOARRAYS FOR DIAGNOSIS AND THERAPY OF THE DISORDERS OF THE FEMALE REPRODUCTIVE SYSTEM .....</b>	<b>419</b>
<i>Vtorushina V.V., Perminova S.G., Krechetova L.V.</i> <b>OUTCOMES OF IVF PROGRAMS WITH INTRAUTERINE ADMINISTRATION OF AUTOLOGOUS MONONUCLEAR CELLS IN WOMEN WITH REPEATED IMPLANTATION FAILURE .....</b>	<b>425</b>
<i>Ziganshina M.M., Shilova N.V., Khasbiullina N.R., Tyutyunnik N.V., Kan N.E., Naumov V.A., Tyutyunnik V.L.</i> <b>RELATIONSHIP BETWEEN THE LEVEL OF ANTIGLYCAN ANTIBODIES IN THE BLOOD AND CLINICAL AND LABORATORY PARAMETERS OF PATIENTS WITH NORMAL PREGNANCY AND PREGNANCY COMPLICATED BY MODERATE PREECLAMPSIA .....</b>	<b>435</b>
<b>Instructions to Authors .....</b>	<b>445</b>
<b>Author index .....</b>	<b>448</b>
<b>Subject index .....</b>	<b>448</b>

## НЕЙТРОФИЛОКИНЫ И МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ОПУХОЛЯХ ЯИЧНИКОВ

Абакумова Т.В.<sup>1</sup>, Генинг Т.П.<sup>1</sup>, Антонеева И.И.<sup>1,2</sup>, Генинг С.О.<sup>1</sup>, Гноевых В.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

<sup>2</sup> ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер г. Ульяновска», г. Ульяновск, Россия

**Резюме.** На сегодня не существует четкого представления о молекулярных участниках, обеспечивающих цитотоксическую и/или цитостатическую активность нейтрофилов (Нф) по отношению к опухолевым клеткам. Продуцируемые нейтрофилами цитокины необходимы для паракринного и аутокринного взаимодействия их с окружающими клетками. С целью оценки влияния регуляторных нейтрофилокинов на морфофункциональное состояние циркулирующих Нф при доброкачественных опухолях и раке яичников методом иммуноферментного анализа оценивали в нейтрофилах уровень IL-4, IL-6, IL-10, IL-8, IL-18, IFN $\gamma$ , MCP-1, MMP-1, экспрессию CD11b, CD63, CD16, CD95. Определяли ригидность мембраны и способность нейтрофилов к образованию NET. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием ПО Statistica 13.0, Jamovi 1.6.5.0. Установлено, что при РЯ ригидность нейтрофилов зависит от уровня в нейтрофилах IL-10, MCP-1, IL-18, IL-8, IL-4, IFN $\gamma$ , IL-6. Методом множественной регрессии выявлена зависимость способности образовывать NET от уровня IL-4 и IL-6 в Нф. Выявлена обратная корреляционная связь между ригидностью мембраны Нф и их способностью образовывать ловушки при раке яичников. При доброкачественной опухоли яичников выявлена заметная прямая корреляционная связь ригидности мембраны нейтрофилов с адгезионным маркером CD11b. При раке яичников выявлена корреляционная связь ригидности мембраны Нф с маркером дегрануляции CD63. При доброкачественной опухоли яичников корреляционных связей между количеством активированных нейтрофилов и уровнем внутриклеточных цитокинов в Нф не обнаружено. При раке яичников выявлены корреляционные связи между количеством CD11b<sup>+</sup>Нф и уровнем в них IL-6, IL-8; между количеством CD63, CD95 и внутриклеточным IL-8. Количество CD16<sup>+</sup>Нф коррелировало с уровнем MMP-1 и IL-8, а CD95<sup>+</sup>Нф коррелировало с уровнем IL-18 в Нф. Таким образом, изменение уровня нейтрофилокинов при доброкачественной опухоли яичников не коррелировало с изменениями способности к NETозу, экспрессии активационных маркеров, но сопровождалось увеличением ригидности мембраны циркулирующих нейтрофилов. При раке яичников повышение IL-8 коррелировало со снижением экспрессии CD16 и повышением CD63; снижение CD16 коррелировало с возрастанием MMP-1. Повышение ригидности

### Адрес для переписки:

Абакумова Татьяна Владимировна  
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет»  
432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Архитектора Ливчака, 2.  
Тел.: 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: 7 (8422) 32-70-71.  
E-mail: taty-abakumova@yandex.ru

### Образец цитирования:

Т.В. Абакумова, Т.П. Генинг, И.И. Антонеева, С.О. Генинг, В.В. Гноевых «Нейтрофилокины и морфофункциональное состояние циркулирующих нейтрофилов при опухолях яичников» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 3. С. 355-362.  
doi: 10.46235/1028-7221-985-NAT  
© Абакумова Т.В. и соавт., 2021

### For citation:

T.V. Abakumova, T.P. Gening, I.I. Antoneeva, S.O. Gening, V.V. Gnoevykh "Neutrophilokines and the morphofunctional state of circulating neutrophils in ovarian tumors", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 3, pp. 355-362.  
doi: 10.46235/1028-7221-985-NAT  
DOI: 10.46235/1028-7221-985-NAT

мембраны при раке яичников ассоциировалось с изменениями всех рассмотренных нейтрофилокинов (IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, MCP-1, IFN $\gamma$ ). Комбинация показателей IL-4, IL-6, IL-18, числа NET и ригидности мембраны циркулирующих Нф (по результатам мультивариантного анализа) может быть использована для дифференциальной диагностики рака яичника.

*Ключевые слова:* нейтрофилы, ригидность мембраны, рак яичников, доброкачественная опухоль яичников, нейтрофилокины

## NEUTROPHILOKINES AND THE MORPHOFUNCTIONAL STATE OF CIRCULATING NEUTROPHILS IN OVARIAN TUMORS

Abakumova T.V.<sup>a</sup>, Gening Tatyana P.<sup>a</sup>, Antoneeva I.I.<sup>a, b</sup>, Gening S.O.<sup>a</sup>, Gnoevykh V.V.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Regional Clinical Oncology Center of Ulyanovsk, Ulyanovsk, Russian Federation

**Abstract.** There is currently no clear understanding of the molecular participants providing cytotoxic and/or cytostatic activity of neutrophils (Nph) in relation to tumor cells. Cytokines produced by neutrophils are necessary for their paracrine and autocrine interactions with surrounding cells. In order to assess the effect of regulatory neutrophilokines on the morphofunctional state of circulating Nph in benign ovarian tumors and ovarian cancer, the ELISA method was used to assess the level of IL-4, IL-6, IL-10, IL-8, IL-18, IFN $\gamma$ , MCP-1 and MMP-1 in neutrophils, expression of CD11b, CD63, CD16, CD95. Determined the rigidity of the membrane and the ability of neutrophils to form NET. Statistical processing of the obtained data was carried out using the software Statistica 13.0, Jamovi 1.6.5.0. It was found that in ovarian cancer the rigidity of neutrophils depends on the level of IL-10, MCP-1, IL-18, IL-8, IL-4, IFN $\gamma$ , IL-6 in neutrophils. The method of multiple regression revealed the dependence of the ability to form NETs on the level of IL-4 and IL-6 in Nph. Revealed an inverse correlation between the rigidity of the membrane Nph and their ability to form traps in ovarian cancer. In benign ovarian tumors, a noticeable direct correlation was found between the rigidity of the neutrophil membrane and the adhesive marker CD11b. In ovarian cancer, a correlation was found between the rigidity of the Nph membrane and the CD63 degranulation marker. At benign ovarian tumors, no correlations were found between the number of activated neutrophils and the level of intracellular cytokines in Nph. In ovarian cancer, correlations were found between the number of CD11b<sup>+</sup>Nph and the level of IL-6, IL-8 in them; between the amount of CD63, CD95 and intracellular IL-8. The amount of CD16<sup>+</sup>Nph correlated with the level of MMP-1 and IL-8 in Nph. The amount of CD95<sup>+</sup>Nph correlated with the level of IL-18 in Nph. Thus, the change in the level of neutrophilokines in benign ovarian tumors did not correlate with changes in the ability to NETosis, expression of activation markers, but was accompanied by an increase in the rigidity of the membrane of circulating neutrophils. In ovarian cancer, an increase in IL-8 correlated with a decrease in CD16 expression and an increase in CD63; a decrease in CD16 correlated with an increase in MMP-1. An increase in membrane rigidity in ovarian cancer was associated with changes in all considered neutrophilokines (IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, MCP-1, IFN $\gamma$ ). The combination of IL-4, IL-6, IL-18 indices, NET number and membrane rigidity of circulating Nph (according to the results of multivariate analysis) can be used for differential diagnosis of ovarian cancer.

*Keywords:* neutrophils, membrane rigidity, ovarian cancer, benign ovarian tumor, neutrophilokines

### Введение

Выполнение нейтрофилами (Нф) основных функций определяется их способностью быстро менять форму. Почти сферические в кровотоке они должны деформироваться при прохождении по капиллярам, уплощаться на поверхно-

сти эндотелия перед экстравазацией. На стадии фагоцитарного захвата они образуют псевдоподии [15]. Все эти превращения требуют существенного увеличения площади поверхности клеток. Сморщенная поверхность Нф служит как бы мембранным резервуаром для увеличения

площади поверхности клеток для передвижения и фагоцитоза [2]. Оценка мембранно-цитоскелетной эластичности методом атомно-силовой микроскопии позволило установить новый процесс гибели Нф – мумификацию, который проявляется в увеличении жесткости мембраны Нф, приобретение характерной бугристой формы с выступами [14]. При образовании внеклеточных ловушек (NET) одним из предварительных событий наряду с разрывами ядерной оболочки являются разрывы плазматической мембраны [21].

Реализация эффлекторных функций и праймирование связано с изменением архитектоники мембранных рецепторов Нф. CD63 (тетраспаннин) участвует в передаче сигналов, регулирующих активацию и подвижность Нф, адгезивную активность CD11/CD18. Являясь маркером азурофильных гранул рецептор может быть индикатором активности их основного компонента – миелопероксидазы [10].

CD16 – рецепторы к Fc-фрагменту иммуноглобулинов (FcγRIII). Показано, что субпопуляция Нф CD16<sup>high</sup>CD63<sup>dim</sup> характеризуется повышенной миграционной способностью, противоопухолевой активностью, повышенным образованием NET и коррелирует с увеличением выживаемости у пациентов с плоскоклеточным раком головы и шеи [13]. Существуют данные о роли FcγRIIIB в трогоцитозе, стадии трогоптоза, опосредованного антителами эндоцитарного поглощения Нф фрагментов мембраны раковой клетки [6]. Также показано, что экспрессия CD16 на CD16<sup>low</sup>, рассматриваемых как популяция незрелых Нф, является хорошим прогностическим фактором при прогнозе эффективности капецитабина у больных колоректальным раком [12].

Гликопротеин CD11/CD18 играет хорошо описанную роль в регуляции ключевых воспалительных функций, в том числе фагоцитоз, апоптоз и высвобождение пероксида [9]. Образование конъюгата нейтрофил-раковая клетка, последующий трогоцитоз и гибель Нф также зависят от CD11/CD18 [3]. На сегодня не существует четкого представления о молекулярных участниках, обеспечивающих цитотоксическую и/или цитостатическую активность Нф по отношению к опухолевым клеткам. *In vitro* показано, что взаимодействие между Нф и клетками ряда опухолевых линий через Fas/Fas лиганд приводит к ранней остановке клеточного цикла, что позволяет реализовать противоопухолевый эффект Нф [19]. Fas/(APO-1, CD95)/-широко экспрессируемый на клеточной мембране белок, передающий апоптотический сигнал после взаимодействия с лигандом FASL. Установлено, что

высокая экспрессия FAS нейтрофилами сопровождалась повышенной чувствительностью к Fas-опосредованному апоптозу [7].

Нф способны стимулировать или подавлять рост опухоли через продукцию цитокинов [21]. При этом функции самих Нф активируются или потенцируются провоспалительными цитокинами. Так, IL-10 подавляет зависимую от активных форм кислорода генерацию NETs [17]. Нф, продуцирующие IL-10, не апоптотины, и экспрессия IL-10 индуцировалась экзогенным IL-10, что свидетельствует о наличии петли положительной обратной связи [11]. Снижение миграции Нф может быть ограничено, если подавить высвобождение IL-8 [19]. IL-6 и MCP-1, влияющие на жесткость клеток эпителия сетчатки, изменяют клеточную адгезию и активность Нф [23].

Таким образом, продуцируемые нейтрофилами цитокины необходимы для паракринного и аутокринного взаимодействия их с окружающими клетками.

**Целью исследования** было изучение влияния регуляторных нейтрофилокинов на морфофункциональное состояние циркулирующих Нф при опухолях яичников.

## Материалы и методы

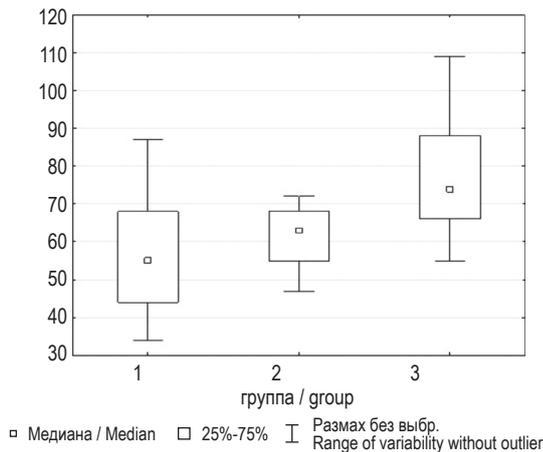
Обследовали 97 больных раком яичников (РЯ) I-IV стадии по FIGO, 30 больных с доброкачественными опухолями яичников (ДОЯ) и контрольную группу (n = 22). Уровень MMP-1 (Abfrontier, Quantikine ELISA Kits) и IL-4, IL-6, IL-10, IL-8, IL-18, IFNγ, MCP-1 («Вектор-Бест-Волга», Россия) в сыворотке (пг/мл) оценивали с помощью ИФА.

Нейтрофилы выделяли из 5 мл гепаринизированной крови в двойном градиенте плотности фиколл-урографина (ρ = 1,117 и 1,077 г/мл). Нативные Нф сканировали, используя микроскоп SolverPro (NT-MDT, Зеленоград). Использовали зонды с жесткостью 0,3 N/m, радиус закругления кончика зонда составлял 10 nm.

Для оценки жесткости мембран использовали режим спектроскопии. Жесткость мембран оценивалась по модулю Юнга, который рассчитывали согласно теории Герца [1].

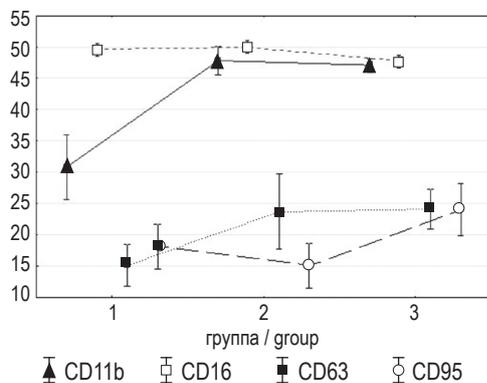
От всех пациенток получено информированное добровольное согласие. Статистическую обработку производили с использованием one-way ANOVA, корреляцию по Спирмену.

Для сравнения независимых совокупностей в случаях отсутствия признаков нормального рас-



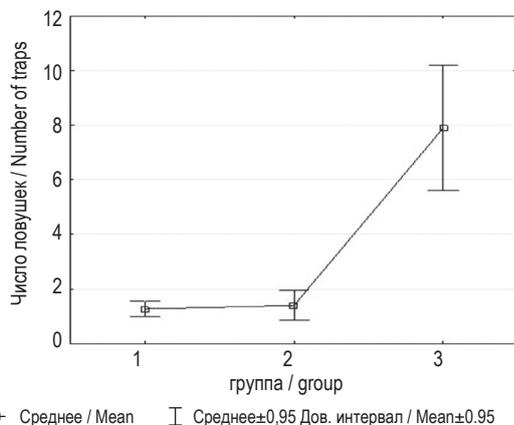
**Рисунок 1. Ригидность мембраны нейтрофилов контрольной группы (1), при доброкачественных опухолях (2) и раке яичников (3)**

Figure 1. Rigidity of the neutrophil membrane of the control group (1), with benign tumors (2) and ovarian cancer (3)



**Рисунок 2. Количество CD11b<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD63<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup> нейтрофилов в контрольной группе (1), при доброкачественных опухолях (2) и раке яичников (3)**

Figure 2. Number of CD11b<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD63<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup> neutrophils in the control group (1), with benign tumors (2) and ovarian cancer (3)



**Рисунок 3. Количество NET в контрольной группе (1), при доброкачественных опухолях (2) и раке яичников (3)**

Figure 3. Number of NET in the control group (1), with benign tumors (2) and ovarian cancer (3)

пределения данных использовался U-критерий Манна–Уитни (Statistica 13.0 (ТІВСО, США)).

Прогностическая модель, характеризующая зависимость количественной переменной от факторов, также представленных количественными показателями, разрабатывалась с помощью метода парной или множественной линейной регрессии. В качестве показателя тесноты связи использовался линейный коэффициент корреляции F. Для оценки качества подбора линейной функции рассчитывался квадрат линейного коэффициента корреляции R<sup>2</sup>, называемый коэффициентом детерминации. Построение прогностической модели риска исхода злокачественного новообразования выполнялось при помощи метода бинарной логистической регрессии. Статистическая значимость полученной модели определялась с помощью критерия χ<sup>2</sup>.

Качество прогностической модели, полученной с помощью ROC-анализа, оценивалось исходя из значений площади под ROC-кривой со стандартной ошибкой и 95%-ным доверительным интервалом (ДИ) и уровня статистической значимости (Jamovi 1.6.5.0).

## Результаты

При анализе результатов атомно-силовой спектроскопии выявлено увеличение жесткости мембран нейтрофилов у пациентов с ХОБЛ [10]. По результатам исследований Плесковой С.Н. и соавт. (2020), жесткость мембраны и сила адгезии нейтрофилов снижается под влиянием *Staphylococcus aureus* [15], а увеличение жесткости мембраны проявляется при муцификации нейтрофилов [14]. Нами было установлено значимое увеличение ригидности мембраны Нф по сравнению с контролем при ДОЯ (p = 0,0001) и при РЯ (p = 0,0005) (рис. 1).

При ДОЯ и РЯ увеличивается количество CD11b<sup>+</sup> (p<sub>1,2</sub> = 0,0001) и CD63<sup>+</sup>Нф (p<sub>1</sub> = 0,0256, p<sub>2</sub> = 0,0016) относительно контроля (рис. 2). Количество CD16<sup>+</sup> при РЯ значимо снижается по сравнению с контролем (p = 0,0009) и ДОЯ (p = 0,0017) (рис. 2). Количество CD95<sup>+</sup> при ДОЯ (p = 0,1717) и РЯ (p = 0,5730) значимо не отличается от контроля (рис. 2).

В результате проведенного исследования при ДОЯ не выявлено значимого изменения количества NET по сравнению с контрольной группой (рис. 3). При РЯ заметно повышалось ЧЛ (p<sub>1</sub> = 0,0011 и p<sub>2</sub> = 0,0002) по сравнению с аналогичными показателями в контроле и при ДОЯ (рис. 3).

**ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ В ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НЕЙТРОФИЛАХ, ВЛИЯЮЩИХ НА РИГИДНОСТЬ ИХ МЕМБРАНЫ ПРИ ДОБРОКАЧЕСТВЕННОЙ ОПУХОЛИ И РАКЕ ЯИЧНИКОВ, Ме (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 1. LEVEL OF CYTOKINES IN CIRCULATING NEUTROPHILS, AFFECTING THE RIGIDITY OF THEIR MEMBRANE IN BENIGN TUMOR AND OVARIAN CANCER, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

Показатель (пг/мл) Indicator (pg/ml)	Группа Group	Контроль Control n = 22	Доброкачественная опухоль яичников Benign ovarian tumor n = 15	Рак яичников Ovarian cancer n = 61
IL-4		1,457 (0,591-2,069)	4,935 (2,537-6,052)*	4,032 (1,698-6,358)*
IL-10		63,961 (48,981-88,843)	8,576 (4,995-13,568)*	6,171 (2,669-28,251)*
IFN $\gamma$		2,517 (1,661-3,664)	6,625 (4,525-8,702)*	2,587 (1,098-4,039)#
IL-18		37,345 (18,492-55,863)	5,293 (3,354-7,258)*	8,697 (6,395-22,399)*
IL-6		1,329 (0,992-1,993)	12,613 (10,136-14,193)*	1,311 (0,963-10,558)#
IL-8		158,826 (140,048-186,034)	40,274 (36,543-51,067)*	109,369 (27,912-214,754)#
МСП-1		17,217 (14,029-19,561)	29,280 (24,984-34,405)*	25,741 (21,037-31,829)*
ММР-1		0,527 (0,397-0,608)	0,671 (0,523-0,886)*	1,233 (1,070-1,410)**

Примечание. \* – данные значимо отличаются от аналогичных в группе контроля; # – данные значимо отличаются от аналогичных в группе с доброкачественной опухолью яичников

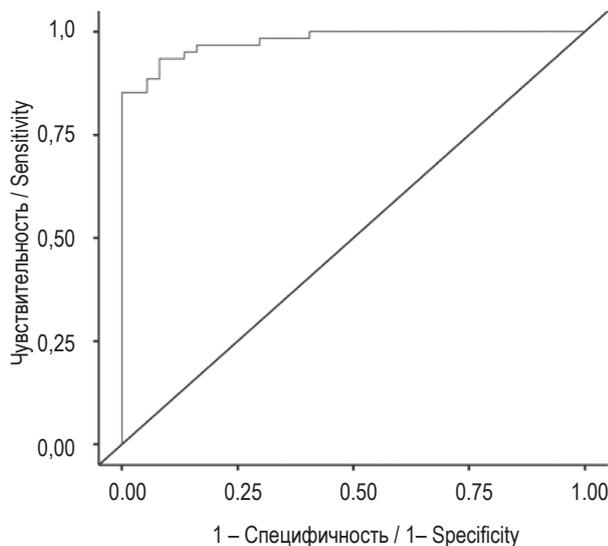
Note. \*, data significantly differ from those in the control group; #, data significantly differ from those in the group with benign ovarian tumor.

В циркулирующих Нф при ДОЯ и РЯ уровень МСП-1 ( $p_1 = 0,00013$  и  $p_2 = 0,00004$ ) и IL-4 ( $p_1 = 0,0001$  и  $p_2 = 0,0001$ ) увеличивается по сравнению с контролем (табл. 1). Уровень IL-18 ( $p_1 = 0,0001$  и  $p_2 = 0,0001$ ) и IL-10 ( $p_1 = 0,0001$  и  $p_2 = 0,0001$ ) в Нф при ДОЯ и РЯ значимо снижались по сравнению с контролем (табл. 1). При РЯ уровень IL-8 значимо возрастает по сравнению с ДОЯ ( $p = 0,0043$ ) и не отличается относительно контроля ( $p = 0,3326$ ) (табл. 1). ММР-1 в Нф при РЯ значимо выше такового в контроле и при ДОЯ ( $p_1 = 0,0001$  и  $p_2 = 0,0011$ ) (табл. 1). Уровень IFN $\gamma$  и IL-6 в Нф при РЯ значимо ниже, чем при ДОЯ ( $p_1 = 0,0001$  и  $p_2 = 0,0009$ ) и не отличается от такового в контроле ( $p_1 = 0,2594$  и  $p_2 = 0,4954$ ) (табл. 1).

## Обсуждение

При ДОЯ 26% от общей дисперсии объясняются моделью ( $F(1,13) = 6,0667$ ,  $p = 0,0285$ ,  $R^2 = 0,2657$ ) зависимости ригидности мембраны от уровня ММР-1 в Нф. При РЯ ригидность

нейтрофилов прямо зависит от уровня в нейтрофилах IL-10 в 47% случаев от общей дисперсии ( $F(1,15) = 15,453$ ,  $p = 0,0013$ ,  $R^2 = 0,4746$ ), от МСП-1 в 35% ( $F(1,22) = 13,387$ ,  $p = 0,0014$ ,  $R^2 = 0,3500$ ), и от IL-18 в 22% ( $F(1,15) = 5,4514$ ,  $p = 0,0339$ ,  $R^2 = 0,2176$ ). Также при РЯ только в 20% от общей дисперсии объясняются моделью прямой зависимости показателей ригидности мембраны Нф от уровней внутриклеточных IL-8 и IL-4 ( $F(2,58) = 8,5441$ ,  $p = 0,0006$ ,  $R^2 = 0,2009$ ). Методом множественной регрессии также выявлена обратная зависимость ригидности мембраны Нф при РЯ от уровней IFN $\gamma$  и IL-6 в 22% случаев от общей дисперсии ( $F(2,58) = 9,4679$ ,  $p = 0,0003$ ,  $R^2 = 0,2201$ ). Также выявлена зависимость способности образовывать NET от уровня IL-4 и IL-6 в 67 % случаев от общей дисперсии ( $F(2,58) = 63,553$ ,  $p = 0,0001$ ,  $R^2 = 0,6758$ ). Выявлена обратная корреляционная связь между ригидностью мембраны Нф и способностью образовывать NET ( $r = -0,2999$ ,  $p = 0,0188$ ) при РЯ.



**Рисунок 4. ROC-кривая для регрессионной модели дифференциальной диагностики рака яичников с учетом показателей в нейтрофилах IL-4, IL-6, IL-18, числа NET и ригидности мембраны циркулирующих нейтрофилов**

Figure 4. ROC-curve for a regression model of differential diagnosis of ovarian cancer taking into account parameters in neutrophils IL-4, IL-6, IL-18, NET number and membrane rigidity of circulating neutrophils

При ДОЯ корреляционных связей между количеством активированных нейтрофилов и уровнем внутриклеточных цитокинов в Нф не обнаружено. Однако выявлена заметная прямая корреляционная связь между ригидностью мембраны нейтрофилов и адгезионным маркером CD11b ( $r = 0,5254$ ,  $p = 0,0442$ ).

По данным Jensen K.N. (2020), в провоспалительных условиях *in vitro* повышенная экспрессии CD11b на нейтрофилах сопровождалась повышенной секрецией IL-8 нейтрофилами, повышенной их фагоцитарной способностью и апоптозу [8]. При В-клеточным хроническим лимфолейкозом обнаруживаются CD16<sup>+</sup>Нф со сниженной продукцией IL-17A, IL-17E и IL-17F [4]. При РЯ выявлена прямая умеренная корреляционная связь между количеством CD11b<sup>+</sup>Нф и уровнем в них IL-6 ( $r = 0,3224$ ,  $p = 0,0113$ ). IL-8 в Нф имеет обратную корреляционную связь с маркерами CD11b ( $r = -0,3951$ ,  $p = 0,0016$ ) и CD16 ( $r = -0,2580$ ,  $p = 0,0447$ ), а также прямую связь с CD63 ( $r = 0,2593$ ,  $p = 0,0436$ ) и CD95 ( $r = 0,3504$ ,  $p = 0,0056$ ). Снижение количе-

ства CD16 обратно коррелирует с возрастающим уровнем MMP-1 в Нф ( $r = -0,2739$ ,  $p = 0,0326$ ).

В исследования Rumalla V. (2001), повышение апоптоза Нф сопровождалось снижением секреции IL-6 и увеличением IL-10 [17]. Повышение апоптотической способности Нф сопровождается снижением продукции IL-18 при системном воспалении у мышей [5]. При РЯ изменение уровня IL-18 в Нф прямо умеренно коррелирует с количеством CD95<sup>+</sup>Нф ( $r = 0,3767$ ,  $p = 0,0027$ ). Также выявлена прямая слабая корреляционная связь ригидности мембраны Нф с маркером дегрануляции CD63 ( $r = 0,2588$ ,  $p = 0,0439$ ).

На модели бинарной логистической регрессии продемонстрировали возможность использования внутриклеточных показателей IL-4, IL-6, IL-18, числа NET и ригидности мембраны циркулирующих Нф для дифференциальной диагностики злокачественных и доброкачественных опухолей яичников ( $\chi^2 = 93,2$ ,  $p = 0,010$ ). Достоверную значимость при их комбинации оценивали методом анализа ROC-кривой (IL-4, ОШ 1,960 95% ДИ 1,047-3,6680,  $p = 0,035$ ; IL-6, ОШ 0,616 95% ДИ 0,456-0,833,  $p = 0,002$ ; IL-18, ОШ 0,957 95% ДИ 0,915-0,999,  $p = 0,048$ ; количество NET, ОШ 1,975 95% ДИ 1,267-3,078,  $p = 0,003$ ; ригидность мембраны циркулирующих Нф, ОШ 1,132 95% ДИ 1,047-1,224,  $p = 0,002$ ). Площадь под кривой (AUC) такой модели составила 0,978, и РЯ мог быть диагностирован с 93,4%-ной вероятностью (рис. 4).

Значения выбранных показателей позволяют классифицировать пациентов по степени риска РЯ в сочетании с чувствительностью (0,934) и специфичностью (0,865).

## Заключение

Таким образом, изменение уровня нейтрофилокинов при ДОЯ не коррелировало с изменениями способности к NETозу, экспрессии активационных маркеров, но сопровождалось увеличением ригидности мембраны циркулирующих нейтрофилов.

При РЯ повышение IL-8 коррелирует со снижением экспрессии CD16 и повышением CD63; снижение CD16 коррелирует с возрастанием MMP-1.

Повышение ригидности мембраны при РЯ ассоциируется с изменениями всех рассмотренных нейтрофилокинов (IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, MCP-1, IFN $\gamma$ ).

## Список литературы / References

1. Плескова С.Н. Наноматериалы и их гематотоксические свойства. Нижний Новгород, 2018. 170 с. [Pleskova S.N. Nanomaterials and their hematotoxic properties]. N. Novgorod, 2018. 170 p.
2. Al-Jumaa M., Hallett M.B., Dewitt S. Cell surface topography controls phagocytosis and cell spreading: The membrane reservoir in neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta*, 2020, Vol. 1867, no. 12, 118832. doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118832.
3. Bouti P., Zhao X.W., Verkuijlen P.J.J.H., Tool A.T.J., van Houdt M., Köker N., Köker M.Y., Keskin O., Akbayram S., van Bruggen R., Kuijpers T.W., Matlung H.L., van den Berg T.K. Kindlin3-dependent CD11b/CD18-integrin activation is required for potentiation of neutrophil cytotoxicity by CD47-SIRPalpha checkpoint disruption. *Cancer Immunol. Res.*, 2021, Vol. 9, no. 2, pp.147-155.
4. Garley M., Jabłońska E., Sawicka-Powierza J., Ratajczak-Wrona W., Kłoczko J., Piszcz J. Expression of subtypes of interleukin-17 ligands and receptors in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Lab.*, 2014, Vol. 60, no. 10, pp. 1677-1683.
5. Giudice E.D., Ciaramella A., Balestro N., Neumann D., Romano P.G., Cesaroni M.P., Maurizi G., Ruggiero P., Boraschi D., Bossù P. Neutrophil apoptosis in autoimmune Fas-defective MRL lpr/lpr mice. *Eur. Cytokine Netw.*, 2001, Vol. 12, no. 3, pp. 510-517.
6. Golay J., Valgardsdottir R., Musaraj G., Giupponi D., Spinelli O., Introna M. Human neutrophils express low levels of FcγRIIIA, which plays a role in PMN activation. *Blood*, 2019, Vol. 133, no.13, pp.1395-1405.
7. Jaber B.L., Perianayagam M.C., Balakrishnan V.S., King A.J., Pereira B.J. Mechanisms of neutrophil apoptosis in uremia and relevance of the Fas (APO-1, CD95)/Fas ligand system. *J. Leukoc. Biol.*, 2001, Vol. 69, no. 6, pp.1006-1012.
8. Jensen K.N., Omarsdottir S.Y., Reinhardsdottir M.S., Hardardottir I., Freysdottir J. Docosahexaenoic Acid Modulates NK Cell Effects on Neutrophils and Their Crosstalk. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 570380. doi: 10.3389/fimmu.2020.570380.
9. Kelm M., Lehoux S., Azcutia V., Cummings R.D., Nusrat A., Parkos C.A., Brazil J.C. Regulation of neutrophil function by selective targeting of glycan epitopes expressed on the integrin CD11b/CD18. *FASEB J.*, 2020, Vol. 34, no. 2, pp. 2326-2343.
10. Lau D., Mollnau H., Eiserich J.P., Freeman B.A., Daiber A., Gehling U.M., Brümmer J., Rudolph V., Münzel T., Heitzer T., Meinertz T., Baldus S. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2005, Vol. 102, no. 2, pp. 431-436.
11. Lewkowicz N., Mycko M.P., Przygodzka P., Ćwiklińska H., Cichalewska M., Matysiak M., Selmaj K., Lewkowicz P. Induction of human IL-10-producing neutrophils by LPS-stimulated Treg cells and IL-10. *Mucosal Immunol.*, 2016, Vol. 9, no. 2, pp. 364-378.
12. Lu Y., Huang Y., Huang L., Xu Y., Wang Z., Li H., Zhang T., Zhong M., Gao W.Q., Zhang Y. CD16 expression on neutrophils predicts treatment efficacy of capecitabine in colorectal cancer patients. *BMC Immunol.*, 2020, Vol. 21, no. 1, 46. doi: 10.1186/s12865-020-00375-8.
13. Millrud C.R., Kågedal Å., Kumlien Georén S., Winqvist O., Uddman R., Razavi R., Munck-Wikland E., Cardell L.O. NET-producing CD16<sup>high</sup> CD62L<sup>dim</sup> neutrophils migrate to tumor sites and predict improved survival in patients with HNSCC. *Int. J. Cancer*, 2017, Vol. 140, no. 11, pp. 2557-2567.
14. Pleskova S.N., Gorshkova E.N., Novikov V.V., Solioz M. Treatment by serum up-conversion nanoparticles in the fluoride matrix changes the mechanism of cell death and the elasticity of the membrane. *Micron*, 2016, Vol. 90, pp. 23-32.
15. Pleskova S.N., Kriukov R.N., Bobyk S.Z., Boryakov A.V., Gorelkin P.V., Erofeev A.S. Conditioning adhesive contacts between the neutrophils and the endothelial cells by Staphylococcus aureus. *J. Mol. Recognit.*, 2020, Vol. 33, no. 9, e2846. doi: 10.1002/jmr.2846.
16. Roberts R.E., Hallett M.B. Neutrophil cell shape change: mechanism and signalling during cell spreading and phagocytosis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 6, 1383. doi: 10.3390/ijms20061383.
17. Rumalla V., Calvano S.E., Spotnitz A.J., Krause T.J., Lin E., Lowry S.F. The effects of glucocorticoid therapy on inflammatory responses to coronary artery bypass graft surgery. *Arch. Surg.*, 2001, Vol. 136, no. 9, pp. 1039-1044.
18. Saitoh T., Komano J., Saitoh Y., Misawa T., Takahama M., Kozaki T., Uehata T., Iwasaki H., Omori H., Yamaoka S., Yamamoto N., Akira S. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe*, 2012, Vol. 12, no. 1, pp. 109-116.
19. Song J., Wu C., Zhang X., Sorokin L.M. *In vivo* processing of CXCL5 (LIX) by matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 promotes early neutrophil recruitment in IL-1β-induced peritonitis. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 190, no. 1, pp. 401-410.
20. Sun B., Qin W., Song M., Liu L., Yu Y., Qi X., Sun H. Neutrophil suppresses tumor cell proliferation via fas /fas ligand pathway mediated cell cycle arrested. *Int. J. Biol. Sci.*, 2018, Vol. 14, no. 14, pp. 2103-2113.

21. Tecchio C., Scapini P., Pizzolo G., Cassatella M.A. On the cytokines produced by human neutrophils in tumors. *Semin. Cancer Biol.*, 2013, Vol. 23, no. 3, pp. 159-170.
22. Thiam H.R., Wong S.L., Wagner D.D., Waterman C.M. Cellular Mechanisms of NETosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2020, Vol. 36, pp. 191-218.
23. White C., DiStefano T., Olabisi R. The influence of substrate modulus on retinal pigment epithelial cells. *J. Biomed Mater. Res. A.*, 2017, Vol. 105, no. 5, pp. 1260-1266.

---

**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

**Антонеева И.И.** — д.м.н., доцент, профессор кафедры онкологии и лучевой диагностики ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет»; заведующая отделением онкогинекологии ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер г. Ульяновска», г. Ульяновск, Россия

**Генинг С.О.** — ассистент кафедры физиологии и патофизиологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

**Гноевых В.В.** — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой пропедевтики и внутренних болезней ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», 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

**Antoneeva I.I.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Oncology and Radiology, Ulyanovsk State University; Head, Department of Oncogynecology, Regional Clinical Oncology Center of Ulyanovsk, Ulyanovsk, Russian Federation

**Gening S.O.**, Assistant Professor, Department of Physiology and Pathophysiology, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

**Gnoevykh V.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Propedeutics and Internal Medicine, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

---

Поступила 14.05.2021  
Принята к печати 20.07.2021

---

Received 14.05.2021  
Accepted 20.07.2021

## ГЕТЕРОГЕННОСТЬ НК-КЛЕТОК ПРИ ТУБЕРКУЛЕМАХ ЛЕГКИХ, В ТОМ ЧИСЛЕ С НАЛИЧИЕМ В СТРУКТУРЕ КОМОРБИДНОСТИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

Бердюгина О.В.

ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук,  
г. Екатеринбург, Россия

**Резюме.** Интерес к изучению полиморфизма клеток иммунной системы растет с развитием в проточной цитофлуориметрии многоцветного анализа. Естественные киллеры представлены несколькими субпопуляциями. Их созревание является непрерывным процессом, который начинается с CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>-клетки и заканчивается зрелыми клетками с фенотипом CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>. Одной из областей для изучения полиморфизма НК-клеток является фтизиатрия, в связи с тем, что механизм длительного персистирования *M. tuberculosis* в организме человека до конца не изучен. Более того, появляется все больше пациентов с коморбидной инфекцией, включающей вирус иммунодефицита человека. Целью данного исследования стало определение некоторых субпопуляций НК-клеток у пациентов с туберкулемами легких при, а также в отсутствие синергичного инфицирования вирусом иммунодефицита человека.

Обследовано 46 человек, сгруппированных в три когорты. В первую группу были включены 24 практически здоровых человека, вторая группа объединила 12 больных с туберкулемами легких без клинических и лабораторных признаков наличия ВИЧ-инфекции, третья группа была представлена 10 больными с туберкулемами легких и инфицирована ВИЧ. Возбудитель туберкулеза легких у всех больных был лекарственно-устойчивым. Все больные ВИЧ-инфекцией имели 4-ю стадию заболевания. Иммунологическое исследование выполнялось методом проточной цитофлуориметрии. Детектировали следующие популяции клеток: CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>, CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>. Лейкоцитоз и лейкограмму определяли на клиническом анализаторе 5 Diff Mythic 22 AL (Cormay, Poland). Статистические исследования данных выполнены в операционной среде Windows 10 (Microsoft Corp., USA), использована компьютерная программа Statistica v. 12.5 (StatSoft, USA). Оценивали нормальность распределения полученных данных. В качестве критериев оценки различий между сравниваемыми группами использованы Kruskal–Wallis one-way analysis of variance ( $p_{k-w}$ ) при уровне значимости различий  $p < 0,017$  (между тремя несвязанными группами № 1, № 2 и № 3), а также Wald–Wolfowitz test ( $p_{w-w}$ ) при уровне значимости различий  $p < 0,05$  (между двумя несвязанными группами № 2 и № 3). Выполнялся факторный анализ.

Установлено, что наличие туберкулем легких сопровождается снижением количества НК-клеток на 33%, двукратным понижением численности НКТ-клеток, уменьшением на 34,3% популяции CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> клеток, снижением на 21,7% количества CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>-клеток. Наличие ВИЧ-

### Адрес для переписки:

Бердюгина Ольга Викторовна  
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»  
Уральского отделения Российской академии наук  
620049, Россия, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.  
Тел.: 8 (904) 988-43-82.  
E-mail: berolga73@rambler.ru

### Address for correspondence:

Berdyugina Olga Viktorovna  
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch,  
Russian Academy of Sciences  
620049, Russian Federation, Ekaterinburg,  
Pervomayskaya str., 106.  
Phone: 7 (904) 988-43-82.  
E-mail: berolga73@rambler.ru

### Образец цитирования:

О.В. Бердюгина «Гетерогенность НК-клеток при туберкулемах легких, в том числе с наличием в структуре коморбидности ВИЧ-инфекции» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 3. С. 363-372. doi: 10.46235/1028-7221-231-HON  
© Бердюгина О.В., 2021

### For citation:

O.V. Berdyugina "Heterogeneity of NK-cells in pulmonary tuberculous granulomas, including association with HIV infection", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 3, pp. 363-372. doi: 10.46235/1028-7221-231-HON  
DOI: 10.46235/1028-7221-231-HON

инфекции при туберкулемах легких ассоциировано с понижением количества лейкоцитов, значительной вариабельностью количества лимфоцитов, снижением числа НК-клеток в 3 раза, НК-клеток, экспрессирующих  $\alpha$ -цепь антигена CD8 – в 2,3 раза, NKT-клеток – в 6 раз, CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-клеток – на 42,9%, CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>-клеток – в 2,3 раза. Как у пациентов с туберкулемами легких, так и с наличием в структуре коморбидности ВИЧ-инфекции отмечено снижение контроля за инфекцией *M. tuberculosis*.

*Ключевые слова:* иммунология, проточная цитометрия, туберкулема, ВИЧ, НК-клетки, NKT-клетки, CD11b, HLA-DR, факторный анализ

## HETEROGENEITY OF NK-CELLS IN PULMONARY TUBERCULOUS GRANULOMAS, INCLUDING ASSOCIATION WITH HIV INFECTION

Berdyugina O.V.

*Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation*

**Abstract.** Interest in the study of cell population heterogeneity among immune system grows with advances in multicolor flow cytometry techniques. Natural killer cells are represented by several subpopulations. Their maturation is a continuous process that begins with CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>-cells and ends with mature cells with the CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>-phenotype. Phthisiology is one of the areas for studying the NK-cell polymorphism due to the fact that the mechanism of prolonged persistence of *M. tuberculosis* in the human body is not fully understood. Moreover, there is increasing number of patients with infectious comorbidities, including the human immunodeficiency virus (HIV) infection. The aim of this study was to determine some subpopulations of NK cells in the patients with pulmonary tuberculous granuloma, as well as in the absence of a synergistic HIV infection.

The study involved 46 people grouped in three cohorts. The 1<sup>st</sup> group included 24 practically healthy people, the 2<sup>nd</sup> group consisted of 12 patients with pulmonary tuberculous granuloma without clinical and laboratory signs of HIV infection, and the 3<sup>rd</sup> group was represented by 10 patients with pulmonary tuberculous granuloma infected with HIV. The causative agent of pulmonary tuberculosis in all patients was drug-resistant. All the patients with HIV infection had stage 4 disease. Immunological status was assessed by flow cytometry. The following cell populations were detected: CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>, CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>. Leukocytosis and leukogram were determined with a 5 Diff Mythic 22 AL clinical analyzer (Cormay, Poland). Statistical studies of the data were performed in the Windows 10 operating environment (Microsoft Corp., USA); the computer program Statistica v. 12.5 (StatSoft, USA) was used. The normality of the data distribution was also evaluated. Kruskal–Wallis one-way analysis of variance ( $p_{k-w}$ ) was used as criterion for assessing differences between the compared groups at a significance level of differences  $p < 0.017$  (between three unrelated groups), as well as Wald–Wolfowitz test ( $p_{w-w}$ ) with a significance level of differences  $p < 0.05$ . Factor analysis was performed.

We have found that the presence of pulmonary tuberculous granuloma is accompanied by a decrease of NK-cells number by 33%, a two-fold decrease in the number of NKT-cells, a 34.3% decrease in the population of CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-cells, and a 21.7% decrease in the number of CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>-cells. Co-infection with HIV in cases of pulmonary tuberculous granuloma was associated with a three-fold decrease in the leukocyte numbers, significant variability in lymphocyte counts, e.g., 3-fold decrease in NK-cell counts, with NK-cells expressing  $\alpha$ -chain of the CD8 antigen decreased by 2.3 times; 6-fold drop of NKT-cell, CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-cells decreased by 42.9%; 2.3-fold decline in CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>-cells. Decreased control of *M. tuberculosis* infection was observed both in patients with pulmonary tuberculous granuloma, and in presence of HIV infection as associated comorbidity.

*Keywords:* immunology, flow cytometry, tuberculous granuloma, HIV, NK-cells, NKT-cells, CD11b, HLA-DR, factor analysis

Работа выполнена по теме из Плана НИР ИИФ УрО РАН № гос. регистрации АААА-А21-121012090091-6.

## Введение

Интерес к изучению полиморфизма клеток иммунной системы возрастает с развитием в проточной цитофлуориметрии многоцветного анализа [4, 6]. Выявляемая гетерогенность описанных ранее популяций приводит к дифференциации новых типов клеток, у которых обнаруживаются индивидуальные особенности функционирования.

Естественные киллеры – клетки врожденного иммунитета, обладающие как собственным цитотоксическим потенциалом, так и способностью к продукции ряда цитокинов – представлены несколькими субпопуляциями, маркерами дифференцировки которых являются CD16 и CD56 [16]. Помимо этого, для оценки стадийности созревания клеток – выявления незрелых (Imm), зрелых 1 (M1) и зрелых 2 (M2) используют детекцию поверхностных CD11b- и CD27-антигенов [9]. Определяемые таким образом субпопуляции отличаются уровнем пролиферации и цитотоксичностью. Установлено, что на естественных клетках-киллерах экспрессия CD11b появляется, когда они приобретают свои полные эффекторные функции [8]. В таком случае NK-клетки теряют пролиферативный потенциал и продуцируют меньше цитокинов, становясь более цитотоксичными в отношении клеток-мишеней. Созревание NK-клеток является непрерывным процессом, который начинается с двойной отрицательной стадии CD27-CD11b-клетки (наиболее незрелая стадия) и заканчивается наиболее зрелыми клетками с фенотипом CD27-CD11b<sup>+</sup> [11]. Большинство CD11b<sup>+</sup> NK-клеток находятся в периферических органах, таких как селезенка, кровь, печень и легкие [5].

Одной из интересных областей для изучения полиморфизма NK-клеток является фтизиатрия, в связи с тем, что механизм длительного персистенции *M. tuberculosis* в организме человека до конца не изучен [15]. Помимо этого, появляется все большее число пациентов с коморбидной инфекцией, включающей вирус иммунодефицита человека (ВИЧ, human immunodeficiency virus, HIV), что значительно осложняет течение заболевания [12, 13]. Изучение фенотипических особенностей клеток у больных туберкулезом легких может позволить выявить изменения популяционного состава клеток, сопровождающего бактериальную и смешанную бактериально-вирусную инфекцию [10].

**Целью данного исследования** стало определение некоторых субпопуляций NK-клеток у па-

циентов с туберкулемами легких при, а также в отсутствие синергичного инфицирования вирусом иммунодефицита человека.

## Материалы и методы

В исследовании приняло участие 46 человек, сгруппированных в три когорты. В первую были включены 24 практически здоровых человека – 15 мужчин (62,5%) и 9 женщин (37,5%), средний возраст которых составил 37 лет (группа № 1), контрольная. Вторая объединила 12 больных с туберкулемами легких без клинических и лабораторных признаков наличия ВИЧ-инфекции – 8 мужчин (66,7%) и 4 женщины (33,3%), средний возраст которых составил 35 лет (группа № 2). Третья была представлена 10 больными с туберкулемами легких и инфицирована ВИЧ – 6 мужчин (60,0%) и 4 женщины (40,0%), средний возраст составил 39 лет (группа № 3). Во всех случаях диагноз A15.0 по МКБ (международной классификации болезней) был подтвержден клинико-инструментальными и лабораторными методами исследования. Возбудитель туберкулеза легких у всех пациентов был лекарственно-устойчивым. Среди больных туберкулезом не было потребителей наркотических средств, <sup>2</sup>/<sub>3</sub> курили табачные изделия. Все больные ВИЧ-инфекцией имели 4 стадию заболевания. Добровольное информированное согласие на проведение исследования получено от всех участников испытания.

Иммунологическое исследование выполнялось методом проточной цитофлуориметрии на приборе Coulter Epicx XL (Beckman Coulter, USA). Детектировали следующие популяции клеток: CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>, CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>16<sup>+</sup>56<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> с использованием реагентов, производимых фирмой-изготовителем оборудования. Лизис эритроцитов осуществляли на станции пробоподготовки Coulter Q-Prep (Beckman Coulter, USA). Лейкоцитоз и лейкограмму определяли на клиническом анализаторе 5 Diff Mythic 22 AL (Cormay, Poland). Кровь для исследования получали из периферической вены методом флеботомии в пробирку, содержащую антикоагулянт K<sub>3</sub>EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid, этилендиаминтетрауксусная кислота) из расчета 1,6 мг на каждый миллилитр биологической жидкости.

Полученные в результате исследования данные обрабатывали статистически. Предварительно оценивалась нормальность распределения показателей, для чего использовали ряд критериев: Шапиро–Уилка, Колмогорова–Смирнова, асимметрии и эксцесса, построения плоскостных, 2D,

а также нормальных вероятностных графиков. В качестве критериев оценки различий между сравниваемыми группами использованы Kruskal-Wallis one-way analysis of variance ( $p_{k-w}$ ) при уровне значимости различий  $p < 0,017$  (между тремя несвязанными группами № 1, № 2 и № 3), а также Wald-Wolfowitz test ( $p_{w-w}$ ) при уровне значимости различий  $p < 0,05$  (между двумя несвязанными группами № 2 и № 3). Для установления зависимости между изученными лабораторными показателями и клиническими данными выполнялся факторный анализ. Исследования проведены в операционной среде Windows 10 (Microsoft Corp., USA), использована компьютерная программа Statistica v. 12.5 (StatSoft, USA).

## Результаты и обсуждение

Предварительное изучение полученных данных заключалось в оценке определения плотности функции распределения значений лабораторных тестов, что соответствовало получению ответа на вопрос: какому закону распределения подчиняются определенные в исследовании лабораторные показатели? Использование как минимум семи различных критериев позволило установить, что преимущественно, однако не во всех случаях, распределение не соответствовало функции Гаусса. Этот факт дал основание полагать, что для сравнения исследованных выборок могут быть использованы непараметрические критерии, в частности для оценки различий между тремя несвязанными группами № 1, № 2, № 3 Kruskal-Wallis one-way analysis of variance, а для оценки различий между двумя несвязанными группами № 2 и № 3 Wald-Wolfowitz test.

Естественные киллеры, наряду с двумя другими основными популяциями клеток — Т- и В-лимфоцитами, — являются важными иммунокомпетентными клетками периферической крови человека. В процессе изучения пул этих клеток рассматривали с позиции репрезентативности в целом. В частности, определяя лейкоцитоз и соотношение основных популяций иммунокомпетентных клеток, установлено, что у больных с туберкулемами легких при наличии ВИЧ-инфекции 4-й стадии заболевания количество лейкоцитов периферической крови было на 22% меньше ( $p_{k-w} < 0,016$ ), чем в группе здоровых людей (табл. 1).

Количество лимфоцитов в исследованных группах не имело значимых отличий. Вместе с тем, обратил на себя внимание факт более широкого распределения данных у больных туберкулезом, сопровождавшимся ВИЧ-инфекцией, что отражало высокую вариабельность значений данного теста у больных (рис. 1). Такой разброс

результатов отмечался как при исследовании относительных, так и абсолютных значений лимфоцитов периферической крови.

Исследуя непосредственно соотношение основных популяций клеток, на первый взгляд существенных отличий в объемах Т- и В-лимфоцитов в обследованных группах выявлено не было. Вместе с тем был обнаружен факт снижения количества НК-клеток у больных с туберкулемами легких как без ВИЧ-инфекции, так и в случае коморбидности с ВИЧ на 33,3% и в 3 раза ( $p_{k-w} < 0,015$ ) соответственно, в сравнении со здоровыми людьми. Между группами больных туберкулезом при наличии и в отсутствие ВИЧ-инфекции также выявлялись различия, которые доходили до 2,2 раз ( $p_{w-w} < 0,015$ ) — наименьшая популяция НК-клеток регистрировалась при инфицировании ВИЧ (рис. 2).

Изучая полученные данные (табл. 1), возникает вопрос: если из трех основных популяций иммунокомпетентных клеток — Т-лимфоцитов, В- и НК-клеток — численность последней группы снижается, соответственно, пул оставшихся двух популяций должен был увеличиваться? Таких значимых изменений выявлено не было, однако очевидным становится факт перераспределения клеток: возрастания на 3,2% относительного количества Т-лимфоцитов и на 33,2% — В-клеток. Эти данные могут косвенно свидетельствовать об участии и этих популяций в развитии патологического процесса, что найдет свое подтверждение ниже — в оценке полученных результатов методом факторного анализа.

В ходе исследования были рассмотрены некоторые популяции НК-клеток (табл. 2). В частности клетки, экспрессирующие  $\alpha$ -цепь антигена CD8. Из ранее опубликованных данных известно, что примерно 30% НК-клеток периферической крови экспрессируют гомодимер CD8 $\alpha$ , такие клетки демонстрируют лучшую выживаемость при уничтожении клеток-мишеней [1]. В нашем исследовании у пациентов с туберкулемами легких существенных отличий в количестве таких клеток от популяции здоровых людей выявлено не было, при коморбидности бактериальной и вирусной инфекций количество CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-клеток было снижено более чем в 2,3 раза в сравнении с контрольной группой. Полученные данные согласуются со сведениями, полученными ранее, о значительном снижении популяции CD8<sup>+</sup>НК-клеток у нелеченых ВИЧ-инфицированных пациентов, которые коррелируют с вирусной нагрузкой и обратно пропорционально числу CD4<sup>+</sup>Т-клеток [2].

Данные о роли НКТ-клеток в контексте туберкулезной инфекции остаются спорными. Их описывают как подгруппу регуляторных Т-лим-

ТАБЛИЦА 1. ДАННЫЕ СТАТИСТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА В ГРУППАХ СРАВНЕНИЯ, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>), M

TABLE 1. STATISTICAL ANALYSIS DATA IN COMPARISON GROUPS, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>), M

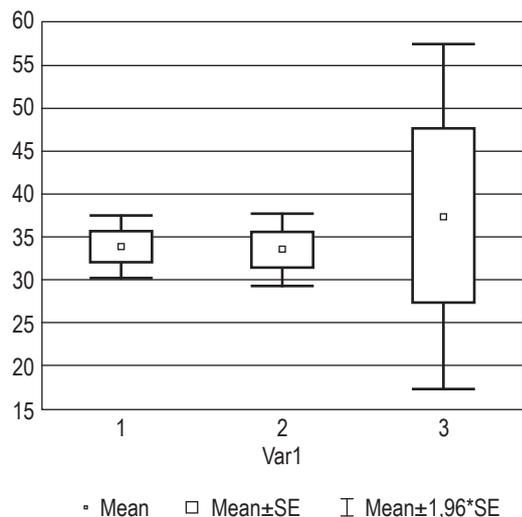
Показатель, единицы измерения Indicator, units of measure	Контрольная группа (№ 1) Control group (No. 1)	Больные с туберкулемами легких в отсутствие ВИЧ (№ 2) Patients with pulmonary tuberculous granulomas in the absence of HIV (No. 2)	Больные с туберкулемами легких и ВИЧ (№ 3) Patients with tuberculosis granulomas in the lungs and HIV (No. 3)
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л Leukocytes, 10 <sup>9</sup> /l	5,70 (4,85-6,10) 5,91	5,30 (4,60-6,25) 5,93	4,45 (3,55-5,40) 4,50 p <sub>k-w</sub> < 0,016 (№ 1)
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	32,75 (27,00-40,50) 34,33	32,30 (29,85-39,90) 33,63	35,25 (28,50-44,30) 37,55
Лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л Lymphocytes, 10 <sup>9</sup> /l	1,92 (1,72-2,34) 2,06	1,80 (1,51-2,30) 1,87	1,95 (1,56-2,05) 1,66
Т-лимфоциты, % T-lymphocytes, % CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup>	75,55 (69,30-82,93) 76,19	76,80 (69,60-81,00) 74,01	78,00 (74,48-83,35) 79,83
Т-лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л T-lymphocytes, 10 <sup>9</sup> /l CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup>	1,60 (1,27-1,74) 1,58	1,31 (1,15-1,68) 1,38	1,60 (1,16-1,78) 1,35
В-клетки, % B-cells, % CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup>	10,55 (9,35-13,75) 11,39	10,90 (7,55-16,45) 12,65	14,05 (9,83-18,63) 14,40
В-клетки, 10 <sup>9</sup> /л B-cells, 10 <sup>9</sup> /l CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup>	0,23 (0,17-0,28) 0,24	0,20 (0,11-0,38) 0,24	0,19 (0,13-0,26) 0,21
НК-клетки, % NK-cells, % CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> 16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup>	12,85 (7,23-16,23) 12,38	9,50 (7,30-13,90) 11,61	4,30 (2,78-5,80) 4,28 p <sub>w-w</sub> < 0,015 (№ 2) p <sub>k-w</sub> < 0,006 (№ 1) p <sub>k-w</sub> < 0,016 (№ 2)
НК-клетки, 10 <sup>9</sup> /л NK-cells, 10 <sup>9</sup> /l CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> 16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup>	0,24 (0,13-0,38) 0,26	0,16 (0,11-0,26) 0,22	0,08 (0,04-0,11) 0,08 p <sub>w-w</sub> < 0,036 (№ 2) p <sub>k-w</sub> < 0,015 (№ 1) p <sub>k-w</sub> < 0,016 (№ 2)

Примечание. Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>), M – медиана, межквартильный размах, среднее арифметическое величины. Уровень значимости: p<sub>k-w</sub> (Kruskal–Wallis one-way analysis of variance) p < 0,017 (между тремя несвязанными группами № 1, № 2 и № 3); p<sub>w-w</sub> (Wald–Wolfowitz test) p < 0,05 (между двумя несвязанными группами № 2 и № 3).

Note. Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>), M, median, interquartile range, arithmetic mean. Significance level: p<sub>k-w</sub> (Kruskal–Wallis one-way analysis of variance) p < 0.017 (between three unrelated groups No. 1, No. 2 and No. 3); p<sub>w-w</sub> (Wald–Wolfowitz test) p < 0.05 (between two unrelated groups No. 2 and No. 3).

фоцитов, которые, как полагают, находятся под контролем вспомогательных клеток и растворимых факторов в локальной микроокружающей среде. Показано, что НКТ-клетки при инфекциях секретируют, с одной стороны, провоспалитель-

ные цитокины, которые стимулируют врожденные и адаптивные реакции, которые устраняют патогены, с другой стороны секретируют противовоспалительные цитокины, которые ограничивают увеличение очага [3]. В нашем исследо-

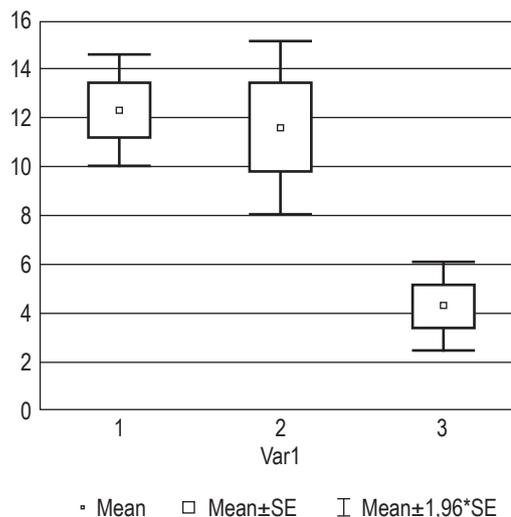


**Рисунок 1.** Относительное количество лимфоцитов у здоровых людей (№ 1), больных с туберкулемами легких (№ 2), пациентов с туберкулемами легких в сочетании с ВИЧ-инфекцией (№ 3)

Примечание. Mean – среднее арифметическое величин, SE – стандартная ошибка.

Figure 1. Relative number of lymphocytes in control group (No. 1), patients with pulmonary tuberculous granulomas in the absence of HIV (No. 2), patients with tuberculosis granulomas in the lungs and HIV-infection (No. 3)

Note. Mean, arithmetic mean; SE, standard error.

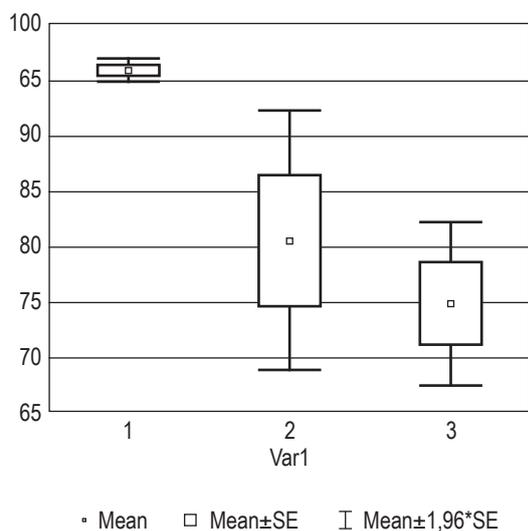


**Рисунок 2.** Относительное количество NK-клеток у здоровых людей (№ 1), больных с туберкулемами легких (№ 2), пациентов с туберкулемами легких в сочетании с ВИЧ-инфекцией (№ 3)

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. Relative number of NK-cells in control group (No. 1), patients with pulmonary tuberculous granulomas in the absence of HIV (No. 2), patients with tuberculosis granulomas in the lungs and HIV-infection (No. 3)

Note. As for Figure 1.



**Рисунок 3.** Относительное количество NK-клеток, экспрессирующих CD11b у здоровых людей (№ 1), больных с туберкулемами легких (№ 2), пациентов с туберкулемами легких в сочетании с ВИЧ-инфекцией (№ 3)

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 3. Relative number of NK-cells, expressing CD11b in control group (No. 1), patients with pulmonary tuberculous granulomas in the absence of HIV (No. 2), patients with tuberculosis granulomas in the lungs and HIV-infection (No. 3)

Note. As for Figure 1.

вании было установлено, что наличие туберкулем легких сопровождалось двукратным снижением численности NKT-клеток ( $p_{k-w} < 0,016$ ) в периферической крови больных, а при ко-инфекции с ВИЧ – шестикратным уменьшением популяции клеток ( $p_{k-w} < 0,016$ ). К такому значительному снижению NKT-клеток в сосудистом русле может приводить их миграция в ткани – очаг воспалительного процесса. С другой стороны, такие изменения могут служить прогностическим признаком развития неблагоприятной ситуации.

HLA-DR – поверхностный рецептор, экспрессируемый клеткой при ее активации. Он может быть детектирован не только на Т-лимфоцитах, но и на В- и NK-клетках. Известно, что NK-клетки с фенотипом CD56<sup>bright</sup> несут на своей поверхности HLA-DR. Полагают, что при туберкулезе эти клетки играют защитную роль, секретируя большие количества IFN $\gamma$  [14]. Анализ результатов собственных исследований показал значимое снижение числа клеток с фенотипом CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, представленным суммарно активированными В- и NK-клетками у больных с туберкулемами легких. Пул этих клеток был ниже, чем в контрольной группе на 34,3% ( $p_{k-w} < 0,014$ ). При инфицировании больных туберкулезом ВИЧ, количество этих клеток составляло около половины от уровня, установленного

ТАБЛИЦА 2. ДАННЫЕ СТАТИСТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА В ГРУППАХ СРАВНЕНИЯ, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>), M

TABLE 2. STATISTICAL ANALYSIS DATA IN COMPARISON GROUPS, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>), M

Показатель, единицы измерения Indicator, units of measure	Контрольная группа (№ 1) Control group (No. 1)	Больные с туберкулемами легких в отсутствие ВИЧ (№ 2) Patients with pulmonary tuberculous granulomas in the absence of HIV (No. 2)	Больные с туберкулемами легких и ВИЧ (№ 3) Patients with tuberculosis granulomas in the lungs and HIV (No. 3)
НК-клетки, экспрессирующие α-цепь антигена CD8, % NK-cells, expression CD8, % CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	2,25 (1,50-6,00) 2,25	3,70 (1,80-4,65) 4,08	1,40 (0,95-1,95) 1,50 p <sub>w-w</sub> < 0,040 (№ 2) p <sub>k-w</sub> < 0,016 (№ 2)
НК-клетки, экспрессирующие α-цепь антигена CD8, 10 <sup>9</sup> /л NK-cells, expression CD8, 10 <sup>9</sup> /l CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	0,07 (0,02-0,15) 0,07	0,06 (0,03-0,11) 0,08	0,03 (0,01-0,04) 0,03 p <sub>k-w</sub> < 0,016 (№ 2)
НКТ-клетки, % NKT-lymphocytes, % CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	2,42 (1,41-4,23) 3,31	1,30 (0,70-3,00) 2,35	1,25 (0,60-2,13) 1,48
НКТ-клетки, 10 <sup>9</sup> /л NKT-lymphocytes, 10 <sup>9</sup> /l CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,06 (0,02-0,09) 0,06	0,03 (0,01-0,05) 0,05 p <sub>k-w</sub> < 0,016 (№ 1)	0,01 (0,01-0,02) 0,02 p <sub>k-w</sub> < 0,016 (№ 1)
В-лимфоциты и активированные НК-клетки, % B-cells and activated natural killer cells, % CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	18,22 (16,11-20,38) 18,37	12,10 (9,10-15,30) 12,84	14,65 (10,63-18,78) 14,75
В-лимфоциты и активированные НК-клетки, 10 <sup>9</sup> /л B-cells and activated natural killer cells, 10 <sup>9</sup> /l CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	0,35 (0,32-0,41) 0,36	0,23 (0,15-0,32) 0,24 p <sub>k-w</sub> < 0,014 (№ 1)	0,20 (0,14-0,28) 0,21 p <sub>k-w</sub> < 0,012 (№ 1)
НК-клетки, экспрессирующие CD11b, % NK-cells with expression CD11b, % CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup>	96,50 (92,75-100,00) 96,60	88,42 (79,86-84,25) 85,37 p <sub>k-w</sub> < 0,016 (№ 1)	78,72 (74,61-100,00) 86,96 p <sub>k-w</sub> < 0,016 (№ 1)
НК-клетки, экспрессирующие CD11b, 10 <sup>9</sup> /л NK-cells with expression CD11b, 10 <sup>9</sup> /l CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup>	0,23 (0,13-0,37) 0,25	0,18 (0,15-0,29) 0,23 p <sub>k-w</sub> < 0,005 (№ 1)	0,10 (0,07-0,11) 0,09 p <sub>k-w</sub> < 0,001 (№ 1) p <sub>w-w</sub> < 0,040 (№ 2) p <sub>k-w</sub> < 0,016 (№ 2)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

в группе здоровых людей (42,9 %, p<sub>k-w</sub> < 0,012). Оценивая наличие CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-клеток при инфицировании микобактериями необходимо понимать, что их присутствие облегчает контроль за возбудителем туберкулеза, поскольку раннее продуцирование IFNγ, вероятно, поддерживает численность вспомогательных клеток,

чувствительных к *M.tuberculosis*, и увеличивает цитотоксическую активность НК-клеток [3].

Интегрин CD11b (Mac-1) считается маркером зрелых NK-cell [7] и экспрессируется на подавляющем большинстве клеток, находящихся в периферическом русле. Проведенное исследование показало, что у больных с туберкулемами легких

ТАБЛИЦА 3. МАТРИЦА ФАКТОРНЫХ НАГРУЗОК  
TABLE 3. MATRIX OF FACTORIAL LOADINGS

Показатель Indicator	Фактор I Factor I	Фактор II Factor II	Фактор III Factor III
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л Leukocytes, 10 <sup>9</sup> /l	-0,692601	-0,016862	-0,332315
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	0,001233	0,389706	-0,536727
Лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л Lymphocytes, 10 <sup>9</sup> /l	-0,590409	0,300114	-0,724699
В-клетки, % B-cells, % CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup>	-0,059131	-0,955135	-0,130208
В-клетки, 10 <sup>9</sup> /л B-cells, 10 <sup>9</sup> /l CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup>	-0,390657	-0,682741	-0,538887
Т-лимфоциты, % T-lymphocytes, % CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup>	0,688793	0,584885	-0,362093
Т-лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л T-lymphocytes, 10 <sup>9</sup> /l CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup>	-0,268868	0,473650	-0,803374
НК-клетки, % NK-cells, % CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> 16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup>	-0,778766	0,110623	0,533208
НК-клетки, 10 <sup>9</sup> /л NK-cells, 10 <sup>9</sup> /l CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> 16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup>	-0,951982	0,203563	0,121004
НКТ-клетки, % NKT-lymphocytes, % CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	-0,797594	0,024261	-0,012234
НКТ-клетки, 10 <sup>9</sup> /л NKT-lymphocytes, 10 <sup>9</sup> /l CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	-0,834970	0,111684	-0,104747
НК-клетки, экспрессирующие α-цепь антигена CD8, % NK-cells, expression CD8, % CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	-0,580287	-0,124958	0,522045
НК-клетки, экспрессирующие α-цепь антигена CD8, 10 <sup>9</sup> /л NK-cells, expression CD8, 10 <sup>9</sup> /l CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	-0,796283	-0,018640	0,223660
В-лимфоциты и активированные НК-клетки, % B-cells and activated natural killer cells, % CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	-0,035415	-0,935850	-0,123126
В-лимфоциты и активированные НК-клетки, 10 <sup>9</sup> /л B-cells and activated natural killer cells, 10 <sup>9</sup> /l CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	-0,406350	-0,605307	-0,607777
НК-клетки, экспрессирующие CD11b, % NK-cells with expression CD11b, % CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup>	-0,862940	0,178066	0,224270
НК-клетки, экспрессирующие CD11b, 10 <sup>9</sup> /л NK-cells with expression CD11b, 10 <sup>9</sup> /l CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup>	-0,928474	0,273506	-0,015371
Expl. Var.	7,121098	3,618500	3,075287
Prp. Totl.	0,418888	0,212853	0,180899

Примечание. Expl. Var. – дисперсия фактора, Prp. Totl. – доля дисперсии, приходящаяся на фактор.

Note. Expl. Var., the variance of the factor; Prp. Totl., the proportion of variance attributable to the factor.

количество CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>-клеток было снижено на 21,7% ( $p_{k-w} < 0,005$ ) в сравнении с контрольной группой, а при коморбидной инфекции с ВИЧ таких клеток было в 2,3 раза меньше, чем в группе здоровых людей (рис. 3). Такое значимое снижение экспрессии, а значит, и эффекторных функций, не могло не отразиться на клинических проявлениях заболевания. О сходных изменениях в экспрессии CD11b у ВИЧ-инфицированных было заявлено в работе Milush J.M. и соавт. (2013), однако исследования не включали группы людей, больных туберкулезом.

Известно, что в ряде случаев непосредственное исследование лабораторных показателей не позволяет выявить изменения, характеризующие изучаемые патологические процессы. Это объясняется тем, что изменение каждого отдельного показателя возникает позже, чем нарушение корреляционных связей между несколькими из них. Своевременно обнаружить искажение корреляционных связей позволяет факторный анализ, который был использован в данной работе (табл. 3).

С учетом особенностей выполнения данного вида анализа: создания условий, при которых на каждый фактор приходилось бы не менее 1 лабораторного показателя — было выделено 3 наиболее значимых, определяющих особенности изученных патологических процессов. Первый фактор объединил 41,9% всей дисперсии и был представлен такими популяциями клеток как NK-, NKT-, NK-клетки, экспрессирующие  $\alpha$ -цепь антигена CD8 и NK-клетки, экспрессирующие CD11b. Второй фактор объединил 21,3% всей дисперсии, его составили В-клетки, а также В-лимфоциты и NK-клетки, экспрессирующие HLA-DR<sup>+</sup>, что косвенно подтвердило факт участия В-лимфоцитов в патологическом процессе. Третий фактор объединил 18,1% дисперсии и был представлен общим количеством лимфоцитов, а также Т-клетками периферической крови. Все остальные изменения были обусловлены неучтенными факторами. Три значимых фактора объясняли 81,3% всей зафиксированной дисперсии. В целом, стандартизированная форма представ-

ления параметров в факторном анализе соответствовала степени их равнозначных связей с изученными процессами в объекте исследования.

## Заключение

Поведенное исследование позволило установить, что туберкулемы легких сопровождаются снижением количества NK-клеток на 33%, двукратным понижением численности NKT-клеток, уменьшением на 34,3% популяции CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> клеток, снижением на 21,7% количества CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>-клеток. Все описанные изменения установлены в сравнении со значениями, полученными в группе здоровых людей. Наличие ВИЧ-инфекции при туберкулемах легких ассоциировано с понижением количества лейкоцитов, значительной вариабельностью количества лимфоцитов, снижением числа NK-клеток в 3 раза, NK-клеток, экспрессирующих  $\alpha$ -цепь антигена CD8 — в 2,3 раза, NKT-клеток — в 6 раз, CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-клеток — на 42,9%, CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>-клеток — в 2,3 раза.

Как у пациентов с туберкулемами легких, так и с наличием в структуре коморбидности ВИЧ-инфекции отмечено снижение контроля за инфекцией *M. tuberculosis*.

По результатам факторного анализа наибольшее значение в оценке больных с туберкулемами легких принадлежит слежению за численностью NK-, NKT-, NK-клеток, экспрессирующих CD11b, при коморбидности с ВИЧ-инфекцией — дополнительно за популяциями лимфоцитов, Т- и В-клеток.

Однако остается неясным вопрос: во время инфекции NKT-клетки усиливают провоспалительную реакцию на патогены или ингибируют ее, чтобы предотвратить развитие патологического процесса?

## Благодарности

Автор выражает благодарность учреждению, на клинической базе которого было выполнено исследование: Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии — филиал ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России.

## Список литературы / References

1. Addison E.G., North J., Bakhsh I., Marden C., Haq S., Al-Sarraj S., Malayeri R., Wickremasinghe R.G., Davies J.K., Lowdell M.W. Ligation of CD8 $\alpha$  on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity. *Immunology*, 2005, Vol. 116, pp. 354-361.
2. Ahmad F., Hong H.S., Jäckel M., Jablonka A., Lu I.N., Bhatnagar N., Eberhard J.M., Bollmann B.A., Ballmaier M., Zielinska-Skowronek M., Schmidt R.E., Meyer-Olson D. High frequencies of polyfunctional CD8<sup>+</sup> NK Cells in Chronic HIV-1 infection are associated with slower disease progression. *J. Virol.*, 2014, Vol. 88, no. 21, pp. 12397-12408.

3. Barcelos W., Sathler-Avelar R., Martins-Filho O.A., Carvalho B.N., Guimarães T.M., Miranda S.S., Andrade H.M., Oliveira M.H., Toledo V.P. Natural killer cell subpopulations in putative resistant individuals and patients with active *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Scand. J. Immunol.*, 2008, Vol. 68, pp. 92-102.
4. Baumgarth N., Roederer M. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J. Immunol. Methods*, 2000, Vol. 243, no. 1-2, pp. 77-97.
5. Chiossone L., Chaix J., Fuseri N., Roth C., Vivier E., Walzer T. Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood*, 2009, Vol. 113, no. 22, pp. 5488-5496.
6. Flores-Montero J., Kalina T., Corral-Mateos A., Sanoja-Flores L., Pérez-Andrés M., Martín-Ayuso M., Sedek L., Rejlova K., Mayado A., Fernández P., van der Velden V., Bottcher S., van Dongen J.J.M., Orfao A. Fluorochrome choices for multi-color flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, 2019, Vol. 475, 112618. doi: 10.1016/j.jim.2019.06.009.
7. Fu B., Tian Z., Wei H. Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects. *Immunology*, 2014, Vol. 141, no. 4, pp. 483-489.
8. Fu B., Wang F., Sun R., Ling B., Tian Z., Wei H. CD11b and CD27 reflect distinct population and functional specialization in human natural killer cells. *Immunology*, 2011, Vol. 133, no. 3, pp. 350-359.
9. Goh W., Huntington N.D. Regulation of murine natural killer cell development. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 130. doi: 10.3389/fimmu.2017.00130.
10. Harris L.D., Khayumbi J., Ongalo J., Sasser L.E., Tonui J., Campbell A., Odhiambo F.H., Ouma S.G., Alter G., Gandhi N.R., Day C.L. Distinct human NK cell phenotypes and functional responses to *Mycobacterium tuberculosis* in adults from TB endemic and non-endemic regions. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2020, Vol. 10, 120. doi: 10.3389/fcimb.2020.00120.
11. Isvoranu G., Surcel M., Huică R., Munteanu A.N., Pîrvu I.R., Ciotaru D., Constantin C., Bratu O., Neagu M., Ursaciuc C. Natural killer cell monitoring in cutaneous melanoma - new dynamic biomarker. *Oncol. Lett.*, 2019, Vol. 17, no. 5, pp. 4197-4206.
12. Milush J.M., López-Vergès S., York V.A., Deeks S.G., Martin J.N., Hecht F.M., Lanier L.L., Nixon D.F. CD56<sup>neg</sup> CD16<sup>+</sup> NK cells are activated mature NK cells with impaired effector function during HIV-1 infection. *Retrovirology*, 2013, Vol. 10, 158. doi: 10.1186/1742-4690-10-158.
13. Pohlmeier C.W., Gonzalez V.D., Irrinki A., Ramirez R.N., Li L., Mulato A., Murry J.P., Arvey A., Hoh R., Deeks S.G., Kukulj G., Cihlar T., Pflanz S., Nolan G.P., Min-Oo G. Identification of NK cell subpopulations that differentiate HIV-infected subject cohorts with diverse levels of virus control. *J. Virol.*, 2019, Vol. 93, no. 7, e01790-18.
14. Poli A., Michel T., Thérésine M., Andrès E., Hentges F., Zimmer J. CD56<sup>bright</sup> natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology*, 2009, Vol. 126, no. 4, pp. 458-465.
15. Venkatasubramanian S., Cheekatla S., Paidipally P., Tripathi D., Welch E., Tvinnereim A. R., Nurieva R., Vankayalapati R. IL-21-dependent expansion of memory-like NK cells enhances protective immune responses against *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal Immunol.*, 2017, Vol. 10, pp. 1031-1042.
16. Zimmer J. CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>dim</sup> Natural Killer (NK) cells: the forgotten population. *Hemasphere*, 2020, Vol. 4, no. 2, e348. doi: 10.1097/HS9.0000000000000348.

---

**Автор:**

**Бердюгина О.В.** — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

**Author:**

**Berdyugina O.V.**, PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

---

Поступила 20.05.2021  
Принята к печати 20.07.2021

Received 20.05.2021  
Accepted 20.07.2021

## **ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ МЕМБРАННЫХ МОЛЕКУЛ HLA-G У ЖЕНЩИН, ИМЕЮЩИХ ДЕТЕЙ С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА, ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ФРАКЦИИ ГАММА-ГЛОБУЛИНОВ, ПОЛУЧЕННОЙ ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ МНОГОРОЖАВШИХ ЖЕНЩИН**

**Шабалдин А.В.<sup>1,2</sup>, Деева Н.С.<sup>1</sup>, Сухих А.С.<sup>2</sup>, Вавин Г.В.<sup>2</sup>, Крюков П.М.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»,  
г. Кемерово, Россия

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

**Резюме.** Высокий уровень рождения детей с врожденными пороками сердца (ВПС) и существенный вклад этой патологии в формирование перинатальной, младенческой и детской смертности, а также уровень инвалидизации детей, в том числе после радикального хирургического лечения, определяют значимость поиска методов прогнозирования и профилактики риска формирования ВПС на этапе планирования беременности. Одной из ключевых молекул, участвующей в иммунных взаимодействиях материнского микроокружения с эмбрионом, является HLA-G. Известно, что наибольшее количество антител к антигенам HLA различных классов выявляется у многорожавших женщин. Остается открытым вопрос, через какие молекулы HLA реализуется эффект блокирования иммунного воспаления в системе «мать — эмбрион» — женские антитела или донорский иммуноглобулин.

Целью исследования было получение очищенного гамма-глобулинового препарата из крови многорожавших женщин и оценка его функциональной активности в отношении женских молекул HLA-G.

Гамма-глобулиновую фракцию (ГГФ) из крови многорожавших женщин получали с помощью аффинной хроматографии на системе DEAE Affi-Gel Blue (BioRad, США). Были сформированы две группы: контрольная группа из 14 здоровых мужчин и опытная из 14 женщин, имеющих детей с врожденными пороками сердца. Особенности изменения экспрессии HLA-G на лимфоцитах под воздействием ГГФ были оценены с помощью протокола проточной цитофлуориметрии с расчетом соответствующих коэффициентов в процентах.

Оценка функциональной активности концентрированной ГГФ показала, что в контрольной группе под ее воздействием подавлялась экспрессия HLA-G на CD3 положительных и отрицательных лимфоцитах по отношению к действию аутосыворотки. В основной группе эффект ГГФ на экспрессию HLA-G был разнонаправленным. Так, на лимфоцитах CD3 отрицательных ГГФ значимо подавляла

### **Адрес для переписки:**

Шабалдин Андрей Владимирович  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»  
650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6.  
Тел.: 8 (903) 907-51-97.  
E-mail: weit2007@yandex.ru

### **Address for correspondence:**

Shabaldin Andrey V.  
Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular  
Diseases  
650002, Russian Federation, Kemerovo, Sosnoviy blvrd, 6.  
Phone: 7 (903) 907-51-97.  
E-mail: weit2007@yandex.ru

### **Образец цитирования:**

А.В. Шабалдин, Н.С. Деева, А.С. Сухих, Г.В. Вавин,  
Крюков П.М. «Изменение экспрессии мембранных  
молекул HLA-G у женщин, имеющих детей с  
врожденными пороками сердца, под воздействием  
фракции гамма-глобулинов, полученной из плазмы  
крови многорожавших женщин» // Российский  
иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 3. С. 373-376.  
doi: 10.46235/1028-7221-987-AEO

© Шабалдин А.В. и соавт., 2021

### **For citation:**

A.V. Shabaldin, N.S. Deeva, A.S. Sukhikh, G.V. Vavin,  
P.M. Kryukov "Altered expression of cell membrane HLA-G  
molecules in mothers of children with inborn heart defects upon  
exposure to plasma gamma-globulin from multiparous women",  
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii  
Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 3, pp. 373-376.  
doi: 10.46235/1028-7221-987-AEO  
DOI: 10.46235/1028-7221-987-AEO

экспрессию мембранной молекулы HLA-G при сравнении с контрольной группой. В то же время по отношению к лимфоцитам CD3<sup>+</sup> ГГФ оказывала стимулирующий эффект или не оказывала блокирующего эффекта. Полученный препарат может быть прототипом иммуноглобулина для внутривенного введения. Кроме того, в дальнейшем можно будет использовать подобные иммуноглобулиновые препараты для иммунной профилактики несиндромальных спорадических ВПС на прегравидарном этапе, так и для лечения в ранние сроки беременности. Лечебный эффект будет заключаться в блокировании свободных для распознавания HLA-молекул эмбриобласта.

*Ключевые слова:* гамма-глобулин, врожденные пороки сердца, иммунопрофилактика

## ALTERED EXPRESSION OF CELL MEMBRANE HLA-G MOLECULES IN MOTHERS OF CHILDREN WITH INBORN HEART DEFECTS UPON EXPOSURE TO PLASMA GAMMA-GLOBULIN FROM MULTIPAROUS WOMEN

Shabaldin A.V.<sup>a,b</sup>, Deeva N.S.<sup>a</sup>, Sukhikh A.S.<sup>b</sup>, Vavin G.V.<sup>b</sup>,  
Kryukov P.M.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation*

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

**Abstract.** High incidence of newborns with inborn heart defects (HD) and sufficient contribution of this disorder into perinatal, infant and pediatric mortality, as well as disability levels, even after radical surgical treatment determine significance of search for novel methods of prediction and prevention of appropriate HD risks at the stage of pregnancy planning. HLA-G is among key molecules participating in immune interactions between maternal microenvironment and embryos. Maximal antibody titers for HLA antigens is detected in multiparous women. However, the question remains open, which HLA molecules participate in blockage of immune inflammation in the mother-embryo system: either by maternal antibodies, or by donor immune globulins. Hence, the aim of our study was to obtain enriched  $\gamma$ -globulin preparation from blood of multiparous women and evaluation of its activity towards female HLA-G molecules.

The  $\gamma$ -globulin fraction (GGF) was obtained from blood plasma of multiparous women by means of affine chromatography using DEAE Affi-Gel Blue system (BioRad, USA). We have formed 2 groups: a control group (14 healthy males), and experimental group of 14 women who gave birth to the children with inborn heart defects. The changes of HLA-G expression on lymphocytes exposed to GGF were evaluated according to a flow cytometry protocol with calculation of percentage values using appropriate quotients. Evaluation of functional activity exerted by the GGF concentrate in control group showed inhibition of HLA-G expression on CD3<sup>+</sup> and CD<sup>-</sup>-lymphocytes against effects of autologous serum. GGF effects in experimental group upon HLA-G expression were differently directed, e.g., GGF sufficiently inhibited membrane HLA-G expression on the CD3-negative lymphocytes, compared to control group. Meanwhile, GGF showed stimulatory effect upon CD3<sup>+</sup>-lymphocytes, or it did not show any inhibitory action. The preparation obtained may serve as prototype for intravenous infusion. Moreover, in future one may use such immunoglobulin preparations, both for immune prophylaxis of non-syndromal sporadic HDs at the pregravidary stage, as well as at early terms of pregnancy. The therapeutic effect will be achieved due to blockage of embryoblast HLA molecules available to recognition.

*Keywords:*  $\gamma$ -globulin, inborn heart defects, immune prophylaxis

Исследование выполнено при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2019-0002.

### Введение

Известно, что врожденные пороки сердца (ВПС) являются ведущей аномалией раннего онтогенеза, которая определяет уровень неонаталь-

ной и младенческой смертности, а также уровень инвалидизации детей, в том числе после радикального хирургического лечения [4]. Именно это определяет значимость поиска методов профилактики риска формирования ВПС на этапе планирования беременности.

Высказано мнение, что спорадические несиндромальные ВПС, удельный вес которых в структуре ВПС составляет свыше 80%, могут формироваться в результате иммунного конфликта по HLA в системе «мать – плод», за счет декомпенсации локального воспаления [1].

С этих позиций иммуноглобулиновые препараты, широко используемые для лечения аллоиммунных форм репродуктивных потерь, могут выступить прототипом для иммунной профилактики спорадических несиндромальных ВПС на прегравидарном этапе.

Одной из ключевых молекул, участвующих в иммунных взаимодействиях материнского микроокружения с эмбрионом, является HLA-G. Известно, что наибольшее количество антител к антигенам HLA различных классов выявляется у многорожавших женщин [3]. Остается открытым вопрос, через какие молекулы HLA реализуется эффект блокирования иммунного воспаления в системе «мать – эмбрион» – женские антитела или донорский иммуноглобулин.

Исходя из этого, была поставлена **цель исследования** – получение очищенного гамма-глобулинового препарата из крови многорожавших женщин и оценка его функциональной активности в отношении женских молекул HLA-G.

## Материалы и методы

Для получения очищенной гамма-глобулиновой фракции (ГГФ) из крови многорожавших женщин была выполнена аффинная хроматография при помощи системы DEAE Affi-Gel Blue (BioRad, США). Оценка функциональной активности иммуноглобулинового препарата в отношении молекул HLA-G была выполнена на лимфоцитах, полученных из периферической крови 14 условно здоровых мужчин репродуктивного возраста (контрольная группа) и 14 женщин, имеющих детей с СНВПС (основная группа). Использовали проточную цитофлуориметрию, выполненную на приборе Cytomics FC 500 с программным обеспечением СХР (Beckman Coulter, США). Особенности изменения экспрессии HLA-G на донорских лимфоцитах под воздействием ГГФ были оценены с помощью протокола проточной цитофлуориметрии с расчетом соответствующих коэффициентов, в процентах [2]. Статистическая обработка данных проводилась в пакетах программ STATISTICA версия 10.0 и MedCalc 17.5.3. по правилам вариационной статистики.

Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

На первом этапе было получено 42 мл иммуноглобулиновой фракции с концентрацией общего белка 4,3 г/л и остаточным альбумином менее 0,1 г/л (Architect C8000, Abbott, США). Концентрация белка в полученной фракции соответствовала нижней границе концентрации иммуноглобулина G в сыворотке крови человека. Иммуноэлектрофорез показал, что в хроматографическом смыве имеется только гамма-глобулиновая фракция (ГГФ).

Коммерческие иммуноглобулиновые препараты имеют концентрацию от 60 до 100 г/л. Исходя из этого, провели концентрирование полученной ГГФ с использованием лиофилизации (LABCONCO, США) и повторным разведением лиофилизата в 4 мл физиологического раствора NaCl (0,9%). Повторное исследование концентрации белка в полученном растворе показало величину, равную 40 г/л, с минимальным остаточным альбумином.

Тем самым на первом этапе исследования был получен близкий к коммерческому препарат гамма-глобулина с концентрацией 40 г/л.

Оценка функциональной активности концентрированной ГГФ показала, что в контрольной группе под ее воздействием подавлялась экспрессия HLA-G на CD3 положительных и отрицательных лимфоцитах, по отношению к действию ауто-сыворотки (Me -13,57%,  $Q_{0,25}$  -46,59%,  $Q_{0,75}$  +19,38; Me -18,51%,  $Q_{0,25}$  -33,17%,  $Q_{0,75}$  -3,86 соответственно). Это изменение видимой экспрессии мембранной HLA-G могло быть результатом ее блокирования соответствующими антителами, входящими в состав ГГФ.

В основной группе (женщины, имеющие детей с спорадическими несиндромальными ВПС) эффект ГГФ на экспрессию HLA-G был разнонаправленным. Так, на лимфоцитах CD3 отрицательных ГГФ значимо подавляла экспрессию мембранной молекулы HLA-G (Me -37,19%,  $Q_{0,25}$  -58,64%,  $Q_{0,75}$  -15,68; против Me -13,57%,  $Q_{0,25}$  -46,59%,  $Q_{0,75}$  +19,38 в контроле,  $p = 0,02$ ) при сравнении с контрольной группой. В то же время по отношению к лимфоцитам CD3 положительным ГГФ оказывала стимулирующий эффект или не оказывала блокирующего эффекта. При сравнении этих показателей с контрольной группой также выявлено значимое различие (Me +8,21%,  $Q_{0,25}$  -27,81%,  $Q_{0,75}$  +50,38; против Me -18,51%,  $Q_{0,25}$  -33,17%,  $Q_{0,75}$  -3,86 в контроле,  $p = 0,01$ ).

## Заключение

Таким образом, очищенная гамма-глобулиновая фракция донорской крови многорожавших

женщин может оказать значимый иммунопрофилактический эффект на иммунные нарушения в системе «мать – эмбрион», через моделирование антителами экспрессии HLA-G на различных субпопуляциях женских лимфоцитов. Этот феномен гамма-глобулиновой фракции может быть основным для предотвращения формирования спорадических несиндромальных врожденных по-

роков сердца, а полученный препарат может быть прототипом иммуноглобулина для внутривенного введения, направленного для прегравидарной профилактики врожденных пороков сердца.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы / References

1. Нагорнева С.В., Прохорова В.С., Шелаева Е.В., Худовекова А.М. Анализ частоты выявления врожденных пороков развития у плодов за последние 5 лет (2013-2017) // Журнал акушерства и женских болезней, 2018. Т. 67, № 3. С. 44-48. [Nagorneva S.V., Prokhorova V.S., Shelaeva E.V., Khudovekova A.M. The prevalence of congenital fetal anomalies for the past 5 years (2013-2017). *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney = Journal of Obstetrics and Women's Diseases*, 2018, Vol. 67, no. 3, pp. 44-48. (In Russ.)]
2. Способ определения антител к аллогенным HLA-G. Шабалдин А.В., Мозес В.Г., Беленкова О.В., Шабалдина Е.В. Патент на изобретение RU 2585091 C1, 27.05.2016. Заявка № 2015101526/15 от 19.01.2015. [Method for the determination of antibodies to allogeneic HLA-G. Shabaldin A.V., Moses V.G., Belenkova O.V., Shabaldina E.V. Invention patent RU 2585091 C1, 05/27/2016. Application No. 2015101526/15 dated 19.01.2015].
3. Шабалдин А.В., Шмудевич С.А., Чистякова Г.Н., Ремизова И.И., Лукоянычева Е.Б., Горшкова С.В., Шабалдина Е.В. Особенности аллогенных взаимодействий в краткосрочной культуре лимфоцитов супругов, имеющих детей с врожденными пороками сердца или ранние репродуктивные потери // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 2. С. 279-292. [Shabaldin A.V., Shmulevich S.A., Chistyakova G.N., Remizova I.I., Lukoyancheva E.B., Gorshkova S.V., Shabaldina E.V. Peculiarities of allogenic interactions in the short-term culture of lymphocytes of spouses who have children with congenital heart diseases or early reproductive losses. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol.21, no. 2, pp. 279-292. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-279-292.
4. Wu Q.Y. To promote the sustainable development of surgical treatment for congenital heart disease by innovation and practice. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, 2018, Vol. 56, no. 6, pp. 407-409.

#### Авторы:

**Шабалдин А.В.** — д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории пороков сердца ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»; профессор кафедры микробиологии, иммунологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

**Деева Н.С.** — ординатор 1-го года ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

**Сухих А.С.** — к.фарм.н., старший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

**Вавин Г.В.** — к.м.н., заведующий центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

**Крюков П.М.** — к.м.н., ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

#### Authors:

**Shabaldin A.V.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Heart Defects, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases; Professor, Department of Microbiology, Immunology and Virology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

**Deeva N.S.**, Ordinator, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

**Sukhikh A.S.**, PhD, MD (Pharmacy), Senior Research Associate, Central Research Laboratory, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

**Vavin G.V.**, PhD (Medicine), Head, Central Research Laboratory, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

**Kryukov P.M.**, PhD (Medicine), Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 17.05.2021  
Принята к печати 20.07.2021

Received 17.05.2021  
Accepted 20.07.2021

## ОСОБЕННОСТИ СОЧЕТАНИЙ ПОЛИМОРФНЫХ САЙТОВ ГЕНОВ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ (TLR) У ДЕТЕЙ С ДЕФЕКТОМ МЕЖЖЕЛУДОЧКОВОЙ ПЕРЕГОРОДКИ

Шабалдин А.В., Цепочкина А.В., Шмудевич С.А., Понасенко А.В.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»,  
г. Кемерово, Россия

**Резюме.** Врожденные пороки сердца – ведущая причина инвалидизации и смертности в детском возрасте. Развитие новых технологий позволило продвинуться в диагностике и лечении врожденных пороков сердца, однако этиология данного патологического состояния остается до сих пор не изученной. Учитывая то, что патогенез данного заболевания имеет мультифакториальную природу, несомненной актуальностью обладает поиск биомаркеров, обладающих фундаментальной и практической значимостью. Одним из направлений исследований является изучение генетической составляющей. Toll-подобные рецепторы являются важными регуляторами восприимчивости к инфекционным и неинфекционным заболеваниям. Полиморфные варианты с однонуклеотидными заменами, присущие и этим генам, могут сопровождаться изменением структуры и экспрессии кодируемых ими белков, что будет сказываться на функциональной активности рецепторов. Цель: поиск генетических предикторов врожденных пороков сердца у детей.

Обследовано 47 детей (21 девочка и 26 мальчиков) с врожденными пороками сердца (у 23 детей – дефект межжелудочковой перегородки – ДМЖП, у 24 детей – дефект межпредсердной перегородки – ДМПП). Возраст обследованных пациентов основной группы был в пределах 5–8 лет. В качестве контроля было обследовано 96 условно здоровых детей, соответствующих по половому и возрастному критериям основной группе. Проведено типирование в режиме реального времени на амплификаторе Viia7 (Applied Biosystems, США) с использованием TaqMan зондов четырех генов *TLR* (*TLR1* rs5743611, rs5743551, *TLR2* rs5743708, rs3804099, *TLR4* rs4986791, rs4986790, *TLR6* rs3775073, rs5743810).

Все исследуемые полиморфизмы соответствовали закону равновесия Харди–Вайнберга. Показано, что риск развития ДМЖП ассоциирован с наличием в генотипе аллеля *G* *TLR2* rs5743708, а также с аллелем *T* полиморфного варианта rs3775073 гена *TLR6*. Кроме того, сочетание данных аллелей является значимым (по данным ROC-анализа,  $p < 0,05$ ) и имеет высокую чувствительность (82,4%). Оба полиморфизма *TLR2* (rs5743708) и *TLR6* (rs3775073) определяют аминокислотную замену (миссенс мутации) в молекулах TLRs. Таким образом, можно сделать вывод о том, что генетическое тестирование можно использовать для выявления групп риска на ранних стадиях.

**Ключевые слова:** TLR, врожденные пороки сердца, дефект межжелудочковой перегородки, дефект межпредсердной перегородки

### Адрес для переписки:

Шабалдин Андрей Владимирович  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»  
650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6.  
Тел.: 8 (903) 907-51-97.  
E-mail: weit2007@yandex.ru

### Address for correspondence:

Shabalдин Andrey V.  
Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular  
Diseases  
650002, Russian Federation, Kemerovo, Sosnoviy blvd, 6.  
Phone: 7 (903) 907-51-97.  
E-mail: weit2007@yandex.ru

### Образец цитирования:

А.В. Шабалдин, А.В. Цепочкина, С.А. Шмудевич,  
А.В. Понасенко «Особенности сочетаний полиморфных  
сайтов генов Toll-подобных рецепторов (TLR) у  
детей с дефектом межжелудочковой перегородки»  
// Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24,  
№ 3. С. 377-380.  
doi: 10.46235/1028-7221-993-FOP

### For citation:

A.V. Shabalдин, A.V. Tsepokina, S.A. Shmulevich,  
A.V. Ponasenko “Features of polymorphic site combinations  
of Toll-like receptor (TLR) genes in children with ventricular  
septal defects”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy  
Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 3, pp. 377-380.  
doi: 10.46235/1028-7221-993-FOP

DOI: 10.46235/1028-7221-993-FOP

© Шабалдин А.В. и соавт., 2021

## FEATURES OF POLYMORPHIC SITE COMBINATIONS OF TOLL-LIKE RECEPTOR (TLR) GENES IN CHILDREN WITH VENTRICULAR SEPTAL DEFECTS

Shabaldin A.V., Tsepokina A.V., Shmulevich S.A., Ponasenko A.V.

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

**Abstract.** Congenital heart disease is the leading cause of the childhood disability and mortality. The development of new technologies has made it possible to advance in diagnosis and treatment of congenital heart disease, but its etiology is poorly understood. Considering multifactorial origin of this disease, a search for biomarkers having fundamental and practical importance is of current interest. Study of the genetic component is one of the areas of research. E.g., Toll-like receptors (TLR) are important regulators of susceptibility to infectious and non-infectious diseases. Polymorphic variants with single nucleotide substitutions in these genes may be accompanied by changes in the structure and expression of the encoded proteins, thus affecting functional activity of these receptors. Our aim was to study some genetic predictors of congenital heart defects in children. **Materials and methods.** We examined 47 children (21 girls and 26 boys) with congenital heart defects: 23 children had a ventricular septal defect (VSD); 24 children, atrial septal defect (ASD). The patients in the main group were 1 to 9 years old. As a control group, 96 conditionally healthy age- and sex-matched children were examined. Real-time genotyping was carried out with Viia7 real-time PCR system (Applied Biosystems, USA) using TaqMan probes of four TLR genes (*TLR1* rs5743611, rs5743551, *TLR2* rs5743708, rs3804099, *TLR4* rs4986791, rs4986790, *TLR6* rs3775073, rs5743810). **Results.** The distribution of all studied polymorphic variants corresponded to the Hardy-Weinberg equilibrium. It was revealed that sporadic nonsyndromal VSD are associated with G allele of the *TLR2* gene (rs5743708) and T allele of the *TLR6* gene (rs3775073). According to ROC analysis, the combination of these alleles is a significant parameter showing high degree of sensitivity (82.4%). Both *TLR2* (rs5743708) and *TLR6* (rs3775073) gene variants define amino acid substitutions (missense mutations) in TLR molecules. Thus, we concluded that genetic testing can be used to identify risk groups at the early stages.

**Keywords:** TLR, congenital heart defects, ventricular septal defect, atrial septal defect

Исследование выполнено при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2019-0002.

### Введение

Эпидемиологические исследования в мире показали, что частота новорожденных детей с врожденными пороками сердца (ВПС) достигает 1%. Показано, что более 50% среди всех ВПС приходится на септальные формы [3]. Кроме того, многочисленные исследования показали, что более 80% ВПС не имеют семейных историй, не являются моногенными заболеваниями и не связаны с хромосомной патологией [1]. Тем самым, ВПС можно рассматривать как полигенные болезни, где конституциональные факторы взаимодействуют с экзогенными и эндогенными триггерами. В отечественной педиатрии сформировалось представление о том, что эта группа ВПС является эмбриопатией, развивающейся при нарушении соотношения процессов дифференцировки и пролиферации в кардиальных прогениторных клетках [4]. Эти процессы могут

регулироваться по цепочке: мембранные сигнальные рецепторы, каскадная сеть до факторов транскрипции и активация синтеза цитокинов, в том числе ответственных за пироптоз [2]. Важными сигнальными мембранными рецепторами являются Toll-подобные рецепторы (TLR). Активация этих рецепторов приводит к синтезу цитокинов и хемокинов. Полиморфные сайты генов *TLR* ассоциированы не только с различными иммунопатологическими заболеваниями, но и с клеточным циклом кардиальных прогениторных клеток [5]. С этих позиций, полиморфные участки *TLR* могут быть ассоциированы с ВПС.

**Целью исследования** стал поиск генетических предикторов развития врожденных пороков сердца у детей.

### Материалы и методы

В исследование включено 47 детей (21 девочка и 26 мальчиков) с врожденными пороками сердца, требующими кардиохирургического лечения (основная группа). Дефект межжелудочковой перегородки (ДМЖП) встречался у 23 детей, дефект межпредсердной перегородки (ДМПП) был

выявлен у 24 детей. Возраст обследованных пациентов был в пределах 1-9 лет.

В качестве контроля обследовано 96 условно здоровых детей, сопоставимых по возрасту с основной группой, проходивших профилактический осмотр у врача педиатра.

В основной и контрольной группах проводился сбор периферической в пробирки, содержащих КЗЭДТА, для последующего выделения геномной ДНК методом фенол хлороформной экстракции. Типирование полиморфных участков *TLR* проведен методом ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе Viia7 (Applied Biosystems, США) с использованием Taq man зондов. Для исследования отобрано четыре гена *TLR1* (rs5743611, rs5743551), *TLR2* (rs5743708, rs3804099), *TLR4* (rs4986791, rs4986790), *TLR6* (rs3775073, rs5743810), для отбора которых использовались базы данных dbSNP, SNPinfo, SNPnexus.

Статистическую обработку данных проводили в пакетах программ Statistica версия 10.0 и MedCalc 17.5.3. по правилам вариационной статистики. Анализ соблюдения закона Харди–Вайнберга проводили при помощи программы SNPstats. Для поиска предикторов ВПС в *TLR* была использована логистическая пошаговая регрессия. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Проведенное исследование показало, что распределение частот аллелей и генотипов *TLR* соответствовало теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди–Вайнберга во всей группе обследованных. Однако поиск предикторов ВПС среди полиморфных участков *TLR* не выявил статистически значимых ассоциаций.

## Список литературы / References

1. Демикова Н.С., Лапина А.С., Подольная М.А., Путинцев А.Н. Значение генетических исследований в изучении природы врожденных пороков развития // Российский вестник перинатологии и педиатрии, 2020. Т. 65, № 5. С. 7-11. [Demikova N.S., Lapina A.S., Podolnaya M.A., Putintsev A.N. The value of genetic research in the study of the nature of congenital malformations. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2020, Vol. 65, no. 5, pp. 7-11. (In Russ.)]
2. Кувачева Н.В., Моргун А.В., Хилажева Е.Д., Малиновская Н.А., Горина Я.В., Пожиленкова Е.А., Салмина А.Б. Формирование инфламмосом: новые механизмы регуляции межклеточных взаимодействий и секреторной активности клеток // Сибирское медицинское обозрение, 2013. № 5. С. 3-10. [Kuvacheva N.V., Morgun A.V., Khilazheva E.D., Malinovskaya N.A., Gorina Ya.V., Pozhilenkova E.A., Salmina A.B. Inflammasome formation: new mechanisms of regulation of intercellular interactions and secretory activity of cells. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie = Siberian Medical Review*, 2013, no. 5, pp. 3-10. (In Russ.)]
3. Нагорнева С.В., Прохорова В.С., Шелаева Е.В., Худовекова А.М. Анализ частоты выявления врожденных пороков развития у плодов за последние 5 лет (2013-2017) // Журнал акушерства и женских болезней, 2018. Т. 67, № 3. С.44-48. [Nagorneva S.V., Prokhorova V.S., Shelaeva E.V., Khudovcovova A.M. The prevalence of congenital fetal anomalies for the past 5 years (2013-2017). *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney = Journal of Obstetrics and Women's Diseases*, 2018, Vol. 67, no. 3, pp. 44-48. (In Russ.)]

При изучении взаимосвязей между полиморфными сайтами *TLR* с риском развития ДМЖП и ДМПП по отдельности выявлены статистически значимые ассоциации для сочетаний аллелей *TLR* с ДМЖП, но не с ДМПП.

Показано, что риск развития ДМЖП ассоциирован с наличием в генотипе аллеля *G TLR2* rs5743708, а также с аллелем *T* полиморфного варианта rs3775073 гена *TLR6*. Кроме того, сочетание данных аллелей является значимым (по данным ROC-анализа,  $p < 0,05$ ) и имеет высокую чувствительность (82,4%).

Оба полиморфизма *TLR2* (rs5743708) и *TLR6* (rs3775073) определяют аминокислотную замену (миссенс мутации) в молекулах TLRs, что будет отражаться в функциональной активности рецепторов. Причем, рецепторы семейства *TLR2* активно функционируют как мембранные гетеродимеры [6]. Соответственно реализация патологического эффекта, кодируемого этим сочетанием генотипов, может быть связана с доминированием на мембранах эмбриональных прогениторных кардиальных клеток гомодимеров *TLR2* и отсутствием гетеродимеров *TLR2-TLR6*. Этот феномен ограничивает внутриклеточный сигналинг и последующий за ним синтез молекул межклеточных контактов. Нарушенные межклеточные контакты при эмбриогенезе сердца могут быть основой патогенеза ДМЖП.

## Заключение

Полиморфные варианты rs5743708 *TLR2* и rs3775073 *TLR6* ассоциированы с риском развития ДМЖП.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

4. Шабалов Н.П. Неонатология: в 2 т. Т. 1: учебное пособие. 7-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. С. 53-131 [Shabalov N.P. Neonatology: in 2 vol. Vol. 1: textbook. 7<sup>th</sup> ed., revised and add]. Moscow: GEOTAR-Media, 2019, pp. 53-131.
5. Suluba E., Shuwei L., Xia Q., Mwanga A. Congenital heart diseases: genetics, non-inherited risk factors, and signaling pathways. *Egypt. J. Med. Hum. Genet.*, 2020, 11. doi: 10.1186/s43042-020-0050-1.
6. Qian C., Cao X. Regulation of Toll-like receptor signaling pathways in innate immune responses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2013, Vol. 1283, pp. 67-74.

---

**Авторы:**

**Шабалдин А.В.** — д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории пороков сердца ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

**Цепочкина А.В.** — младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

**Шмулевич С.А.** — к.м.н., старший преподаватель научно-образовательного отдела ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

**Понасенко А.В.** — к.м.н., заведующая лабораторией геномной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

**Authors:**

**Shabaldin A.V.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Heart Defects, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

**Tsepokina A.V.**, Junior Research Associate, Laboratory for Genomic Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

**Shmulevich S.A.**, PhD (Medicine), Senior Lecturer, Scientific and Educational Department, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

**Ponassenko A.V.**, PhD (Medicine), Head, Laboratory of Genomic Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

---

Поступила 17.05.2021  
Принята к печати 20.07.2021

---

Received 17.05.2021  
Accepted 20.07.2021

## ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗИ МАТЕРИНСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *HLA-G*, ВНУТРИМАТОЧНОЙ ИНФЕКЦИИ С РИСКОМ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ РАЗВИТИЯ У РЕБЕНКА

Гордеева Л.А.<sup>1</sup>, Воронина Е.Н.<sup>2</sup>, Гареева Ю.В.<sup>3</sup>, Поленок Е.Г.<sup>1</sup>,  
Мун С.А.<sup>1</sup>, Глушков А.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН «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> ООО «Медицинская Практика», г. Кемерово, Россия

**Резюме.** Изучали связь материнского полиморфизма гена *HLA-G*, внутриматочной инфекции с риском врожденных пороков развития у ребенка. Исследуемую группу (группа ВПР) составили 331 матерей с диагнозом у плода/новорожденного – ВПР. Из них на момент обследования 225 (68%) женщин были беременными (15-35 недель), а 106 (32%) – роженицы детей с ВПР. Диагноз ВПР плода устанавливался ультразвуковым исследованием (УЗИ) и подтверждался повторно в разные сроки пренатального периода. Постановка клинического диагноза у новорожденных осуществлялась неонатологами в соответствии с МКБ-10 (Q00-Q99). Критерием исключения были ВПР, ассоциированные с анеуплоидией и с сахарным диабетом у матери. Группу сравнения (контроль) составили 408 матерей без ВПР у плода/ребенка, из них 264 (65%) были беременными (15-36 нед.) и ранее имели 1-2 детей, 144 (35%) – роженицами доношенных и недоношенных I степени детей (родились в сроки 35-40 недель с массой тела больше 2000 г). Данные о внутриутробной инфекции у матери во время беременности были получены из медицинских карт обследуемых женщин. Учитывались результаты лабораторных тестов: микроскопического исследования (для выявления бактериального вагиноза и вульво-вагинального кандидоза); иммуноферментного анализа и полимеразно-цепной реакции (выявление генитального герпеса, цитомегаловируса, вируса папилломы человека (ВПЧ) типа 16/18; *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* и *Gardnerella vaginalis*; *Trichomonas vaginalis* и *Toxoplasma gondii*). 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. Наше исследование показало, что возраст матери не оказывал значимого влияния на риск ВПР у плода/новорожденного. В то же время внутриматочная инфекция у матерей была значимым фактором риска ВПР у детей (OR = 1,57 (1,08-2,29); p = 0,002). Выявлена значимая ассоциация материнского аллеля 110 Ile (*HLA-G\*01:04*) с риском ВПР у пло-

### Адрес для переписки:

Гордеева Людмила Александровна  
ФГБУН «Федеральный исследовательский центр  
угля и углехимии Сибирского отделения Российской  
академии наук»  
650065, Россия, г. Кемерово, пр. Ленинградский, 10.  
Тел.: 8 (913) 322-78-99.  
E-mail: gorsib@rambler.ru, ihe@kemtrel.ru

### Address for correspondence:

Gordeeva Lyudmila A.  
Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry,  
Siberian Branch, Russian Academy of Sciences  
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, Ю.В. Гареева,  
Е.Г. Поленок, С.А. Мун, А.Н. Глушков «Изучение  
связи материнского полиморфизма гена *HLA-G*,  
внутриутробной инфекции с риском врожденных  
пороков развития у ребенка» // Российский  
иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 3. С. 381-386.  
doi: 10.46235/1028-7221-1041-SOR

© Гордеева Л.А. и соавт., 2021

### For citation:

L.A. Gordeeva, E.N. Voronina, Yu.V. Gareeva, E.G. Polenok,  
S.A. Mun, A.N. Glushkov "Study of relationships between  
maternal *HLA-G* gene polymorphism and intrauterine infection  
with risk of congenital malformations", Russian Journal of  
Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021,  
Vol. 24, no. 3, pp. 381-386.  
doi: 10.46235/1028-7221-1041-SOR

DOI: 10.46235/1028-7221-1041-SOR

да/новорожденного (OR = 1,57 (1,08-2,29), p = 0,01). Полиморфные локусы rs41551813 и rs41557518 гена *HLA-G* у матери значимо не влияли на риск ВПП у ребенка. Полученные нами результаты демонстрируют, что внутриматочная инфекция и аллель 110Ile (*HLA-G\*01:04*) у матери могут выступать факторами риска ВПП у ребенка.

*Ключевые слова:* генетический полиморфизм, *HLA-G*, внутриматочная инфекция, врожденные пороки развития

## STUDY OF RELATIONSHIPS BETWEEN MATERNAL *HLA-G* GENE POLYMORPHISM AND INTRAUTERINE INFECTION WITH RISK OF CONGENITAL MALFORMATIONS

Gordeeva L.A.<sup>a</sup>, Voronina E.N.<sup>b</sup>, Gareeva Yu.V.<sup>c</sup>, Polenok E.G.<sup>a</sup>,  
Mun S.A.<sup>a</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> LLC "Medical Practice", Kemerovo, Russian Federation

**Abstract.** This study aims for assessing relationships between maternal *HLA-G* gene polymorphisms (rs41551813, rs12722477, rs41557518) and intrauterine infection with the risk of congenital malformations (CM) in infants. We studied 331 women who had offspring with CMs, and 408 women with one or more healthy children. Influence of the intrauterine infection was analyzed on the basis of laboratory tests. Diagnostics of bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis by microscopic examination were conducted. Viral infections (herpes simplex virus type 2, cytomegalovirus, human papilloma virus type 16/18) as well as *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Gardnerella vaginalis*; *Trichomonas vaginalis* and *Toxoplasma gondii* were detected by enzyme-linked immunoassay or polymerase chain reaction (PCR) techniques. The data were obtained from the medical cards of the surveyed women. The gene polymorphisms were typed for 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* using real-time PCR followed by melting analysis. The study showed that maternal age was not a significant risk factor for CMs in the fetus/newborns. Meanwhile, the maternal intrauterine infections were shown to be a significant risk factor for CMs in their infants (OR = 1.57 (1.08-2.29); p = 0.002). It was found that the 110 Ile allele (*HLA-G \*01:04*) was a risk factor for CMs incidence in the fetus/newborns (OR = 1.57 (1.08-2.29), p = 0.01). No association was found between the maternal rs41551813 and rs41557518 *HLA-G* genetic polymorphisms and CMs in the infants. Hence, intrauterine infections and maternal 110 Ile allele (*HLA-G \*01:04*) may be suggested as risk factors for birth defects in the children. Our results will be useful in understanding the molecular mechanisms of immune disorders in feto-maternal interface.

*Keywords:* congenital malformation, intrauterine infection, genetic polymorphism, *HLA-G*

### Введение

Как известно, истинные причины развития врожденных пороков развития (ВПП) у плода до сих пор остаются невыясненными. Уникальность функций молекул Главного комплекса гистосовместимости человека класса G (*HLA-G*) во время

беременности заключается в обеспечении механизмов толерантности материнской иммунной системы к полуаллогенному плоду и его защиты от патогенов [3]. Биологические функции молекул *HLA-G*, связанные с особенностями продукции их изоформ, взаимодействия с клеточными рецепторами и модуляции иммунного ответа,

контролируются полиморфными локусами гена *HLA-G* [7]. Целью данного исследования стало изучение связи материнского полиморфизма гена *HLA-G*, внутриматочной инфекции с риском врожденных пороков развития у ребенка.

## Материалы и методы

### Выборки

Исследуемую группу (группа ВПР) составили 331 матм с диагнозом у плода/новорожденного – «ВПР». Из них на момент обследования 225 (68%)

женщин были беременными (15–35 недель), а 106 (32%) – роженицы детей с ВПР. Диагноз «ВПР плода» был установлен с помощью ультразвукового исследования (УЗИ), подтверждаемый повторно в разные сроки пренатального периода. У 48 (14,7%) женщин беременность была прервана по медицинским показаниям. Постановка клинического диагноза у новорожденных осуществлялась неонатологами в соответствии с МКБ-10 (Q00-Q99). Структура аномалий развития у плода/ребенка представлена в таблице 1. Критерием

ТАБЛИЦА 1. СТРУКТУРА ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ РАЗВИТИЯ У ПЛОДА/НОВОРОЖДЕННОГО

TABLE 1. STRUCTURE OF CONGENITAL MALFORMATIONS IN FETUS/NEWBORN

№ No.	ВПР CM	n (%)	Аномалия Anomaly
1	Q20-Q28	75 (22,7)	<b>дефект межжелудочковой и/или предсердной перегородки, аномалии магистральных сосудов, тетрада Фалло</b> interventricular defect and/or atrial septum, tetralogy of Fallot, anomalies of the great vessels
2	<b>МВПР</b> Multiple malformations	63 (19,0)	<b>сочетание 2, 3 видов врожденных аномалий</b> a combination of 2, 3 types of congenital malformations
3	Q60-Q64	57 (17,2)	<b>врожденный гидронефроз, дисплазия почек (одно-/двухсторонняя), поликистоз почек</b> congenital hydronephrosis, renal dysplasia (one/two-sided), polycystic kidney disease
4	Q65-Q79	37 (11,2)	<b>полидактилия, укорочение трубчатых костей, отсутствие предплечья и кисти</b> polydactyly, shortening of tubular bones, absence of forearm and hand
5	Q38-Q45	15 (4,5)	<b>атрезия пищевода, гастрошизис и др. аномалии развития желудочно-кишечного тракта</b> esophageal atresia, gastroschisis, and other anomalies in the development of the gastrointestinal tract
6	Q00-Q07	58 (17,5)	<b>гидроцефалия, анэнцефалия, синдром Арнольда–Киари, spina bifida, экзенцефалия</b> hydrocephalus, anencephaly, Arnold-Chiari syndrome, spina bifida, exencephaly
7	Q35-Q37	13 (3,9)	<b>расщелина неба, расщелина верхней губы, расщелина губы и неба</b> cleft palate, cleft lip, cleft lip and palate
8	Q50-56	7 (2,1)	<b>кистозная аномалия развития яичника, гипоспадия</b> cystic ovarian malformation, hypospadias
9	прочие others	6 (1,8)	<b>синдром Робена (Q87.0); поликистоз легкого (Q33); поликистоз печени (Q44.6) и др.</b> Robin's syndrome (Q87.0); polycystic lung (Q33), polycystic liver (Q44.6) and etc.

исключения были ВПР, ассоциированные с анеуплоидией и с сахарным диабетом у матери.

Группу сравнения (контроль) составили 408 матерей без ВПР у плода/ребенка, из них 264 (65%) были беременными (15-36 нед.) и ранее имели 1-2 детей, 144 (35%) – роженицами доношенных и недоношенных I степени детей (родились в сроки 35-40 недель с массой тела больше 2000 г). Отсутствие ВПР у плода было подтверждено УЗИ, при рождении ребенка – неонатологами.

Влияние внутриматочной инфекции у матери во время беременности на формирование ВПР у ребенка анализировали на основании лабораторных тестов: микроскопического исследования (выявление бактериального вагиноза и вульвовагинального кандидоза); иммуноферментного анализа и полимеразно-цепной реакции (выявление генитального герпеса, цитомегаловируса, вируса папилломы человека (ВПЧ) типа 16/18; *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* и *Gardnerella vaginalis*; *Trichomonas vaginalis* и *Toxoplasma gondii*). Данные были получены из медицинских карт обследуемых женщин.

Получено письменное информированное согласие на участие в исследовании от всех обследуемых нами женщин. Исследование проводилось с соблюдением условий добровольности и конфиденциальности и одобрено местным этическим комитетом (протокол № 35/1 от 24.05.2021).

#### Генотипирование

Образцы ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови методом 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. Детальное описание используемых праймеров и зондов, а также сама постановка реакции амплификации приведена в работе [1]. Амплификацию проводили на термоциклере CFX96 (Bio Rad, США).

#### Статистическая обработка данных

В работе использовался пакет 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* равновесию Харди–Вайнберга (HWE), а также влияние инфекционного фактора во время беременности на

ВПР у ребенка оценивали с помощью критерия  $\chi^2$  Пирсона. В этом случае и при использовании других критериев нулевую гипотезу отвергали при  $p \leq 0,05$ . При сравнении количественных признаков использовали U-критерий Манна–Уитни.

Силу ассоциации материнских вариантов гена *HLA-G* с ВПР у ребенка – 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 и обсуждение

Изучали влияние возраста, внутриматочной инфекции во время беременности и полиморфных локусов rs41551813, rs12722477 и rs41557518 гена *HLA-G* у матери на формирование ВПР у ребенка (табл. 2). Наше исследование показало, что возраст матери не оказывал значимого влияния на риск ВПР у плода/новорожденного. В то же время внутриматочная инфекция у матери была значимым фактором риска ВПР у ребенка (OR = 1,57 (1,08-2,29);  $p = 0,002$ ).

Анализ распределения частот генотипов SNP rs41551813, rs12722477 и rs41557518 гена *HLA-G* у матерей в группах ВПР и контроль показал их соответствие равновесию Харди–Вайнберга ( $p$  (HWE)  $> 0,05$ , табл. 2). Выявлена значимая ассоциация материнского аллеля 110 Ile (*HLA-G\*01:04*) с риском ВПР у плода/новорожденного (OR = 1,57 (1,08-2,29),  $p = 0,01$ ). Полиморфные локусы rs41551813 и rs41557518 гена *HLA-G* у матери значимо не влияли на риск ВПР у ребенка. Полученные нами результаты демонстрируют, что внутриматочная инфекция и аллель 110Ile (*HLA-G\*01:04*) у матери могут выступать факторами риска ВПР у ребенка.

Как известно, вирусы и внутриклеточные паразиты используют иммуносупрессивные свойства молекул *HLA-G* для своего уклонения от иммунного ответа хозяина [3]. По данным литературы аллель *HLA-G\*01:04* ассоциирован с чувствительностью людей к вирусам ВИЧ-1 [8], гепатита С [5], ВПЧ типа 16 и 18 [6]. Обнаружено, что у финских женщин он связан с риском вертикальной передачи папилломавирусной инфекции ребенку при рождении [4]. Возможно, что у женщин с аллелем *HLA-G\*01:04* неконтролируемые вирусные инфекции могут быть причиной воспаления в плаценте, дестабилизирующего иммунотолерантность в системе мать–плод [2], и способного запускать механизмы терратогенеза. Наше исследование было ограничено только рассмотрением вопроса влияния внутриматоч-

**ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ ВОЗРАСТА, ВНУТРИМАТОЧНОЙ ИНФЕКЦИИ И ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ ГЕНА HLA-G У МАТЕРИ НА РИСК ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ РАЗВИТИЯ У РЕБЕНКА**

TABLE 2. INFLUENCE OF AGE, INTRAUTERINE INFECTION AND POLYMORPHIC LOCI OF THE HLA-G GENE IN THE MOTHER ON THE RISK OF CONGENITAL MALFORMATIONS IN THE CHILD

Фактор Factor	Параметр Parameter	ВПП CM N (f)	Контроль Control N (f)	OR (CI: 95%); p-value
возраст age	m±SD min-max	26,1±5,1 16-42	26,8±5,2 16-45	0,08
внутриутробная инфекция intrauterine infection	Есть Нет	178 (54,6%) 148 (45,4%)	177 (43,4%) 231 (56,6%)	1,57 (1,17-2,10); 0,002
ген HLA-G* HLA-G gene*	Thr31Ser rs41551813 Thr/Thr Thr/Ser Ser/Ser MAF (Ser, *01:03) P(HWE)	315 (0,952) 16 (0,048) – 16 (0,024) 0,65	389 (0,953) 19 (0,047) – 19 (0,023) 0,63	0,91
	Leu110Ile rs12722477 Leu/Leu Leu/Ile Ile/Ile MAF (Ile, *01:04) P(HWE)	269 (0,813) 57 (0,172) 5 (0,015) 67 (0,101) 0,33	355 (0,870) 52 (0,127) 1 (0,003) 54 (0,066) 0,52	1,57 (1,08-2,29); 0,01
	1597 delC rs41557518 C/C C/delC delC/delC MAF (delC, *01:05N) P(HWE)	312 (0,939) 19 (0,061) – 19 (0,029) 0,59	395 (0,968) 13 (0,032) – 13 (0,016) 0,74	0,09

Примечание. n – количество наблюдений; f – частота встречаемости генотипа/аллеля; MAF – частота встречаемости минорного аллеля; \* – изучалась аддитивная модель наследования.

Note. n, number of observations; f, frequency of genotypes/alleles; MAF, minor allele frequency; \*, the additive inheritance model studied (minor allele vs common allele).

ной инфекции в целом без учета роли вирусов, патогенных бактерий и внутриклеточных паразитов в формировании аномалии развития у плода, поэтому требуется продолжить исследование. В заключение, обнаружена связь внутриутробной инфекции и материнского аллеля 110Ile (HLA-G\*01:04) с риском развития ВПП у плода/новорожденного.

## Заключение

Таким образом, обнаружена связь внутриутробной инфекции и материнского аллеля 110Ile (HLA-G\*01:04) с риском врожденных пороков развития у плода и новорожденного. Наши результаты могут быть полезны для понимания молекулярных механизмов формирования врожденных пороков развития у ребенка.

## Список литературы / References

1. 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 // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 2. С. 369-380. [Gordeeva L.A., Voronina E.N., Polenok E.G., Mun S.A., Nersesyan S.L., Olennikova R.V., Filipenko M.L., Glushkov A.N. Study of relationships between HLA-G gene polymorphism, intrauterine infection and recurrent miscarriage in women.

*Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 2, pp. 369-380. (In Russ.)  
doi: 10.15789/1563-0625-SOR-2155.

2. Crespo Á.C., van der Zwan A., Ramalho-Santos J., Strominger J.L., Tilburgs T. Cytotoxic potential of decidual NK cells and CD8+ T cells awakened by infections. *J. Reprod. Immunol.*, 2017, Vol. 119, pp. 85-90.

3. 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.

4. 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.

5. 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.

6. 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.

7. 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>.

8. 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, pp. e25185. doi: 10.1371/journal.pone.0025185.

---

**Авторы:**

**Гордеева Л.А.** — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммуногенетики ФГБУН «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, группа молекулярной генетики ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

**Гареева Ю.В.** — врач-неонатолог клиники ООО «Медицинская Практика», г. Кемерово, Россия

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

**Глушков А.Н.** — д.м.н., заместитель директора ФГБУН «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, Molecular Genetics Group, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

**Gareeva Yu.V.**, Clinical Neonatologist, LLC “Medical Practice”, Kemerovo, 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

**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

---

Поступила 01.07.2021  
Принята к печати 20.07.2021

---

Received 01.07.2021  
Accepted 20.07.2021

## **ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК СПЕРМАТОЗОИДОВ И ОБЩАЯ АНТИРАДИКАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ СПЕРМЫ У МУЖЧИН С ОТЯГОЩЕННЫМ АНАМНЕЗОМ**

**Долгих О.В., Дианова Д.Г., Кривцов А.В.**

*ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Пермь, Россия*

**Резюме.** Различные внутриклеточные и внеклеточные стимулы могут спровоцировать избыточное накопление активных форм кислорода и приводить к пагубным эффектам на функции сперматозоидов, в частности повреждению ДНК сперматозоидов, что в итоге часто является причиной бесплодия. Целью исследования явилось методом проточной цитометрии оценить степень фрагментации ДНК сперматозоидов и спектрофотометрическим методом изучить общую антирадикальную активность спермы у мужчин с бесплодием на фоне хронического простатита. Всего, включая группу сравнения, обследовано 75 мужчин. Группа сравнения – 45 мужчин с хроническим простатитом вне обострения, группа наблюдения – 30 мужчин с хроническим простатитом в стадии ремиссии. Установлено, что у лиц в период острого воспалительного процесса патологическая фрагментация ДНК сперматозоидов диагностировалась статистически значимо ( $p = 0,004$ ) в 1,7 раза чаще, чем у обследуемых мужчин в период ремиссии хронического простатита. Повышение ФДНКС отмечено у 50% мужчин группы сравнения, а у обследуемых пациентов группы наблюдения степень фрагментации ДНК сперматозоидов выше референтного интервала имела место у 80% человек. У мужчин с диагнозом «хронический простатит», стадия обострения, существует статистически значимая ( $p < 0,05$ ) связь ФДНКС с развитием острого воспалительного процесса. Показано, что у лиц группы наблюдения среднее значение антирадикальной активности спермы не имело статистически значимых различий ( $p = 0,378$ ) по отношению к результатам, выявленным у мужчин группы сравнения. Представленные результаты свидетельствуют о высокой степени фрагментации ДНК сперматозоидов у обследуемых пациентов с хроническим простатитом в стадии декомпенсации, что может свидетельствовать о чрезмерном увеличении продукции свободных радикалов в период острого воспалительного процесса. Очевидно, обострение хронического простатита способствует дисбалансу в редокс-гомеостатической системе у мужчин, что создает предпосылки для переизбытка реактивных форм кислорода и значительной фрагментации ДНК сперматозоидов. Идентифицированные изменения, а именно повышение уровня ФДНКС и дефицит ОАРА спермы у мужчин с хроническими заболеваниями урогенетального тракта, играют патогенетическую роль в формировании и дальнейшем развитии бесплодия, а степень фрагментации ДНК сперматозоидов и маркеры окислительно-восстановительных процессов могут служить информативными показателями активности воспалительного процесса.

*Ключевые слова:* фрагментация ДНК сперматозоида, антирадикальная активность

### **Адрес для переписки:**

*Долгих Олег Владимирович  
ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»  
614045, Россия, г. Пермь, ул. Монастырская, 82.  
Тел.: 8 (342) 236-39-30.  
E-mail: oleg@fcrisk.ru*

### **Address for correspondence:**

*Dolgikh Oleg V.  
Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health  
Risk Management Technologies  
614045, Russian Federation, Perm, Monastyrskaya str., 82.  
Phone: 7 (342) 236-39-30.  
E-mail: oleg@fcrisk.ru*

### **Образец цитирования:**

*О.В. Долгих, Д.Г. Дианова, А.В. Кривцов  
«Фрагментация ДНК сперматозоидов и общая антирадикальная активность спермы у мужчин с отягощенным анамнезом» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 3. С. 387-390.  
doi: 10.46235/1028-7221-1033-SDF*

*© Долгих О.В. и соавт., 2021*

### **For citation:**

*O.V. Dolgikh, D.G. Dianova, A.V. Krivtsov "Sperm DNA fragmentation and total antiradical activity of sperm in men with exaggerated anamnesis", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 3, pp. 387-390.  
doi: 10.46235/1028-7221-1033-SDF*

**DOI:** 10.46235/1028-7221-1033-SDF

# SPERM DNA FRAGMENTATION AND TOTAL ANTIRADICAL ACTIVITY OF SPERM IN MEN WITH EXAGGERATED ANAMNESIS

Dolgikh O.V., Dianova D.G., Krivtsov A.V.

Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

**Abstract.** Various intracellular and extracellular stimuli can promote excessive accumulation of reactive oxygen species and lead to detrimental effects on sperm function, in particular, damage to sperm DNA, thus often resulting into infertility. The aim of the study was to assess the degree of sperm DNA fragmentation by flow cytometry and to study total antiradical activity of sperm in men with infertility and chronic prostatitis using spectrophotometric technique. A total of 75 men were examined. The comparison group consisted of 45 men with chronic prostatitis beyond exacerbation. The observation group included 30 men with chronic prostatitis in remission state. We have found that in the subjects during the period of acute inflammation, pathological fragmentation of sperm DNA was revealed, being statistically significant ( $p = 0.004$ ). It was registered 1.7 times more often than in the examined men during the remission of chronic prostatitis. Increased fragmentation of the sperm DNA was noted in 50% of men from comparison group. In the patients from observation group, the degree of sperm DNA fragmentation over reference ranges was observed in 80% of the subjects. In men diagnosed with chronic prostatitis at the exacerbation stage, there is a statistically significant ( $p < 0.05$ ) relationship between sperm DNA fragmentation and development of acute inflammatory process. It was shown that in the subjects from observation group, the mean value of antiradical sperm activity did not show statistically significant differences ( $p = 0.378$ ) compared with results found in men from the comparison group. The presented results suggest a higher degree of sperm DNA fragmentation in the examined patients with chronic prostatitis at the stage of decompensation, which may point to excessively increased production of free radicals during the acute inflammatory process. Obviously, exacerbation of chronic prostatitis contributes to imbalance in the redox homeostatic system in men, thus creating prerequisites for excess of reactive oxygen species and significant fragmentation of sperm DNA. The identified changes, i.e., an increased sperm DNA fragmentation levels and a deficiency of total antiradical activity of sperm in men with chronic urogenital diseases, may play a pathogenetic role in occurrence and further development of infertility. The degree of sperm DNA fragmentation and markers of redox processes may serve as informative activity indices of the inflammatory process.

*Keywords:* sperm DNA fragmentation, antiradical activity

## Введение

Бесплодие – это проблема, затрагивающая около 15% населения планеты. Согласно официальной мировой статистике, в 25-30% случаев мужской фактор является причиной бесплодия. В настоящее время факторами мужского бесплодия являются: неблагоприятная экологическая обстановка, генетический фонд, гормональный дисбаланс, инфекции различной этиологии, а также доказано значение окислительного стресса в нарушении сперматогенеза [2, 3, 4, 5]. Именно окислительный стресс играет ключевую роль при фрагментации ДНК сперматозоидов. **Цель исследования** – оценить степень фрагментации ДНК сперматозоидов и общую антирадикальную активность спермы у мужчин с бесплодием на фоне хронического простатита.

## Материалы и методы

Выполнено исследование эякулированного семени 75 мужчин. Группа сравнения – 45 мужчин с хроническим простатитом вне обострения, группа наблюдения – 30 мужчин с хроническим простатитом в стадии обострения. Всем пациентам определяли степень фрагментации ДНК сперматозоида (ФДНКС) методом проточной цитофлуориметрии на аппарате FACSCalibur фирмы Becton Dickinson (BD, США) с использованием моноклональных антител производства (BD, США). Уровень общей антирадикальной активности спермы (ОАРА) изучали с помощью СФ ПЭ-5300 (Россия). Для описания представленных количественных признаков результаты приведены в виде  $Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$ , где  $Me$  – медиана,  $Q_{0,25}$  – значение 25-го перцентиля,  $Q_{0,75}$  – значение 75-го перцентиля. Для оценки значимости

различий независимых групп использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Отношение шансов (OR) определяли как отношение вероятности того, что событие произойдет, к вероятности того, что событие не произойдет. Уровень значимости, на котором выполнена проверка нулевых гипотез принимался равным 0,05.

## Результаты и обсуждение

Патологическую ФДНКС диагностировали статистически значимо ( $p = 0,004$ ) в 1,7 раза чаще у лиц при обострении хронического простатита. Повышение ФДНКС имело место у 15 из 30 (50%) мужчин при заболевании предстательной железы в период ремиссии, при этом значение степени ФДНКС зарегистрировано в диапазоне значений от 1,52 до 20,46% (Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )): 15,15 (7,59-16,48)). В группе пациентов с хроническим простатитом в период острого воспаления значение степени ФДНКС составило от 7,29 до 40,25% (Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )): 18,64 (14,93-23,72)), при этом степень фрагментации ДНК сперматозоидов выше референтного интервала отмечено у 35 человек (78,8%). Установлена связь ФДНКС с развитием острого воспалительного процесса у пациентов с хроническим простатитом в стадии декомпенса-

ции (OR = 3,51; 95% ДИ 1,28-9,54). У пациентов группы наблюдения среднее групповое значение ОАРА (Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )): 790,00 (533,00-1290,00) мкМ/л не имело статистически значимых различий ( $p = 0,378$ ) относительно результатов, полученных у лиц группы сравнения (Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )): 687,00 (457,00-1050,00) мкМ/л).

## Заключение

В физиологических условиях активные формы кислорода индуцируют многие клеточные физиологические процессы (пролиферацию, дифференцировку, апоптоз и т.д.) [1, 6]. В период острого воспалительного процесса отмечается гиперпродукция свободно радикальных соединений, и антиоксидантная система не способна в полной мере проявлять свою защитную функцию. Таким образом, обострение хронического простатита способствует дисбалансу в редокс-гомеостатической системе у мужчин с бесплодием, что создает предпосылки для переизбытка реактивных форм кислорода и значительной фрагментации ДНК сперматозоидов. Поэтому степень ФДНКС и уровень ОАРА следует отнести к критериальным в прогнозировании вероятности развития бесплодия в андрологической практике.

## Список литературы / References

1. Магамедов И.Д., Пивоварова Л.П., Арискина О.Б., Нохрин С.П., Сорока В.В. Маркеры воспаления и оксидативного стресса при лечении острой ишемии нижних конечностей // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 22, № 2-2. С. 1054-1056. [Magamedov I.D., Pivovarova L.P., Ariskina O.B., Nokhrin S.P., Soroka V.V. Markers of inflammation and oxidative stress in the treatment of acute ischemia of the lower limbs. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 22, no. 2-2, pp. 1054-1056. (In Russ.)]
2. Chelombitko M.A. Role of reactive oxygen species in inflammation: A minireview. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, 2018, Vol. 73, pp. 199-202.
3. Chen S.J., Allam J.P., Duan Y.G. Influence of reactive oxygen species on human sperm functions and fertilizing capacity including therapeutical approaches. *Arch. Gynecol. Obstet.*, 2013, Vol. 288, pp. 191-199.
4. Dcunha R., Hussein R.S., Ananda H., Kumari S., Adiga S.K., Kannan N., Zhao Y., Kalthur G. Current insights and latest updates in sperm motility and associated applications in assisted reproduction. *Reprod. Sci.*, 2020, pp. 1-19. doi: 10.1007/s43032-020-00408-y.
5. Gharagozloo P., Aitken R., The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum. Reprod.*, 2011, Vol. 26, no. 7, pp. 1628-1640.
6. Lavranos G., Balla M., Tzortzopoulou A., Syriou V., Angelopoulou R. Investigating ROS sources in male infertility: a common end for numerous pathways. *Reprod. Toxicol.*, 2012, Vol. 34, no. 3, pp. 298-307.

### Авторы:

**Долгих О.В.** — д.м.н., заведующий отделом иммунобиологических методов диагностики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Пермь, Россия

### Authors:

**Dolgikh O.V.**, PhD, MD (Medicine), Head, Department of Immunobiological Methods of Diagnostics, Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

**Дианова Д.Г.** — д.м.н., старший научный сотрудник отдела иммунобиологических методов диагностики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Пермь, Россия

**Кривцов А.В.** — к.м.н., заведующий лабораторией иммуногенетики отдела иммунобиологических методов диагностики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Пермь, Россия

**Dianova D.G.**, PhD, MD (Medicine), Senior Research Associate, Department of Immunobiological Methods of Diagnostics, Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

**Krivtsov A.V.**, PhD (Medicine), Head, Laboratory of Immunogenetics, Department of Immunobiological Methods of Diagnostics, Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

---

Поступила 23.06.2021  
Принята к печати 20.07.2021

Received 23.06.2021  
Accepted 20.07.2021

## ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ СЕМЕННОЙ ПЛАЗМЫ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОГРАММ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Арефьева А.С., Бабаян А.А., Калинина Е.А., Николаева М.А.

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

**Резюме.** Многочисленные данные об иммуномодулирующем потенциале семенной плазмы (СП), полученные на животных, явились теоретическим обоснованием использования СП для повышения эффективности имплантации эмбриона у человека и стимулировали попытки введения СП в репродуктивный тракт женщины для повышения эффективности программы ЭКО. Однако, несмотря на многочисленные исследования, подтвердить положительное влияние СП на имплантацию у человека не удалось. Мы предполагаем, что благоприятное влияние семенной плазмы на наступление беременности у женщин, имевших контакт с СП своих половых партнеров во время цикла экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) / интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов (ИКСИ), может быть реализовано при сбалансированном содержании про- и противовоспалительных цитокинов в СП. Однако устоявшаяся парадигма благоприятного влияния СП на имплантацию эмбриона, сформированная на основании экспериментов на животных, не учитывает возможность патологических изменений СП у человека под влиянием неблагоприятных факторов окружающей среды, неправильного образа жизни, психоэмоционального стресса у мужчин репродуктивного возраста, вступающих в программу ЭКО. Нельзя исключить, что неблагоприятные внешние воздействия могут приводить к дисбалансу цитокинов в СП и отрицательно сказываться на успехе программ ЭКО/ИКСИ.

Цель – определить, существует ли корреляция между содержанием цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-18, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$  и TGF- $\beta$ 1 в СП и наступлением беременности у пациенток, контактировавших с семенной плазмой во время цикла ЭКО/ИКСИ.

Двадцать восемь пациенток с трубно-перитонеальным фактором бесплодия, вступающие в протоколы ЭКО/ИКСИ, контактировали с СП при половых контактах в период, предшествующий дню забора яйцеклеток в протоколах ЭКО/ИКСИ, а также при интравагинальном введении СП сразу после трансвагинальной пункции. Количественное измерение цитокинов в СП, полученной в день забора яйцеклеток и используемой для дополнительного интравагинального введения в этот день, проводили с помощью технологии FlowCytomix™.

Концентрации IL-1, IL-18 и TNF $\beta$  были значительно выше в СП половых партнеров небеременных пациенток ( $p = 0,011$ ;  $p = 0,030$  и  $p = 0,008$  соответственно). Общее содержание IL-2, IL-6, IL-18 и TNF $\beta$  в эякуляте также было достоверно выше у половых партнеров небеременных пациенток ( $p = 0,020$ ;  $p = 0,042$ ;  $p = 0,030$  и  $p = 0,004$  соответственно).

### Адрес для переписки:

Арефьева Алла Сергеевна  
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ  
117997, Россия, Москва, ул. Акад. Опарина, 4.  
Тел.: 8 (495) 438-11-83.  
E-mail: a\_arefeva@oparina4.ru

### Address for correspondence:

Arefieva Alla S.  
V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology  
117997, Russian Federation, Moscow, Acad. Oparin str., 4.  
Phone: 7 (495) 438-11-83.  
E-mail: a\_arefeva@oparina4.ru

### Образец цитирования:

А.С. Арефьева, А.А. Бабаян, Е.А. Калинина, М.А. Николаева «Цитокиновый профиль семенной плазмы и эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 3. С. 391-398.  
doi: 10.46235/1028-7221-1031-СРО  
© Арефьева А.С. и соавт., 2021

### For citation:

A.S. Arefieva, A.A. Babayan, E.A. Kalinina, M.A. Nikolaeva "Cytokine profile of seminal plasma and effectiveness of assisted reproductive technology programs", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 3, pp. 391-398.  
doi: 10.46235/1028-7221-1031-СРО  
DOI: 10.46235/1028-7221-1031-СРО

Повышенные концентрации провоспалительных цитокинов в СП, а также их чрезмерное общее содержание в эякуляте, могут отрицательно сказаться на имплантации эмбриона и наступлении беременности. Полученные нами данные о повышении содержания провоспалительных цитокинов в СП пациентов в группе с отсутствием беременности могут свидетельствовать о возможных стресс-зависимых изменениях состава СП у значительной части пациентов.

*Ключевые слова:* семенная плазма, беременность, эффективность ВРТ, цитокины, интерлейкины

## CYTOKINE PROFILE OF SEMINAL PLASMA AND EFFECTIVENESS OF ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY PROGRAMS

Arefieva A.S., Babayan A.A., Kalinina E.A., Nikolaeva M.A.

*V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation*

**Abstract.** Increasing evidence shows that seminal plasma is among the most important immunoregulatory factors in female reproductive function. We suggest that the favorable effect of the partner's seminal plasma (SP) upon pregnancy occurrence in women during the cycle of in vitro fertilization (IVF)/intracytoplasmic sperm injection (ICSI) may be provided by the balanced content of Th1/Th2-dependent seminal cytokines. Otherwise, in case of pathologic changes in SP composition, it may negatively affect the IVF efficiency. Our aim was to determine whether the levels of seminal IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-18, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$  and TGF- $\beta$ 1 are associated with pregnancy establishment in female patients exposed to seminal plasma during IVF/ICSI cycle.

Twenty-eight female patients were exposed to seminal plasma via sexual intercourse before the day of oocyte retrieval, and also underwent intravaginal application of seminal plasma just after transvaginal puncture and oocyte retrieval. Quantitative measurement of seminal cytokines was performed by FlowCytomix™ technology. IL-1, IL-18 and TNF $\beta$  concentrations were significantly higher in non-pregnant group ( $p = 0.011$ ;  $p = 0.030$  and  $p = 0.008$ , respectively). The contents of IL-2, IL-6, IL-18 and TNF $\beta$  per ejaculate were also significantly higher in non-pregnant group ( $p = 0.020$ ;  $p = 0.042$ ;  $p = 0.030$  and  $p = 0.004$ , respectively).

We conclude that elevated concentrations of proinflammatory cytokines in seminal plasma, as well as their total excessive content per ejaculate may have an adverse effect on implantation and pregnancy establishment.

*Keywords:* seminal plasma, pregnancy, IVF/ICSI outcome, cytokines, interleukins

### Введение

Одним из наиболее эффективных подходов к лечению бесплодия считается экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО). Однако, несмотря на то, что в данном методе вспомогательных репродуктивных технологий отбираются эмбрионы самого высокого качества, эффективность ЭКО все еще остается недостаточной. Как правило, причиной неудачных исходов ЭКО являются потери на этапе имплантации эмбриона [3].

Стандартный протокол проведения процедуры исключает контакт с продуктом секреции мужских половых желез – семенной плазмой (СП) – в цикле ЭКО; в то же время исследования, проведенные на экспериментальных животных, с

очевидностью доказали ключевую роль СП в иммунной регуляции имплантации [11].

Неоднократно была продемонстрирована способность СП вызывать локальную воспалительную реакцию при попадании в женский репродуктивный тракт. Тот факт, что воспалительный статус эндометрия является необходимым фактором для успешной имплантации эмбриона, был подтвержден в исследованиях на животных и с участием человека. В СП содержится большое количество цитокинов и факторов роста [10], способных запускать процесс хемотаксиса лейкоцитов в матку [1]. Содержащийся в СП цитокин TGF- $\beta$ 1 зачастую рассматривается как ключевой фактор, индуцирующий и контролирующий развитие посткоитального воспалитель-

ного процесса. Так, TGF- $\beta$  вызывает продукцию гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, активируя каскад миграции миелоидных клеток [14], а также регуляторных Т-клеток.

Таким образом, данные об иммуномодулирующем потенциале СП, полученные на животных, теоретически обосновывали возможность дополнительного введения СП в женский репродуктивный тракт для повышения эффективности имплантации у человека в программах ВРТ. Несмотря на это, не удалось подтвердить благоприятный эффект воздействия СП на имплантацию у человека не удалось. Мы предполагаем, что устоявшаяся парадигма благоприятного влияния СП на имплантацию эмбриона, сформированная на основании экспериментов на животных, не учитывает возможность патологических изменений СП у человека под влиянием неблагоприятных факторов окружающей среды, неправильного образа жизни, психоэмоционального стресса у мужчин репродуктивного возраста, вступающих в программу ЭКО. В современной литературе отсутствуют какие-либо данные о влиянии неблагоприятных внешних воздействий на содержание цитокинов в СП человека.

Нельзя исключить, что введение в репродуктивный тракт женщины избыточного или недостаточного количества факторов СП может нарушить процессы имплантации эмбриона и препятствовать наступлению беременности. Поэтому **целью представленного исследования** явилось выявление зависимости между наступлением беременности у женщин в программах ВРТ и содержанием цитокинов в СП их половых партнеров.

## Материалы и методы

Проведено исследование 28 образцов спермы/СП условно здоровых взрослых мужчин в возрасте до 41 года, являющихся половыми партнерами женщин с трубно-перитонеальным фактором бесплодия, вступающих в протоколы ЭКО/ИКСИ. Все пациенты соответствовали установленным критериям включения/невключения/исключения и имели регулярные половые контакты без контрацепции, которые прекращали за 3-5 дней до забора яйцеклеток. Пациентам проведены стандартные мероприятия в рамках протоколов ЭКО/ИКСИ. В день забора яйцеклеток было произведено интравагинальное введение СП, имитирующее воздействие СП на репродуктивные пути женщины в результате естественно-го полового акта.

Ретроспективно были сформированы 2 группы пациентов: супружеские пары с клинической

беременностью ( $n = 13$ ) и супружеские пары с отсутствием беременности после применения техники ЭКО/ИКСИ ( $n = 15$ ).

В день забора яйцеклеток эякулят собирали в специальный стерильный контейнер путем мастурбации. Производили оценку параметров спермограммы образцов полученной спермы. В качестве нормативных показателей использовали данные ВОЗ 2010 года (WHO 2010).

После этого сперму использовали для оплодотворения яйцеклеток и для получения СП с помощью центрифугирования. Часть полученной СП (0,5 мл) вводили интравагинально, а остальной объем СП аликвотировали и хранили при  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  до момента исследования цитокинового профиля.

Содержание исследуемых цитокинов в СП выявляли при помощи систем Bender MedSystems FlowCytomix™ Human TGF-beta1 and IL-18 Simplex Kits (Австрия) и eBioscience Human Th1/Th2 11plex FlowCytomix™ Multiplex Ready-to-Use (RTU) Kit (США). Для выявления GF- $\beta$ 1 и остальных цитокинов производили предварительное разведение образцов СП с использованием стандартных буферов, входящих в состав наборов, в соотношении 1:120 и 1:4 соответственно. Для количественной оценки содержания цитокинов использовали проточный цитометр BD Biosciences FACS Calibur (США) и прилагаемое программное обеспечение BD CellQuest™ Pro software version 5.2.1.

Статистический анализ результатов выполняли с помощью программы MedCalc 12.3.0. Достоверность отличий между показателями двух выборок пациентов оценивали при помощи непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Результаты представляли в виде медианы с минимальными и максимальными значениями переменных. Статистически значимыми различия считали при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Содержание цитокинов выявляли в СП половых партнеров 28 женщин. Ретроспективно были сформированы 2 группы пациентов: супружеские пары с клинической беременностью ( $n = 13$ ) и супружеские пары с отсутствием беременности после применения техники ЭКО/ИКСИ ( $n = 15$ ).

Клинико-анамнестические показатели, а также параметры фолликулогенеза не отличались у пациентов из двух групп (данные не приводятся). Концентрация, подвижность и число морфологически нормальных форм сперматозоидов у половых партнеров женщин из двух групп существенно не отличались (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА СТАНДАРТНЫХ ПАРАМЕТРОВ СПЕРМЫ

TABLE 1. STANDARD SEMEN PARAMETERS ANALYSIS

Показатель Semen parameters	Группа с наступившей беременностью Pregnant group (n = 13)	Группа с отсутствием беременности Non-pregnant group (n = 15)	Значение p p value
Объем эякулята, мл Volume, ml	2,7 (1,2-4,2)	3,2 (1,4-6,0)	0,198
Концентрация сперматозоидов ( $\times 10^6$ /мл) Sperm concentration ( $\times 10^6$ /mL)	59 (6-218)	76 (17-142)	0,326
Сперматозоиды с прогрессивным движением (%) Progressive motility (%)	51 (41-78)	44 (17-90)	0,163
Морфология (нормальные формы, %) Sperm morphology (normal forms, %)	6 (3-9)	5 (2-9)	0,465
Концентрация лейкоцитов ( $\times 10^6$ /мл) Leukocyte ( $\times 10^6$ /mL)	0,1-2,4 (0,7)	0,1-2,3 (0,9)	0,458

Примечание. Данные представлены как медианы с минимальными и максимальными значениями переменных;  $p > 0,05$  по U-критерию Манна–Уитни.

Note. Data are presented as median (range);  $p > 0.05$  for between-group difference from Mann–Whitney U-tests.

ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ В СЕМЕННОЙ ПЛАЗМЕ МУЖЧИН, ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ДЛЯ ИНТРАВАГИНАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ В ДЕНЬ ЗАБОРА ООЦИТОВ

TABLE 2. CONCENTRATIONS OF CYTOKINES IN MALE PARTNERS' SEMINAL PLASMA SAMPLES USED FOR INTRAVAGINAL APPLICATIONS AT THE DAY OF OVUM PICK-UP

Цитокины Cytokines	Группа с наступившей беременностью Pregnant group (n = 13)	Группа с отсутствием беременности Non-pregnant group (n = 15)	Значение p p value
IL-1 $\beta$ , пг/мл IL-1 $\beta$ , pg/mL	178,0 (70,4-353,5)	275,1 (183,2-722,3)	0,011*
IL-2, пг/мл IL-2, pg/mL	329,7 (29,1-610,0)	335,7 (221,0-574,2)	0,240
IL-5, пг/мл IL-5, pg/mL	142,0 (47,8-307,8)	96,1 (35,4-834,5)	0,668
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	5,7 (0,0-35,9)	11,7 (0,0-82,9)	0,205
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	1645,6 (750,5-9826,8)	2830,1 (453,2-10458,6)	0,244
IL-12, пг/мл IL-12, pg/mL	21,6 (3,4-155,3)	37,0 (13,0-148,9)	0,182
IL-18, пг/мл IL-18, pg/mL	286,7 (181,4-555,6)	420,9 (188,7-602,3)	0,030*
IFN $\gamma$ , пг/мл IFN $\gamma$ , pg/mL	88,4 (35,3-522,8)	124,8 (59,5-428,9)	0,076
TNF $\alpha$ , пг/мл TNF $\alpha$ , pg/mL	77,5 (3,2-373,6)	105,4 (19,6-696,8)	0,218
TNF $\beta$ , пг/мл TNF $\beta$ , pg/mL	74,5 (10,0-135,9)	148,2 (40,7-272,0)	0,008*
TGF- $\beta$ , нг/мл TGF- $\beta$ , ng/mL	119,2 (74,1-167,0)	115,9 (70,4-211,6)	0,927

Примечание. Данные представлены как медианы с минимальными и максимальными значениями переменных; \* $p < 0,05$  по U-критерию Манна–Уитни.

Note. Data are presented as median (range); \* $p < 0.05$  for between-group difference from Mann–Whitney U-tests.

**ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В СЕМЕННОЙ ПЛАЗМЕ МУЖЧИН, ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ДЛЯ ИНТРАВАГИНАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ В ДЕНЬ ЗАБОРА ООЦИТОВ**

TABLE 3. TOTAL CONTENTS OF CYTOKINES IN MALE PARTNERS' SEMINAL PLASMA SAMPLES USED FOR INTRAVAGINAL APPLICATIONS AT THE DAY OF OVUM PICK-UP

Цитокины Cytokines	Группа с наступившей беременностью Pregnant group (n = 13)	Группа с отсутствием беременности Non-pregnant group (n = 15)	Значение p p value
IL-1β, пг IL-1β, pg	546,6 (150,2-2817,4)	1019,1 (281,8-2528,1)	0,054
IL-2, пг IL-2, pg	599,0 (45,3-1408,7)	1127,0 (307,6-1862,5)	0,020*
IL-5, пг IL-5, pg	18869,5 (5377,9-40668,6)	21183,4 (8745,9-137365,4)	0,886
IL-6, пг IL-6, pg	22,5 (0,0-148,7)	42,4 (0,0-398,1)	0,042*
IL-8, пг IL-8, pg	3831,0 (1130,3-24566,9)	9689,6 (679,8-70000,0)	0,0761
IL-12, пг IL-12, pg	62,5 (9,2-590,0)	100,9 (44,6-521,1)	0,102
IL-18, пг IL-18, pg	777,2 (325,2-1879,3)	1489,7 (572,1-2595,6)	0,030*
IFNγ, пг IFNγ, pg	316,0 (61,6-1986,5)	449,2 (104,2-1501,1)	0,076
TNFα, пг TNFα, pg	190,3 (9,0-1347,2)	252,1 (100,2-2438,7)	0,420
TNFβ, пг TNFβ, pg	169,5 (26,9-429,3)	454,4 (167,8-952,1)	0,004*
TGF-β, пг TGF-β, ng	286,6 (181,5-634,4)	379,2 (161,2-705,2)	0,222

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

Данные о концентрациях цитокинов в СП мужчин представлены в таблице 2. Было установлено повышение уровня цитокинов IL-1β, IL-18 и TNFβ в СП в группе с отсутствием беременности по сравнению с основной группой ( $p = 0,011$ ;  $p = 0,030$  и  $p = 0,008$  соответственно).

Кроме того, мы оценили содержание цитокинов во всем объеме эякулята половых партнеров, полученного в день забора яйцеклеток (табл. 3).

Общее содержание цитокинов IL-2, IL-6, IL-18 и TNFβ в эякуляте половых партнеров небеременных пациенток оказалось также существенно выше по сравнению с их содержанием в эякуляте половых партнеров беременных женщин ( $p = 0,020$ ;  $p = 0,042$ ;  $p = 0,030$  и  $p = 0,004$  соответственно). Кроме того, была замечена существенная тенденция к увеличению общего содержания IL-1β в эякуляте половых партнеров небеременных женщин ( $p = 0,054$ ).

Не было выявлено существенных отличий в значениях концентраций и содержания IL-5, IL-8, IL-12p70, IFNγ, TNFα, TNFβ и TGF-β1 в общем объеме эякулята половых партнеров пациенток (табл. 2, 3). Концентрации цитокинов IL-4 и IL-10 в СП достоверно не определялись.

Итак, нам удалось обнаружить повышенные значения концентраций таких цитокинов, как IL-1β, IL-18 и TNFβ в СП половых партнеров женщин, не достигших беременности в протоколах ЭКО/ИКСИ. Кроме того, общее содержание цитокинов IL-2, IL-6, IL-18 и TNFβ в эякуляте половых партнеров небеременных пациенток оказалось также существенно выше по сравнению с их содержанием в эякуляте половых партнеров беременных женщин. Такие результаты позволяют сделать предположение о том, что регулярные половые контакты, имеющие место в пролиферативной фазе цикла ЭКО/ИКСИ, наравне с дополнительным введением СП в день

забора яйцеклеток, способны оказывать влияние на наступление беременности в протоколах ВРТ.

Известно, что провоспалительные цитокины IL-1 $\beta$  и IL-18 являются ключевыми маркерами иммунного ответа в условиях острого стресса, продукция которых резко возрастает при стимуляции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и симпатической нервной системы [13].

Психологический стресс является важным фактором, влияющим на репродуктивную функцию мужчин и женщин. Кроме того, длительное бесплодие, а также необходимость многочисленных обследований в условиях клиники, включающих инвазивные вмешательства, являются причиной психоэмоционального напряжения, испытываемого обоими партнерами, вступающими в программы ЭКО/ИКСИ. Повышение уровня стресс-зависимых компонентов СП, в том числе цитокинов, наравне с облегченной системой доставки составляющих СП в матку, может формировать особое микроокружение, негативно влияющее на имплантацию эмбриона у человека. Поэтому нам кажется обоснованным предположение о том, что контакт с СП пациентов с высоким уровнем стресса может, увеличивать вероятность неудач имплантации, влияя на состояние женского репродуктивного тракта.

Благодаря строгим критериям отбора пациентов для участия в исследовании можно достоверно исключить возможность повышения IL-1 $\beta$  и IL-18 в СП в результате урогенитальных инфекций и/или патозооспермии. Поэтому полученные нами данные о повышении содержания IL-1 $\beta$  и IL-18 в СП пациентов в группе с отсутствием беременности могут свидетельствовать о возможных стресс-зависимых изменениях состава СП у значительной части пациентов.

Поддержание оптимального цитокинового баланса в полости матки является crucialным для обеспечения рецептивности эндометрия и наступления беременности.

Так, точный контроль за содержанием цитокина IL-18 в фето-материнском пространстве необходим для обеспечения благоприятных для имплантации эмбриона условий [6]. Кроме того, IL-18 способен индуцировать выработку таких провоспалительных цитокинов, как IL-1, IL-2 и IL-6, повышенное содержание которых в СП также было выявлено в представленном исследовании.

Цитокин IL-1 $\beta$  способен ингибировать продукцию фактора NOXA10 в децидуальных клетках, также негативно влияя на рецептивность эндометрия и имплантацию эмбриона [12].

Избыточная экспрессия IL-2 в эндометрии вызывает повышение антитрофобластной киллерной активности в децидуальных лейкоцитах [4] провоцируя цитотоксический эффект активированных децидуальных NK-клеток. Кроме того, сверхэкспрессия IL-2 может привести к снижению ангиогенеза в эндометрии или к формированию неблагоприятной среды в матке, что негативно сказывается на процессе имплантации эмбриона [7].

Несмотря на благоприятное воздействие IL-6 на растущий трофобласт, избыточное содержание данного цитокина в период, предшествующий оплодотворению, может негативно влиять на фолликулярную среду и качество эмбриона [9].

Мало известно об изменениях в содержании TNF $\beta$  в женском репродуктивном тракте при беременности. Однако имеющиеся на данный момент данные демонстрируют, что TNF $\beta$  присутствует во внутриутробной среде в низких количествах [5]. Предполагается, что экспрессия данного цитокина специфически ингибируется на границе между матерью и плодом с целью поддержания иммунологической толерантности, необходимой для нормального развития эмбриона.

Таким образом, многочисленные данные свидетельствуют о важной роли цитокинов в регуляции имплантации, однако до сих пор зависимость содержания цитокинов в полости матки от их концентрации в СП половых партнеров не обсуждалась.

Являясь фактором, индуцирующим выработку IFN $\gamma$ , IL-18 играет главную роль в стимуляции выработки данного цитокина Т-клетками и естественными киллерами [2]. В свою очередь, IFN $\gamma$  ингибирует TGF- $\beta$  сигналинг, блокируя проведение экзогенного сигнала от TGF- $\beta$  в ядро [8]. При этом TGF- $\beta$ 1 считается ключевым иммуномодуляторным фактором СП, обеспечивая развитие регулируемого асептического посткоитального воспаления, необходимого для имплантации эмбриона, а также стимулируя супрессорную активность регуляторных Т-клеток, способствуя развитию иммунологической толерантности к плоду. Мы не обнаружили существенной разницы в содержании TGF- $\beta$ 1 в СП в группах пациентов с различными исходами программ ЭКО/ИКСИ, однако обнаруженные негативные корреляции между содержанием провоспалительных цитокинов в СП и наступлением беременности могут быть объяснены их ингибирующим действием на функционирование TGF- $\beta$ .

Очевидно, что общепринятые представления о благоприятном воздействии СП на имплантацию эмбриона, сформированные на основе экспериментов, проводимых на содержащихся в

стандартных условиях животных, не учитывают возможное влияние таких внешних факторов, как несбалансированное питание, курение, алкоголь и стрессовые жизненные ситуации на состав СП человека. Вызывает удивление, что ни в одном из многочисленных зарубежных исследований, посвященных влиянию СП на имплантацию эмбриона, не изучалась зависимость наступления беременности от состава семенной плазмы.

## Заключение

Выявленные нами закономерности могут быть использованы для дополнения клинических протоколов обследования пациентов, вступающих в программы ВРТ. Такое персонафицированное использование СП в программах ЭКО/ИКСИ может привести к существенному повышению эффективности лечения бесплодия.

## Список литературы / References

1. Chen J.C., Johnson B.A., Erikson D.W., Piltonen T.T., Barragan F., Chu S., Kohgadai N., Irwin J.C., Greene W.C., Giudice L.C., Roan N.R. Seminal plasma induces global transcriptomic changes associated with cell migration, proliferation and viability in endometrial epithelial cells and stromal fibroblasts. *Hum. Reprod.*, 2014, Vol. 29, no. 6, pp. 1255-1270.
2. Dinarello C.A., Novick D., Kim S., Kaplanski G. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 4, 289. doi: 10.3389/fimmu.2013.00289.
3. Edwards R.G. Human implantation: the last barrier in assisted reproduction technologies? *Reprod. Biomed. Online*, 2006, Vol. 13, no. 6, pp. 887-904.
4. King A., Wheeler R., Carter N.P., Francis D.P., Loke Y.W. The response of human decidual leukocytes to IL-2. *Cell. Immunol.*, 1992, Vol. 141, pp. 409-421.
5. Laham N., Dunné F.V., Abraham L.J., Farrugia W., Bendtzen K., Brennecke S.P., Rice G.E. Tumor necrosis factor-beta in human pregnancy and labor. *J. Reprod. Immunol.*, 1997, Vol. 33, no. 1, pp. 53-69.
6. Laskarin G., Strbo N., Crncic T.B., Juretic K., Bataille N.L., Chaouat G., Rukavina D. Physiological role of IL-15 and IL-18 at the maternal-fetal interface. *Chem. Immunol. Allergy*, 2005, Vol. 89, pp. 10-25.
7. Makkar G., Ng E.H.Y., Yeung W.S.B., Ho P.C. Excessive ovarian response is associated with increased expression of interleukin-2 in the periimplantation endometrium. *Fertil. Steril.*, 2009, Vol. 91, no. 4, pp. 1145-1151.
8. Massagué J. How cells read TGF-beta signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2000, Vol. 1, pp. 169-178.
9. Pellicer A., Albert C., Garrido N., Navarro J., Remohi J., Simon C. The pathophysiology of endometriosis-associated infertility: follicular environment and embryo quality. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 2000, Vol. 55, pp. 109-119.
10. Politch J.A., Tucker L., Bowman F.P., Anderson D.J. Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. *Hum. Reprod.*, 2007, Vol. 22, pp. 2928-2935.
11. Robertson S.A. and Sharkey D.J. Seminal fluid and fertility in women. *Fertil. Steril.*, 2016, Vol. 106, no. 3, pp. 511-519.
12. Sarno J.L., Schatz F., Lockwood C.J., Huang S.T., Taylor H.S. Thrombin and interleukin-1beta regulate HOXA10 expression in human term decidual cells: implications for preterm labor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2006, Vol. 91, no. 6, pp. 2366-2372.
13. Sugama S. and Conti B. Interleukin-18 and stress. *Brain Res. Rev.*, 2008, Vol. 58, no. 1, pp. 85-95.
14. Tremellen K.P., Seamark R.F., Robertson S.A. Seminal transforming growth factor beta1 stimulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and inflammatory cell recruitment in the murine uterus. *Biol. Reprod.*, 1998, Vol. 58, pp. 1217-1225.

### Авторы:

**Арефьева А.С.** — научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Бабаян А.А.** — к.м.н., врач — акушер-гинеколог отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

### Authors:

**Arefieva A.S.**, Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

**Babayan A.A.**, PhD (Medicine), Obstetrician-gynecologist, Department of Assisted Technologies in Treatment of Infertility, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

**Калинина Е.А.** — д.м.н., врач — акушер-гинеколог, заведующая отделением вспомогательных технологий в лечении бесплодия ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Николаева М.А.** — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Kalinina E.A.**, PhD, MD (Medicine), Obstetrician-gynecologist, Head, Department of Assisted Technologies in Treatment of Infertility, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

**Nikolaeva M.A.**, PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

---

Поступила 22.06.2021  
Принята к печати 20.07.2021

---

Received 22.06.2021  
Accepted 20.07.2021

## **ФАКТОР, *IN VITRO* ПОДАВЛЯЮЩИЙ МИГРАЦИЮ МАКРОФАГОВ, В КРОВИ ЖЕНЩИН С ПРИВЫЧНЫМ ВЫКИДЫШЕМ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ, РАЗВИВАЮЩЕЙСЯ ПОСЛЕ ИММУНОЦИТОТЕРАПИИ**

**Вторушина В.В., Кречетова Л.В., Инвиева Е.В., Тетруашвили Н.К.**

*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия*

**Резюме.** Цель — оценить содержание MIF в сыворотке периферической крови, а также продукцию MIF митоген-стимулированными клетками цельной периферической крови в течение беременности у женщин с идиопатическим привычным выкидышем, получающих в качестве лечения иммуноцитотерапию как в прегравидарной подготовке, так и в I триместре беременности.

В исследовании приняла участие 51 женщина от 20 до 40 лет: 10 фертильных здоровых вне беременности, 23 женщины с идиопатическим привычным выкидышем (ИПВ), 18 женщин с физиологическим течением беременности на разных сроках гестации (12 — в I триместре, 12 — во II, 9 — в III). Содержание MIF оценивали методом мультиплексного анализа на проточном флуориметре.

Из 23 женщин с ИПВ у 6 беременность потеряна в I триместре, у 14 женщин беременность пролонгирована до доношенного срока и завершилась рождением здорового ребенка, у трех произошли преждевременные роды в сроке от 24 до 35 недель живым плодом.

Межгрупповых различий в сывороточном уровне MIF у женщин контрольных и пациенток с ИПВ нет как вне беременности, так и во время беременности. Однако динамика показателя во время беременности, отражающая его рост во II и III триместрах в обеих группах женщин (контрольная и с ИПВ) одинаковая. Также во время беременности совпадает динамика продукции MIF митоген-активированными клетками цельной периферической крови, кроме значений во II триместре: в этом сроке продукция MIF женщин с ИПВ значительно ниже, хотя все равно увеличена по сравнению с I триместром в 3 раза (в контроле — в 5 раз). Значения MIF в сроке 5-6 недель в сыворотке женщин с физиологическим течением беременности ниже, чем у женщин в обеих подгруппах ИПВ, но различия в содержании MIF у женщин с выкидышем и с доношенной беременностью — нет. Также не выявлено различий в содержании MIF в супернатантах активированных клеток цельной крови женщин по срокам обследования в группах и между группами в одинаковые сроки обследования.

Показано положительное влияние ИЦТ на течение и исходы беременности у женщин с беременностью, пролонгированной до доношенного срока. Содержание MIF в сыворотке у женщин с доношенной беременностью выше, чем у женщин с выкидышем, что согласуется с выводами других

### **Адрес для переписки:**

*Инвиева Евгения Владимировна*  
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ  
117198, Россия, Москва, ул. Акад. Опарина, 4.  
Тел.: 8 (495) 438-11-83.  
E-mail: e\_inviyaeva@oparina4.ru

### **Address for correspondence:**

*Inviyaeva Eugenia V.*  
V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology  
117198, Russian Federation, Moscow, Acad. Oparin str., 4.  
Phone: 7 (495) 438-11-83.  
E-mail: e\_inviyaeva@oparina4.ru

### **Образец цитирования:**

*В.В. Вторушина, Л.В. Кречетова, Е.В. Инвиева, Н.К. Тетруашвили «Фактор, in vitro подавляющий миграцию макрофагов, в крови женщин с привычным выкидышем при беременности, развивающейся после иммуноцитотерапии» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 3. С. 399-408.*  
doi: 10.46235/1028-7221-1040-MIF

© Вторушина В.В. и соавт., 2021

### **For citation:**

*V.V. Vtorushina, L.V. Krechetova, E.V. Inviyaeva, N.K. Tetrushvili "Macrophage inhibiting factor in women with habitual miscarriage in pregnancy following immunocytotherapy", Russian Journal of Immunology/ Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 3, pp. 399-408.*  
doi: 10.46235/1028-7221-1040-MIF

DOI: 10.46235/1028-7221-1040-MIF

авторов о неблагоприятном влиянии низких уровней MIF в сыворотке в ранние сроки беременности на ее развитие.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что не у всех женщин с ИПВ иммуноцитотерапия способствует пролонгированию беременности до доношенного срока. Поэтому необходимо проведение дальнейших исследований по поиску критериев назначения ИЦТ в лечении идиопатического привычного выкидыша.

*Ключевые слова:* привычный выкидыш, иммуноцитотерапия, MIF, беременность, иммунная система, иммунокоррекция

## MACROPHAGE INHIBITING FACTOR IN WOMEN WITH HABITUAL MISCARRIAGE IN PREGNANCY FOLLOWING IMMUNOCYTOTHERAPY

Vtorushina V.V., Krechetova L.V., Inviyaeva E.V., Tetrushvili N.K.

*V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation*

**Abstract.** The aim of our study was to evaluate the macrophage inhibitory factor (MIF) content of in peripheral blood serum, as well as MIF production by mitogen-stimulated cells from whole peripheral blood during pregnancy in women with idiopathic recurrent miscarriage who received immunocytotherapy both prior to and in the first trimester of pregnancy. The study involved 51 women 20 to 40 years old: 10 fertile healthy females beyond pregnancy, 23 women with idiopathic recurrent miscarriage (IRM), 18 women with a physiological course of pregnancy at different stages of gestation (12, in the first trimester; 12, in the second; 9, in third trimester). MIF content was assessed by multiplex analysis using flow fluorometry. Of 23 women with IRM, six lost their pregnancy in the first trimester, 14 women prolonged pregnancy to the full-term resulting into birth of a healthy child; three had premature births at 24 to 35 weeks with a live fetus. There were no intergroup differences in the serum MIF level in control women and in patients with IRM, both beyond and during pregnancy. However, the dynamics of this index during pregnancy, was similar with increase during the II and III trimesters in both groups of women (control and with IRM). During pregnancy, the dynamics of MIF production by mitogen-activated cells from peripheral blood was also similar, except for values in the II trimester: in this period, MIF production in women with IRM was significantly lower, although it was still increased 3 times compared to the 1st trimester (5-fold to controls). In women with physiological pregnancy, the serum MIF levels at 5 to 6 weeks were lower than in women in both IRM subgroups, but there was no difference in MIF content for women with miscarriage and full-term pregnancy. Similarly, there were no differences of MIF contents in the supernates of activated whole blood cells of women at the time of study within groups and between the groups at the same time of examination. It has been shown that ICT has a positive effect on the course and outcomes of pregnancy in women with pregnancy prolonged to full-term. The serum MIF content in women with full-term pregnancy is higher than in women with miscarriage, which is consistent with results of other authors about adverse developmental effects of low serum MIF levels at early pregnancy terms. The results obtained indicate that immunocytotherapy do not regularly promote pregnancy to full term in women with IPV. Therefore, further research is required to find out criteria for administering ICT in treatment of idiopathic recurrent miscarriage.

*Keywords:* habitual miscarriage, immunocytotherapy, MIF, pregnancy, immune system, immunocorrection

Работа была выполнена в рамках государственного задания 2021 16-A21.

### Введение

Факторы, тормозящие реакции, которые нацелены на отторжение плода во время беременности, формируются в процессе морфогенеза плаценты с учетом регуляции и формирования иммунной системы [4, 5]. Блокирующие свойства

сыворотки беременных осуществляются рядом белков как высокомолекулярных иммуноглобулиновой природы, так и низкомолекулярных, обладающих иммунными свойствами, которые участвуют в формировании толерантности материнского организма к антигенам плода отцовского происхождения и влияют на исходы беременности. Одним из низкомолекулярных белков, интерес к которым был обусловлен их способ-

ностью контролировать интенсивность иммунного воспалительного ответа, является фактор, подавляющий миграцию макрофагов (МИФ, или MIF – Macrophage Migration Inhibition Factor), белок, продуцируемый активированными Т-лимфоцитами. Эффект ингибирования миграции макрофагов установлен в экспериментах *in vitro* [5, 6]. Показано, что MIF освобождается из мононуклеаров в ответ на любые провоспалительные и митогенные стимулы и инициирует ряд основных внутриклеточных сигнальных событий, приводящих через активацию p44/p42 митоген-активированной протеин-киназы и освобожденную под действием цитоплазматической фосфолипазы А арахидоновую кислоту к пролиферативным и провоспалительным эффектам [6]. Физиологическая роль MIF определяется провоспалительными эффектами лимфоцитов и макрофагов, связанными с физиологией эндометрия, поскольку показана экспрессия MIF в эндометрии в течение всего менструального цикла и в ранней беременности [8, 9], обсуждается его роль в поддержании иммунной привилегированности на фето-материнском интерфейсе, например, предполагается, что один из механизмов поддержания беременности и развития эмбриона ХГЧ связан с иммуномодуляторными и ангиогенными свойствами MIF [14].

Показан пониженный уровень MIF в крови и эндометрии пациенток с привычным выкидышем (классификация по МКБ-10) [12]. В патогенезе идиопатического привычного выкидыша (ИПВ), или выкидыша неясной этиологии, участие иммунной системы признается ведущим, и для коррекции этого вида акушерской патологии используется иммунокорректирующая терапия, одним из часто обсуждаемых видов которой является иммуноцитотерапия (ИЦТ), или аллоиммунизация пациенток лимфоцитами супруга. Долгое время считалось, что положительный эффект аллоиммунизации связан с формированием блокирующих свойств сыворотки беременных, сдерживающих отторжение плода. MIF – один из сывороточных факторов, который также может быть одним из факторов, который участвует в развитии гестационной иммуносупрессии. Поэтому исследование MIF в периферической крови женщин с привычными потерями беременности, получающих иммуноцитотерапию в период подготовки к беременности (прегравидарной подготовке) и в I триместре беременности представляет интерес для оценки влияния данного фактора на исход беременности.

**Целью данной работы** было оценить содержание MIF в сыворотке периферической крови, а также продукцию MIF митоген-стимулированными клетками цельной периферической крови

в течение беременности у женщин с идиопатическим привычным выкидышем, получающих в качестве лечения иммуноцитотерапию как в прегравидарной подготовке, так и в I триместре беременности.

## Материалы и методы

В исследовании приняли участие 51 женщина от 20 до 40 лет, из них: 10 фертильных здоровых вне беременности, 23 женщины с привычным выкидышем неясного генеза в анамнезе, 18 женщин с физиологическим течением беременности на разных сроках гестации (12 женщин – в I триместре, 12 – во II, 9 – в III). Возраст женщин в исследуемых группах достоверно не отличался и составил  $30,17 \pm 3,30$  лет у женщин с привычным выкидышем,  $29,00 \pm 3,79$  – у женщин с физиологическим течением беременности и  $28,2 \pm 4,2$  – у фертильных женщин вне беременности ( $M \pm SD$ , ANOVA  $p > 0,05$ ). Исследование одобрено Комитетом по этике ФГБУ «НЦ АГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (протокол №13 от 6.12.2013 г.). Исследование проводилось Центре в 2014–2018 гг.

Критерии включения в группу исследования: не менее 2 выкидышей от одного и того же партнера, которые произошли в первом триместре, возраст женщины от 20 до 40 лет, нормальный кариотип партнера, нормозооспермия партнера, самопроизвольное наступление беременностей, отсутствие анатомических, генетически обусловленных, аутоиммунных, гормональных нарушений, тяжелых экстрагенитальных заболеваний, подписание формы информированного согласия на участие в исследовании.

Критерии включения в контрольную группу: наличие, как минимум, одних родов в анамнезе от данного партнера, возраст женщины от 20 до 40 лет, неотягощенный акушерский и гинекологический анамнез, отсутствие гормональных нарушений, которые сопровождаются изменениями менструального цикла, нормальный кариотип партнеров, нормозооспермия, физиологическое течение данной беременности, подписанная форма информированного согласия на проведение исследования. Для фертильных женщин дополнительно условием включения являлось наличие здорового ребенка в возрасте до 2 лет.

Процедуру ИЦТ осуществляли аллогенными клетками супругов в прегравидарной подготовке и в первом триместре наступившей беременности. До проведения настоящего исследования пациентки ИЦТ не получали. Методика проведения ИЦТ утверждена на заседании Ученого совета ФГБУ «НЦ АГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (протокол № 19 от 25 декабря 2012 г.).

Для проведения процедуры использовали лимфоциты, соответствующие критериям донорства. В процедурном кабинете осуществляли забор крови из локтевой вены в стерильную пробирку объемом 50 мл, в качестве антикоагулянта использовали 200 мкл раствора гепарина (исходный раствор 5000 МЕ/мл). Выделение лимфоцитарной взвеси проводили в кабинете с необходимым оборудованием и ламинарным шкафом. После тщательного перемешивания кровь инкубировали при 37 °С в течение 1-1,5 часов. При разделении крови на 2 слоя (верхний – плазма с мононуклеарными клетками, нижний – эритроциты), верхний слой переносили в центрифужную стерильную пробирку объемом 14 мл и центрифугировали в течение 7 минут при 1500 об/мин. После удаления супернатанта в пробирку вносили 6 мл стерильного физиологического раствора, наслаивали на 3 мл фикола в двух пробирках параллельно, сохраняя соотношение 1:2, и центрифугировали в течение 30 минут при 1500 об/мин. Лимфоцитарные кольца собирали в чистую стерильную пробирку, отмывали 2 раза 14 мл физиологического раствора в течение 7 минут при 1500 об/мин. После центрифугирования надосадов удаляли, осадок тщательно перемешивали в 2 мл стерильного физиологического раствора. Подсчет осуществляли в камере Горяева и в полученной взвеси определяли количество клеток. Концентрация лимфоцитов в физиологическом растворе составляла от 20 до 50 млн в 1 мл раствора.

В течение прегравидарной подготовки лимфоциты супруга вводили внутрикочно в 10-12 точек в ладонную поверхность предплечья дважды с интервалом в один месяц на 5-10 день менструального цикла, а во время наступившей беременности – в сроках 5-6 недель и 8-9 недель согласно протоколу ведения беременности у пациенток с ИПВ [4]. В течение недели производили визуальную оценку местной реакции организма на введение лимфоцитов партнеров.

Забор крови осуществляли натошак из локтевой вены. В прегравидарной подготовке кровь забирали до иммунизации и после каждого введения клеток на 18-22 день менструального цикла, а у беременных – в сроке 5-6 недель (до иммунизации), в 8-9 недель (до иммунизации) и в 12 недель гестации.

Женщины, включенные в исследование, обследовались вне беременности, а также в 5-6, 8-9, 12, 16-24 и 30-38 недель гестации.

Сыворотку периферической крови получали путем центрифугирования в течение 10 минут при 3000 g, второй раз в течение 3 минут при 10000 g, аликвотировали и хранили до анализа при -80 °С.

Для получения супернатантов после 24-часовой митогенной стимуляции клеток цельной крови использовали набор «Цитокин-стимул-бест» фирмы «Вектор-Бест» (Россия). В соответствии с рекомендацией производителя стимулирование 1 мл цельной крови осуществлялось в стерильном флаконе в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С в течение 24-х часов. Смесь митогенов для стимулирования 1 мл цельной крови содержала 4 мкг ФГА, 4 мкг Кон А, 2 мкг липополисахарида. По окончании инкубации препараты крови центрифугировали в течение 10 минут при 3000 g, отбирали супернатант, вновь центрифугировали в течение 3 минут при 10000 g, отобранную надосадочную жидкость аликвотировали и образцы хранили до анализа при -80 °С.

Содержание MIF оценивали методом мультиплексного анализа наборами фирмы Bio-Rad (США) на проточном флуориметре Bio-Plex-200 System (Bio-Rad, США). Результаты обрабатывали с помощью приложения Bio-Plex Manager 6,0 Properties (Bio-Rad, США). Содержание MIF представлено в пг/мл.

Из 23 женщин с ИПВ, включенных в исследование, у 14 женщин беременность пролонгирована до доношенного срока и завершилась рождением здорового ребенка, у 6 женщин беременность потеряна в I триместре, у трех произошли преждевременные роды в сроке от 24 до 35 недель, мертворождений у этих женщин не было.

Статистическую обработку результатов исследования проводили стандартными методами с помощью Microsoft Office Excel 2007 и пакета MedCalc12 для Windows 7. Для проверки нормальности распределения применяли критерий Шапиро–Уилка. Данные представлены как медиана и интерквартильный размах распределения (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>), для оценки значимости различий в двух группах применяли U-критерий Манна–Уитни, в трех и более группах – критерий Краскела–Уоллиса с поправкой Бонферрони.

## Результаты и обсуждение

В настоящем исследовании представлены результаты анализа содержания MIF в сыворотке и в супернатантах митоген-активированных клеток цельной периферической крови женщин с ИПВ, которые при подготовке к беременности в качестве монотерапии получали две процедуры аллоиммунизации лимфоцитарными клетками супруга и две процедуры в I триместре наступившей беременности в составе комплексной терапии ИПВ.

В таблице 1 представлены данные по содержанию MIF в сыворотке и в супернатантах клеток цельной периферической крови женщин с ИПВ с беременностью, пролонгированной до доношен-

**ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ MIF В СЫВОРОТКЕ И СУПЕРНАТАНТАХ МИТОГЕН-AКТИВИРОВАННЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЖЕНЩИН С ИПВ С БЕРЕМЕННОСТЬЮ, ПРОЛОНГИРОВАННОЙ ДО ДОНОШЕННОГО СРОКА, Ме (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 1. MIF CONTENT IN SERUM AND SUPERNATANTS OF MITOGEN-ACTIVATED PERIPHERAL BLOOD CELLS OF WOMEN WITH IRM WITH PREGNANCY PROLONGED TO TERM, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

Сроки обследования Examination terms		Содержание MIF (пг/мл) в группах MIF content (pg/ml) in groups	
		контрольной control	с ИПВ with IRM
		в сыворотке периферической крови in peripheral blood serum	
Вне беременности Out of pregnancy		150 (119-275) (n = 10)	238 (128-324) n = 23
Во время беременности During pregnancy	1-й триместр 1 <sup>st</sup> trimester	206 (100-260) (n = 12) <b>p<sub>ттр</sub>-p<sub>лттр</sub> &lt; 0,0085</b> p <sub>лттр</sub> -p <sub>лттр</sub> < 0,0085 <b>p<sub>ттр</sub>-p<sub>лттр</sub> &lt; 0,0085</b> p <sub>лттр</sub> -p <sub>лттр</sub> < 0,0085	250 (163-314) (n = 14) <b>p<sub>ттр</sub>-p<sub>лттр</sub> &lt; 0,0085</b> p <sub>лттр</sub> -p <sub>лттр</sub> < 0,0085 <b>p<sub>ттр</sub>-p<sub>лттр</sub> &lt; 0,0085</b> p <sub>лттр</sub> -p <sub>лттр</sub> < 0,0085
	2-й триместр 2 <sup>nd</sup> trimester	307 (211-583) (n = 12) <b>p<sub>вб</sub>-p<sub>лттр</sub> &lt; 0,0085</b> p <sub>оп</sub> -p <sub>лттр</sub> < 0,0085	476 (231-644) (n = 13) <b>p<sub>вб</sub>-p<sub>лттр</sub> &lt; 0,0085</b> p <sub>оп</sub> -p <sub>лттр</sub> < 0,0085
	3-й триместр 3 <sup>rd</sup> trimester	602 (367-798) (n = 9) <b>p<sub>вб</sub>-p<sub>лттр</sub> &lt; 0,0085</b> p <sub>оп</sub> -p <sub>лттр</sub> < 0,0085	554 (391-701) (n = 13) <b>p<sub>вб</sub>-p<sub>лттр</sub> &lt; 0,0085</b> p <sub>оп</sub> -p <sub>лттр</sub> < 0,0085
		в супернатантах митоген-активированных клеток периферической крови in supernatants of mitogen-activated peripheral blood cells	
Вне беременности Out of pregnancy		1600 (1208-2258) (n = 10)	2114 (1251-2376) (n = 23)
Во время беременности During pregnancy	1-й триместр 1 <sup>st</sup> trimester	302 (140-500) (n = 12) <b>p<sub>вб</sub>-p<sub>лттр</sub> &lt; 0,0085</b> p <sub>оп</sub> -p <sub>лттр</sub> < 0,0085	200 (145-682) (n = 14) <b>p<sub>вб</sub>-p<sub>лттр</sub> &lt; 0,0085</b> p <sub>оп</sub> -p <sub>лттр</sub> < 0,0085
	2-й триместр 2 <sup>nd</sup> trimester	1536 (681-2655) (n = 12) <b>p<sub>ттр</sub>-p<sub>лттр</sub> &lt; 0,0085</b> p <sub>лттр</sub> -p <sub>лттр</sub> < 0,0085	602 (222-1040) (n = 13) <b>p<sub>вб</sub>-p<sub>лттр</sub> &lt; 0,0085</b> p <sub>оп</sub> -p <sub>лттр</sub> < 0,0085 <b>p<sub>к2</sub>-p<sub>ипв2</sub> = 0,033</b> p <sub>с2</sub> -p <sub>IRM2</sub> = 0,033
	3-й триместр 3 <sup>rd</sup> trimester	1140 (1001-3022) (n = 9) <b>p<sub>ттр</sub>-p<sub>лттр</sub> &lt; 0,0085</b> p <sub>лттр</sub> -p <sub>лттр</sub> < 0,0085	969 (543-2425) (n = 13) <b>p<sub>ттр</sub>-p<sub>лттр</sub> &lt; 0,0085</b> p <sub>лттр</sub> -p <sub>лттр</sub> < 0,0085

Примечание. По срокам обследования различия в сывороточном уровне MIF и в содержании супернатантов митоген-стимулированных клеток периферической крови значимы в контрольной группе и в группе с ИПВ по критерию Краскела-Уоллиса; во II триместре различия в содержании супернатантов митоген-стимулированных клеток значимы в группе с физиологическим течением беременности и в группе с ИПВ по U-критерию Манна-Уитни; вб – вне беременности, тр – триместр.

Note. By the time of examination, the differences in the serum level of MIF and in the content of supernatants of mitogen-stimulated peripheral blood cells are significant in the control group and in the group with IRM according to the Kruskal-Wallis test; in the II trimester, differences in the content of supernatants of mitogen-stimulated cells are significant in the group with the physiological course of pregnancy and in the group with IRM according to the Mann-Whitney U-test; op, out of pregnancy, tr, trimester.

**ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ MIF В СЫВОРОТКЕ И СУПЕРНАТАНТАХ МИТОГЕН-AКТИВИРОВАННЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЖЕНЩИН С ИПВ В I ТРИМЕСТРЕ ГЕСТАЦИИ С РАЗНЫМИ ИСХОДАМИ БЕРЕМЕННОСТИ, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 2. MIF CONTENT IN SERUM AND SUPERNATANTS OF MITOGEN-ACTIVATED PERIPHERAL BLOOD CELLS OF WOMEN WITH IRM IN THE FIRST TRIMESTER OF GESTATION WITH DIFFERENT PREGNANCY OUTCOMES, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

Сроки обследования в I триместре Examination dates in the first trimester	Содержание MIF (пг/мл) в группах MIF content (pg/ml) in groups		
	контрольной control	с выкидышем with miscarriage	с доношенной беременностью with full-term pregnancy
	в сыворотке периферической крови in peripheral blood serum		
5-6 нед. 5-6 weeks	100 (52-156) (n = 6)	190 (168-293) (n = 6) p <sub>к-рв</sub> < 0,025 p <sub>с-рм</sub> < 0.025	305 (275-326) (n = 14) p <sub>к-рв</sub> < 0,025 p <sub>с-рв</sub> < 0.025
8-9 нед. 8-9 weeks	244 (136-378) (n = 8)	172 (113-363) (n = 5)	295 (248-303) (n = 10)
12 нед. 12 weeks	244 (220-289) (n = 12)		307 (126-336) (n = 13)
	в супернатантах митоген-активированных клеток периферической крови in supernatants of mitogen-activated peripheral blood cells		
5-6 нед. 5-6 weeks	140 (89-218) (n = 6)	448 (291-663) (n = 6)	189 (167-610) (n = 14)
8-9 нед. 8-9 weeks	335 (220-652) (n = 8)	487 (371-577) (n = 5)	136 (106-631) (n = 10)
12 нед. 12 weeks	402 (195-500) (n = 12)		466 (250-1257) (n = 13)

Примечание. Различия в сыворотке крови в сроке 5-6 недель между группами значимы по критерию Краскела-Уоллиса.

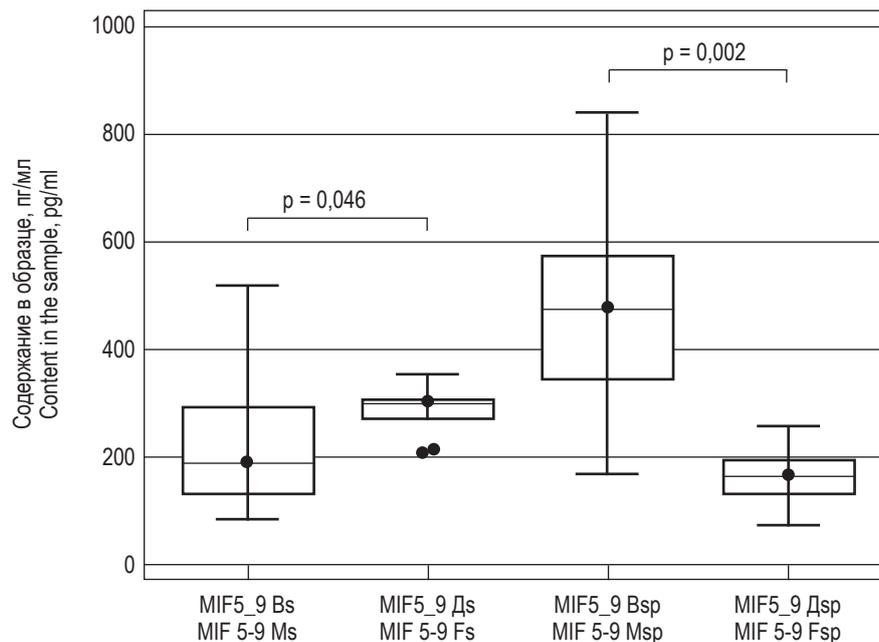
Note. Differences in blood serum at 5-6 weeks between groups are significant according to the Kruskal-Wallis test.

ного срока, и в контрольных группах женщин, как вне беременности, так и во время беременности.

Как следует из представленных в таблице 1 данных, межгрупповых различий в сывороточном уровне MIF вне беременности у женщин контрольных и пациенток с ИПВ нет, как не выявлено межгрупповых различий и во время беременности, но динамика показателя во время беременности, отражающая его рост во II и III триместрах в обеих группах женщин (контрольная и с ИПВ) одинаковая. Также совпадает динамика продукции MIF митоген-активированными клетками цельной периферической крови в течение беременности женщин в группах контрольной и с ИПВ, кроме значений во II триместре: в этом сроке продукция MIF женщин с ИПВ зна-

чимо ниже (p = 0,033), хотя все равно увеличена по сравнению с I триместром в 3 раза (в контроле – в 5 раз).

Поскольку в данной таблице представлены результаты у женщин с ИПВ с беременностью, пролонгированной до доношенного срока, то эти данные можно рассматривать как свидетельство положительного влияния ИЦТ на течение и исходы беременности у данной категории пациентов. Ранее нами было показано, что и субпопуляционный состав лимфоцитов, а также их способность отвечать на активационный стимул у женщин с физиологическим течением беременности и у женщин с ИПВ с доношенной после ИЦТ в I триместре беременностью не отличается [3], и динамика баланса Th1/Th2-цитокиновой продукции одинакова в обеих группах женщин и



**Рисунок 1.** Содержание MIF в сроке 5-9 недель гестации в сыворотке и супернатанте митоген-активированных клеток периферической крови женщин с ИПВ с разными исходами беременности, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

Примечание. В – выкидыш, Д – доношенная беременность, s – в сыворотке, sp – в супернатанте; различия по U-критерию Манна-Уитни значимы ( $p < 0,05$ ).

Figure 1. MIF content at 5-9 weeks of gestation in serum and supernatant of mitogen-activated peripheral blood cells of women with IRM with different pregnancy outcomes, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

Note. M, miscarriage; F, full-term pregnancy; s, in the serum; sp, in the supernatant; differences according to the Mann-Whitney U-test are significant ( $p < 0.05$ ).

характеризовалась преимущественно провоспалительной направленностью в I и III триместрах, противовоспалительной – во II триместре [2].

В таблице 2 представлено содержание MIF в разные сроки I триместра гестации у пациенток с разными исходами беременности, наступившей после ИЦТ в прегравидарной подготовке.

Как следует из данных таблицы 2, значения MIF в сроке 5-6 недель в сыворотке женщин с физиологическим течением беременности ниже, чем у женщин в обеих подгруппах ИПВ, но различия в содержании MIF у женщин с выкидышем и с доношенной беременностью – нет. Также не выявлено различий в содержании MIF в супернатантах активированных клеток цельной крови женщин по срокам обследования в группах и между группами в одинаковые сроки обследования.

Известно, что к сроку 8-9 недель гестации завершаются начальные этапы формирования плаценты, которые имеет важнейшее значение для пролонгирования беременности. Потери беременности в эти сроки свидетельствуют о неспособности трофобласта к дальнейшему росту и развитию. По литературным данным, секреция

MIF плацентой препятствует апоптозу клеток трофобласта [10, 13]. Поэтому было проанализировано содержание MIF в сроках 5-9 недель гестации в сыворотке и супернатантах женщин, потерявших беременность, и у женщин с доношенной беременностью (рисунок).

Из представленных на рисунке данных, у женщин с доношенной беременностью содержание MIF в сыворотке выше, чем у женщин с выкидышем, что согласуется с выводами других авторов о неблагоприятном влиянии низких уровней MIF в сыворотке в ранние сроки беременности на ее развитие [11, 15]. Интересным оказался результат со значимо низким уровнем MIF в супернатантах митоген-активированных клеток периферической крови женщин с доношенной беременностью по сравнению с уровнем у женщин с выкидышем. Эти результаты совпадают с ранее опубликованными нами данными о самом низком уровне блокирующего эффекта аутологичной сыворотки у женщин с доношенной беременностью именно в анализируемом сроке гестации по сравнению с уровнем у женщин с ИПВ в течение всей доношенной беременности [1]. Блокирующий эффект рассчитывался по инги-

бириванию экспрессии раннего активационного маркера CD69 митоген-активированными мононуклеарами периферической крови в культуре при добавлении в среду инкубации аутологичной сыворотки [7]. Данные о динамике блокирующей активности сыворотки в течение первого триместра у женщин с доношенной беременностью подтверждают значимость при имплантации высокого уровня иммуносупрессии. На сроке 8-9 недель происходило резкое падение БЭ до минимальных значений, зарегистрированных в первом триместре. Вероятно, высокая блокирующая активность имеет значение именно для периода имплантации, а дальнейший процесс развития беременности, видимо, протекает на фоне сни-

жения иммуносупрессии. Минимальное значение блокирующей активности сыворотки в 8-9 недель гестации может отражать необходимость иммунного контроля первой волны инвазии трофобласта в спиральные артерии матки.

## Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что не у всех женщин с ИПВ иммуноцитотерапия способствует пролонгированию беременности до доношенного срока. Поэтому необходимо проведение дальнейших исследований по поиску критериев назначения ИЦТ в лечении идиопатического привычного выкидыша.

## Список литературы / References

1. Кречетова Л.В., Николаева М.А., Ванько Л.В., Голубева Е.Л., Зиганшина М.М., Тетруашвили Н.К., Вторушина В.В., Сухих Г.Т. Блокирующий эффект аутологичной сыворотки женщин с привычным невынашиванием беременности // *Акушерство и гинекология*, 2013. № 3. С. 38-42. [Krechetova L.V., Nikolaeva M.A., Vanko L.V., Golubeva E.L., Ziganshina M.M., Tetrushvili N.K., Vtorushina V.V., Sukhikh G.T. Blocking effect of autologous serum in women with recurrent miscarriage. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2013, no. 3, pp. 38-42. (In Russ.)]
2. Кречетова Л.В., Николаева М.А., Ванько Л.В., Зиганшина М.М., Вторушина В.В., Хачатрян Н.А., Тетруашвили Н.К., Сухих Г.Т. Продукция цитокинов *in vitro* мононуклеарными клетками периферической крови при проведении аллоиммунизации у пациенток с привычным выкидышем // *Акушерство и гинекология*, 2014. № 5. С. 51-56. [Krechetova L.V., Nikolaeva M.A., Vanko L.V., Ziganshina M.M., Vtorushina V.V., Khachatryan N.A., Tetrushvili N.K., Sukhikh G.T. Production of cytokines *in vitro* by mononuclear cells of peripheral blood during alloimmunization in patients with recurrent miscarriage. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2014, no. 5, pp. 51-56. (In Russ.)]
3. Кречетова Л.В., Тетруашвили Н.К., Вторушина В.В., Степанова Е.О., Николаева М.А., Голубева Е.Л., Хачатрян Н.А. Динамика субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови в первом триместре беременности у женщин с привычным выкидышем на фоне проведения иммуноцитотерапии // *Акушерство и гинекология*, 2015. № 6. С. 59-66. [Krechetova L.V., Tetrushvili N.K., Vtorushina V.V., Stepanova E.O., Nikolaeva M.A., Golubeva E.L., Khachatryan N.A. The course of changes in subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes in the first trimester of pregnancy in women with recurrent miscarriage during immunotherapy. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2015, no. 6, pp. 59-66. (In Russ.)]
4. Сидельникова В.М. Подготовка и ведение беременности у женщин с привычным невынашиванием: методические рекомендации и клинические протоколы. 3-е изд. М.: МЕДпрессинформ, 2013. 224 с. [Sidelnikova V.M. Preparation and maintenance of pregnancy in women with recurrent pregnancy loss: manuals and clinical guidelines]. Moscow: MEDpress-inform, 2011. 224 p.
5. Сотникова Н.Ю. Иммунологическая загадка беременности. Иваново: МИК, 2005. 276 с. [Sotnikova N.Yu. Immunological mystery of pregnancy]. Ivanovo: MIC, 2005. 276 p.
6. Суслов А.П., Коноплева М.В., Третьяков О.Ю. Фундаментальная иммунобиология провоспалительных цитокинов и MIF // *Медицинская иммунология*, 2006. Т. 8, № 1. С. 5-22. [Suslov A.P., Konopleva M.V., Tretyakov O.Yu. Fundamental immunobiology of proinflammatory cytokines and MIF. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2006, Vol. 8, no. 1, pp. 5-22. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2006-1-5-22.
7. Патент 2396566 РФ, МПК G01N 33/ 53 (2006.01). Способ определения блокирующего эффекта аутологичной женской сыворотки / Сухих Г.Т., Ванько Л.В., Николаева М.А., Зиганшина М.М., Сидельникова В.М., Кречетова Л.В.; заявитель и патентообладатель ФГБУ НЦ АГП им.В.И.Кулакова, ГОУВПО ММА им. И.М. Сеченова. № 2009116174/15; заявл. 29.04.2009; опубл. 10.08.2010; Бюлл. № 22. 10 с. [Patent 2396566 RF, IPC G01N 33/53 (2006.01). Method for determining the blocking effect of autologous female serum / Sukhikh G.T., Vanko L.V., Nikolaeva M.A., Ziganshina M.M., Sidelnikova V.M., Krechetova L.V.; applicant and patentee FGBU NTs AGP named after V.I. Kulakov, GOUVPO MMA named after V.I. THEM. Sechenov. No. 2009116174/15; declared 04/29/2009; publ. 08/10/2010; Bulletin No. 22. 10 p.

8. Arcuri F., Ricci C., Ietta F., Cintonino M., Tripodi S.A., Cetin I., Garzia E., Schatz F., Klemi P., Santopietro R., Paulesu L. Macrophage migration inhibitory factor in the human endometrium: expression and localization during the menstrual cycle and early pregnancy. *Biol. Reprod.*, 2001, Vol. 64, no. 4, pp. 1200-1205.
9. Arcuri F., Cintonino M., Carducci A., Papa S., Riparbelli M.G., Mangioni S., Di Blasio A.M., Tosi P., Viganò P. Human decidual natural killer cells as a source and target of macrophage migration inhibitory factor. *Reproduction*, 2006, Vol. 131, no. 1, pp. 175-182.
10. Bevilacqua E., Paulesu L., Ferro E.A., Ietta F., Faria M.R., Lorenzon A.R., Costa A.F., Martucci M. Review: putative roles for the macrophage migratory inhibitory factor at the maternal fetal interface. *Placenta*, 2014, Vol. 35 Suppl., pp. S51-S56.
11. Cardaropoli S., Ietta F., Romagnoli R., Rolfo A., Paulesu L., Todros T. Lower macrophage migration inhibitory factor concentrations in maternal serum before pre-eclampsia onset. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2014, Vol. 34, no/ 7, pp. 537-542.
12. Comba C., Bastu E., Dural O., Yasa C., Keskin G., Ozsurmeli M., Buyru F., Serdaroglu H. Role of inflammatory mediators in patients with recurrent pregnancy loss. *Fertil. Steril.*, 2015, Vol. 104, no. 6, pp. 1467-1474.e1.
13. Pearce B.D., Garvin S.E., Grove J., Bonney E.A., Dudley D.J., Schendel D.E., Thorsen P. Serum macrophage migration inhibitory factor in the prediction of preterm delivery. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2008, Vol. 199, no. 1, pp. 46.e1-e6.
14. Viganò P., Cintonino M., Schatz F., Lockwood C.J., Arcuri F. The role of macrophage migration inhibitory factor in maintaining the immune privilege at the fetal-maternal interface. *Semin. Immunopathol.*, 2007, Vol. 29, no. 2, pp. 135-150.
15. Yamada H., Kato E., Morikawa M., Shimada S., Saito H., Watari M., Minakami H., Nishihira J. Decreased serum levels of macrophage migration inhibition factor in miscarriages with normal chromosome karyotype. *Hum. Reprod.*, 2003, Vol. 18, pp. 616-620.

---

**Авторы:**

**Вторушина В.В.** — к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Кречетова Л.В.** — д.м.н., заведующая лабораторией клинической иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Authors:**

**Vitorushina V.V.**, PhD (Medicine), Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

**Krechetova L.V.**, PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Clinical Immunology, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

**Ивьяева Е.В.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Ivviyaeva E.V.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

**Тетруашвили Н.К.** — д.м.н., заведующая отделением патологии беременности (отделение терапии и профилактики невынашивания беременности) ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Tetruashvili N.K.**, PhD, MD (Medicine), Head, Department of Pregnancy Pathology (Department of Therapy and Prevention of Miscarriage), V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

---

Поступила 01.07.2021  
Принята к печати 20.07.2021

Received 01.07.2021  
Accepted 20.07.2021

## РОЛЬ НАРУШЕНИЙ ПРОЦЕССОВ АПОПТОЗА ПРИ НАРУЖНОМ ГЕНИТАЛЬНОМ ЭНДОМЕТРИОЗЕ

Аванесова Т.Г.<sup>1</sup>, Левкович М.А.<sup>2</sup>, Ермолова Н.В.<sup>2</sup>, Крукиер И.И.<sup>2</sup>,  
Дударева М.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ЧУЗ «Клиническая больница “РЖД-Медицина” г. Ростов-на-Дону», г. Ростов-на-Дону, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,  
г. Ростов-на-Дону, Россия

**Резюме.** В настоящее время наружный генитальный эндометриоз (НГЭ) признан одной из самых частых патологий у женщин репродуктивного возраста. Наружный генитальный эндометриоз является хроническим заболеванием, поражающем около 10% женщин репродуктивного возраста, приводя к функциональным и структурным изменениям в репродуктивной системе, бесплодию, тазовой боли, снижая качество жизни пациенток. Кроме того, пациентки с эндометриозом нередко страдают депрессией, частота которой особенно высока при наличии боли. При эндометриозе наблюдается дисрегуляция ответа Т-клеточного звена иммунитета, которая заключается в нарушении взаимодействий Т-клеток, макрофагов, НК (натуральных киллеров), В-клеток, позволяющая клеткам эндометрия имплантироваться в экстрагенитальных местах. Выраженное негативное влияние НГЭ на качество жизни больных, их репродуктивную функцию, нарушение адаптации больных в обществе, растущие затраты на лечение определяют социальное значение заболевания и важность его изучения. На сегодняшний день очевидно, что в формировании НГЭ значительную роль играют нарушения иммунной системы, однако несмотря на обширные исследования в этой области, недостаточно изучены процессы апоптоза при НГЭ.

В этой связи целью исследования явилось изучение характера нарушений процессов апоптоза у женщин с I-II и III-IV стадиями наружного генитального эндометриоза.

Было обследовано 71 пациентка с НГЭ, которые были подразделены на 2 группы: 1-я группа – пациентки с I-II стадией НГЭ (n = 31) и 2-я группа – пациентки с III-IV стадией НГЭ (n = 40), в контрольную группу вошли 24 пациентки без НГЭ.

Определение популяционного состава лимфоцитов периферической крови проводили методом лазерной проточной цитометрии, используя реагенты фирмы Immunotex, FITC меченые CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> и PE-меченые CD95<sup>+</sup>. Количество лимфоцитов, вступивших в апоптоз, выявляли с использованием диагностического набора, включающего AnnexinV<sup>+</sup> (FITC) и PI<sup>+</sup> фирмы Caltag. Результаты учитывали на проточном цитометре BECKMAN COULTER EPICS XL-II, используя стандартные протоколы.

Значимыми причинами НГЭ является дисбаланс процессов активации и апоптоза иммунокомпетентных клеток. Индукция апоптоза по пути Fas-FasL у пациенток с наружным генитальным эндометриозом приводит к снижению цитотоксичности, опосредованной Т-лимфоцитами и НК-клетками. Статистически значимое снижение содержания AnnexinV<sup>+</sup> презентующих лимфоцитов свидетель-

### Адрес для переписки:

Аванесова Татевик Григорьевна  
ЧУЗ «Клиническая больница “РЖД-Медицина”,  
г. Ростов-на-Дону»  
344011, Россия, г. Ростов-на-Дону,  
ул. Варфоломеева, 92а.  
Тел.: 8 (905) 453-59-58.  
E-mail: tata\_avanosova@mail.ru

### Address for correspondence:

Avanesova Tatevik G.  
Clinical Hospital of Russian Railways-Medicine of the city of  
Rostov-on-Don  
344011, Russian Federation, Rostov-on-Don,  
Varfolomeev str., 92a.  
Phone: 7 (905) 453-59-58.  
E-mail: tata\_avanosova@mail.ru

### Образец цитирования:

Т.Г. Аванесова, М.А. Левкович, Н.В. Ермолова,  
И.И. Крукиер, М.В. Дударева «Роль нарушений  
процессов апоптоза при наружном генитальном  
эндометриозе» // Российский иммунологический  
журнал, 2021. Т. 24, № 3. С. 409-412.  
doi: 10.46235/1028-7221-1038-ROA

© Аванесова Т.Г. и соавт., 2021

### For citation:

T.G. Avanesova, M.A. Levkovich, N.V. Ermolova,  
I.I. Krukier, M.V. Dudareva “Role of apoptosis disturbances  
in external genital endometriosis”, Russian Journal of  
Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021,  
Vol. 24, no. 3, pp. 409-412.  
doi: 10.46235/1028-7221-1038-ROA

DOI: 10.46235/1028-7221-1038-ROA

ствует о нарушении реализации их рецептор-зависимого апоптоза. Нарушение процессов апоптоза может быть ответственным за развитие НГЭ, способствуя пролиферации и росту эндометриоидных имплантатов.

*Ключевые слова:* наружный генитальный эндометриоз, апоптоз, Т-лимфоциты, NK-клетки, иммунитет

## ROLE OF APOPTOSIS DISTURBANCES IN EXTERNAL GENITAL ENDOMETRIOSIS

Avanesova T.G.<sup>a</sup>, Levkovich M.A.<sup>b</sup>, Ermolova N.V.<sup>b</sup>, Krukier I.I.<sup>b</sup>,  
Dudareva M.V.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Private Clinical Hospital of Russian Railways-Medicine, Rostov-on-Don, Russian Federation

<sup>b</sup> Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

**Abstract.** External genital endometriosis (EGE) is currently considered one of the most common disorders in women at their reproductive age. EGE is a chronic disease that affects about 10% of women of reproductive age, leading to functional and structural changes in reproductive system, infertility, pelvic pain, and affects their quality of life. Moreover, the patients with endometriosis often suffer from depression, especially, due to pain syndrome. Endometriosis is associated with dysregulation of T-cell immune response, which presents as altered interactions between T-cells, macrophages, NK (natural killer cells), B-cells, thus allowing ectopic implantation of endometrial cells. The pronounced negative effect of EGE on the quality of life of patients, their reproductive function, impaired adaptation of the patients in community, and growing costs of treatment determine social significance of the disease and importance of appropriate studies. It is obvious that disorders of the immune system play a significant role in IGE development. However, despite extensive research in this area, the processes of apoptosis in IGE have not been sufficiently studied. Therefore, the aim of our study was to assess the origin of apoptosis disorders in women with stage I-II and III-IV of external genital endometriosis.

We examined 71 patients with EGE which were divided into 2 groups: group 1 included the patients with EGE stage I-II (n = 31), and group 2, the patients with stage III-IV EGE (n = 40). The control group included 24 patients without EGE. The population profile of peripheral blood lymphocytes was determined by laser flow cytometry using Immunotex reagents, i.e., FITC-labeled CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, and PE-labeled CD95<sup>+</sup> antibodies. The number of lymphocytes entering apoptosis was detected using a diagnostic kit for AnnexinV<sup>+</sup> (FITC) and PI<sup>+</sup> from Caltag. The results were read on a BECKMAN COULTER EPICS XL-II flow cytometer using standard protocols.

An imbalance between activation and apoptosis of immunocompetent cells may be a significant cause of EGE. Induction of apoptosis by the Fas-FasL pathway in patients with external genital endometriosis leads to decreased cytotoxicity mediated by T-lymphocytes and NK-cells. A statistically significant decrease in the content of AnnexinV<sup>+</sup> presenting lymphocytes suggests impairment of their receptor-dependent apoptosis. Altered apoptosis processes may be responsible for the development of IGE by promotion of proliferation and growth of endometrioid implants.

*Keywords:* external genital endometriosis, apoptosis, T-lymphocytes, NK-cells, immunity

## Введение

Наружный генитальный эндометриоз (НГЭ) — одна из ведущих проблем современной гинекологии, он стоит на третьем месте в структуре болезней органов репродуктивной системы у женщин после воспалительных заболеваний придатков матки и миомы матки [1, 2]. НГЭ поражает большую часть женщин репродуктивного возраста и, отрицательно влияя на их физическое, психологическое и социальное состояние, значительно

снижает качество жизни данной категории пациенток [3].

Одна из ведущих теорий развития НГЭ — имплантационная, согласно которой эндометриоидные гетеротопии формируются при ретроградном забросе эутопического эндометрия в малый таз во время менструации. Однако не ясно, почему клетки эндометрия сохраняют жизнеспособность в перитонеуме, имплантируются на органах малого таза и приобретают способность инвазивного роста. В настоящее время эндометриоз рас-

считается как многофакторное заболевание, в развитии которого играют роль генетические, иммунологические, гормональные нарушения, а также стресс, неблагоприятная экологическая обстановка.

Многочисленные исследования доказывают, что при НГЭ происходит нарушение функций иммунной системы, сопровождающееся неконтролируемой пролиферацией клеток эндометрия, что в конечном счете приводит к формированию эндометриозидных гетеротопий [4, 5].

Большой интерес представляет изучение взаимосвязи между нарушением регуляции процесса апоптоза и развитием эндометриоза, сопровождающегося снижением эффективности иммунного надзора.

**Целью исследования** явилось изучение характера нарушений процессов апоптоза у женщин с I-II и III-IV стадиями наружного генитального эндометриоза.

## Материалы и методы

На базе гинекологического отделения ФГБОУ ВО «РостГМУ» Минздрава России, НИИАП обследована 71 женщина с НГЭ, которые были распределены на две группы: 1-я группа – пациентки с I-II стадиями НГЭ ( $n = 31$ ); 2-я группа – пациентки с III-IV стадиями НГЭ ( $n = 40$ ). Контрольную группу составили 24 женщин без эндометриоза.

Определение популяционного состава лимфоцитов периферической крови проводили методом лазерной проточной цитометрии, используя реагенты фирмы Immunotex. FITC, меченые  $CD8^+$ ,  $CD16^+$  и PE-меченые  $CD95^+$ . Количество лимфоцитов, вступивших в апоптоз, выявляли с использованием диагностического набора, включающего AnnexinV+ (FITC) и PI+ фирмы Caltag. Результаты учитывали на проточном цитометре BECKMAN COULTER EPICS XL-II, используя стандартные протоколы.

## Результаты и обсуждение

Проведенный анализ показал, что формирование НГЭ сопровождалось выраженными изменениями показателей иммунитета. В 1-й и 2-й группе по сравнению с контрольной группой выявлено статистически значимое снижение  $CD8$  лимфоцитов, (17,1 (16,3-23,4) % и 15,05 (13,6-20,2) %, против 25,8 (24,1-26,7) % соответственно ( $p = 0,02$ ), наиболее выраженные изменения отмечены во 2 группе, показатели были ниже, чем в контрольной в 1,7 раза ( $p = 0,02$ ).

В 1-й и 2-й группе выявлено статистически значимое снижение относительного числа  $CD16^+$

по сравнению с контрольной группой (в 2,9 и 1,3 раза соответственно ( $p = 0,03$ )). Кроме того, показатели во 2-й группе были значимо ниже, чем в 1-й ( $p = 0,03$ ).

Известно, что молекула  $CD95^+$  участвует в процессе контроля над обновлением нормальных клеток через индукцию апоптоза. Этот тип клеточной гибели является одним из компонентов механизма поддержания гомеостаза в обновляющихся клеточных популяциях. Fas-зависимый апоптоз является одним из основных механизмов регуляции эффекторной функции цитотоксических лимфоцитов и NK-клеток при киллинге клеток-мишеней.

При анализе содержания цитотоксических T-лимфоцитов и NK-клеток, экспрессирующих Fas-рецептор  $CD95^+$ , как маркер поздней активации, характеризующий готовность к апоптозу, было обнаружено его повышение на  $CD16^+$  при различных стадиях эндометриоза, показатели превышали контрольные в 2,5 раза в обеих клинических группах (0,5 (0,4-0,6) % против 0,2 (0,1-0,3) %) ( $p = 0,03$ ). Аналогичные данные получены и для  $CD8^+CD95^+$ , их уровень в 1-й группе был выше, чем в контрольной группе в 1,2 раза, во 2-й группе – в 1,46 раза (2,56 (2,45-2,85) % и 3,15 (2,7-3,35) % против 2,15 (2,05-2,3) % соответственно) ( $p = 0,02$ ).

Абберантные иммунные реакции  $CD8^+$  и NK-клеток могут представлять факторы риска развития эндометриоза, способствуя дисфункции врожденного и адаптивного иммунитета, развитию и прогрессированию заболевания.

Кроме оценки уровня экспрессии  $CD8^+$  и NK-клетками  $CD95^+$  нами определялось количество клеток, вступивших в апоптоз, на основании их способности фиксировать на своей поверхности AnnexinV+ (FITC) и PI+. Полученные результаты свидетельствуют о том, в периферической крови женщин во 2-й группе по сравнению с контрольной группой выявлено статистически значимое снижение как ранних AnnexinV+ (2,85 (2,2-3,6) % против 5,5 (4,45-5,85) %, так и поздних AnnexinV+ PI+ маркеров апоптоза (0,1 (0,1-0,1) % против 0,2 (0,1-0,3) %) соответственно ( $p = 0,03$ ).

Несмотря на количественное увеличение содержания  $CD95^+$ -лимфоцитов в субпопуляциях  $CD8^+$  и NK-клеток, при НГЭ нами не было обнаружено усиления апоптоза лимфоцитарных клеток. Однако у пациенток 2-й группы при проведении аннексинового теста было зарегистрировано статистически значимое снижение содержания AnnexinV+ презентующих лимфоцитов, что свидетельствует о нарушении реализации их рецептор-зависимого апоптоза.

## Заключение

Таким образом, индукция апоптоза по пути Fas-FasL у пациенток с наружным генитальным эндометриозом приводит к снижению цитотоксичности, опосредованной Т-лимфоцитами и НК-клетками. Статистически значимое снижение содержания AnnexinV<sup>+</sup> презентующих

лимфоцитов свидетельствует о нарушении реализации их рецептор-зависимого апоптоза. Нарушение процессов апоптоза может быть ответственным за развитие эндометриоза, способствуя снижению эффективности иммунного надзора, способствуя пролиферации и росту эндометриодных имплантатов.

## Список литературы / References

1. Адамян Л.В., Фархат К.Н., Макиян З.Н., Савилова А.М. Молекулярно-биологическая характеристика эутопического эндометрия // Проблемы репродукции, 2015. Т. 21, № 5. С. 8-16. [Adamyany L.V., Farhat K.N., Makiyan Z.N., Savilova A.M. Molecular biological characteristics of the eutopic endometrium. *Problemy reproduktcii = Problems of Reproduction*, 2015, Vol. 21, no. 5, pp. 8-16. (In Russ.)]
2. Красильникова А.К., Малышкина А.И., Сотникова Н.Ю., Анциферова Ю.С. Клиника «малых» форм эндометриоза // Вестник Ивановской медицинской академии, 2018. Т. 23, № 3. С. 18-21. [Krasilnikova A.K., Malysheva A.I., Sotnikova N.Yu., Antsiferova Yu.S. Clinic of "small" forms of endometriosis. *Vestnik Ivanovskoy meditsinskoy akademii = Bulletin of the Ivanovo Medical Academy*, 2018, Vol. 23, no. 3, pp. 18-21. (In Russ.)]
3. Левкович М.А., Ермолова Н.В., Аванесова Т.Г., Маркарян И.В. Современные взгляды на патогенез генитального эндометриоза: роль гормональных, иммунологических, генетических факторов // Таврический медико-биологический вестник, 2017. Т. 20, № 2. С. 185-189. [Levkovich M.A., Ermolova N.V., Avanesova T.G., Markaryan I.V. Modern views on the pathogenesis of genital endometriosis: the role of hormonal, immunological, genetic factors. *Tavrisheskiy mediko-biologicheskii vestnik = Tavricheskiy Medical and Biological Bulletin*, 2017, Vol. 20, no. 2, pp. 185-189. (In Russ.)]
4. Сельков С.А., Ярмолинская М.И. Эндометриоз как патология регуляторных механизмов // Журнал акушерства и женских болезней, 2017. Т. 66, № 2. С. 9-13. [Selkov S.A., Yarmolinskaya M.I. Endometriosis as a pathology of regulatory mechanisms. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney = Journal of Obstetrics and Women's Diseases*, 2017, Vol. 66, no. 2, pp. 9-13. (In Russ.)]
5. Ermolova N.V., Petrov Y.A., Levkovich M.A., Kolesnikova L.V., Drukker N.A. Influence of cytokines production, nitrogen oxide metabolites and lipids exchange on the formation of external genital endometriosis stages in patients of reproductive age. *Periodico Tche Quimica*, 2020, Vol. 17, no. 35, pp. 813-824.

### Авторы:

**Аванесова Т.Г.** — к.м.н., врач — акушер-гинеколог ЧУЗ «Клиническая больница "РЖД-Медицина" г. Ростов-на-Дону», г. Ростов-на-Дону, Россия

**Левкович М.А.** — д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник отдела аллергических и аутоиммунных заболеваний НИИ акушерства и педиатрии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

**Ермолова Н.В.** — д.м.н., доцент, начальник акушерско-гинекологического отдела НИИ акушерства и педиатрии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

**Крукиер И.И.** — д.б.н., ведущий научный сотрудник акушерско-гинекологического отдела НИИ акушерства и педиатрии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

**Дударева М.В.** — д.б.н., заведующая клинико-диагностической лабораторией НИИ акушерства и педиатрии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

### Authors:

**Avanesova T.G.**, PhD (Medicine), Obstetrician-gynecologist, Private Clinical Hospital of Russian Railways-Medicine, Rostov-on-Don, Russian Federation

**Levkovich M.A.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Leading Research Associate, Department of Allergic and Autoimmune Diseases, Research Institute of Obstetrics and Pediatrics, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

**Ermolova N.V.**, PhD, MD (Medicine), Head, Obstetric and Gynecological Department, Research Institute of Obstetrics and Pediatrics, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

**Krukier I.I.**, PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Obstetric and Gynecological Department, Research Institute of Obstetrics and Pediatrics, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

**Dudareva M.V.**, PhD, MD (Biology), Head, Clinical Diagnostic Laboratory, Research Institute of Obstetrics and Pediatrics, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Поступила 29.06.2021  
Принята к печати 20.07.2021

Received 29.06.2021  
Accepted 20.07.2021

## ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ И ДЛИТЕЛЬНОСТЬ ЦИРКУЛЯЦИИ ВОЛЧАНОЧНОГО АНТИКОАГУЛЯНТА У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19

Безнощенко О.С.<sup>1</sup>, Шпилюк М.А.<sup>1</sup>, Иванец Т.Ю.<sup>1</sup>, Кречетова Л.В.<sup>1</sup>,  
Пырегов А.В.<sup>1</sup>, Кодацкий Д.С.<sup>1</sup>, Тавлуева Е.В.<sup>2</sup>, Мелкумян А.Р.<sup>2</sup>,  
Городнова Е.А.<sup>1</sup>, Долгушина Н.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

<sup>2</sup> ГБУЗ «Городская клиническая больница имени Ф.И. Иноземцева Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

**Резюме.** Цель работы – определить частоту выявления волчаночного антикоагулянта в плазме крови у пациентов с разной степенью тяжести COVID-19 и длительность его циркуляции после перенесенного инфекционного заболевания.

В исследование было включено 103 пациента с COVID-19. Пациенты наблюдались в амбулаторных условиях, а требующие наблюдения в условиях стационара были госпитализированы в инфекционный госпиталь на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им В.И. Кулакова» Минздрава России или инфекционный стационар ГБУЗ «ГКБ им. Ф.И. Иноземцева ДЗМ». Лечение пациентов и стратификация на группы тяжести – легкая (n = 27), средняя (n = 55) и тяжелая (n = 20) – проводилась в соответствии с Временными методическими рекомендациями МЗ РФ по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции, версия 9. Пациентов обследовали на наличие ВА в динамике: в день обращения за медицинской помощью (при амбулаторном наблюдении) или в день госпитализации, повторно – перед выпиской (пациенты стационара), затем через 1-2 месяца и 7 месяцев после выздоровления. Волчаночный антикоагулянт (ВА) определяли двумя независимыми тестами (dRVVT и SCT), включающими скрининговую и подтверждающую пробу.

При первичном обследовании у 50 пациентов (49%) был обнаружен ВА. Эффект ВА в 98% случаев наблюдался в тесте dRVVT за счет увеличения нормализованного отношения (NR). Максимальное значение медианы NR = 1,54 (0,97:2,1) отмечалось у пациентов с тяжелым течением COVID-19 по сравнению с остальными группами (p < 0,0001) и коррелировало со степенью тяжестью инфекционного процесса (r = 0,491, p < 0,0001). При легком течении COVID-19 ВА были выявлены в 4 случаях (14,8%), при среднем – в 27 (49,1%) и при тяжелом – в 19 случаях (95%) (p < 0,05). Повторное обследование пациентов перед выпиской из стационара и через 1-2 месяца выявило высокую частоту ВА, но

### Адрес для переписки:

Безнощенко Ольга Сергеевна  
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ  
117997, Россия, Москва, ул. Акад. Опарина, 4.  
Тел.: 8 (919) 721-43-29.  
E-mail: ospa-a@yandex.ru

### Address for correspondence:

Beznooshchenko Olga S.  
V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology  
117997, Russian Federation, Moscow, Acad. Oparin str., 4.  
Phone: 7 (919) 721-43-29.  
E-mail: ospa-a@yandex.ru

### Образец цитирования:

О.С. Безнощенко, М.А. Шпилюк, Т.Ю. Иванец, Л.В. Кречетова, А.В. Пырегов, Д.С. Кодацкий, Е.В. Тавлуева, А.Р. Мелкумян, Е.А. Городнова, Н.В. Долгушина «Частота выявления и длительность циркуляции волчаночного антикоагулянта у пациентов с COVID-19» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 3. С. 413-418.  
doi: 10.46235/1028-7221-1042-DFA  
© Безнощенко О.С. и соавт., 2021

### For citation:

O.S. Beznooshchenko, M.A. Shpiluk, T.Yu. Ivanets, L.V. Krechetova, A.V. Pyregov, D.S. Kodatskiy, E.V. Tavlyuyeva, A.R. Melkumyan, E.A. Gorodnova, N.V. Dolgushina "Detection frequency and duration of lupus anticoagulant circulation in COVID-19 patients", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 3, pp. 413-418.  
doi: 10.46235/1028-7221-1042-DFA  
DOI: 10.46235/1028-7221-1042-DFA

через 7 месяцев у испытуемых ни одного положительного теста на ВА не было обнаружено ( $p < 0,05$ ).

У пациентов с COVID-19 была обнаружена высокая частота циркулирования ВА, которая зависела от степени выраженности инфекционного процесса. Кроме того, было впервые показано, что длительность персистенции ВА в постинфекционном периоде составляет не более 7 месяцев.

*Ключевые слова:* COVID-19, волчаночный антикоагулянт, АФА, тест dRVVT, тест SCT, циркуляция

## DETECTION FREQUENCY AND DURATION OF LUPUS ANTICOAGULANT CIRCULATION IN COVID-19 PATIENTS

Beznoshchenko O.S.<sup>a</sup>, Shpiluk M.A.<sup>a</sup>, Ivanets T.Yu.<sup>a</sup>, Krechetova L.V.<sup>a</sup>, Pyregov A.V.<sup>a</sup>, Kodatsky D.S.<sup>a</sup>, Tavluyeva E.V.<sup>b</sup>, Melkumyan A.R.<sup>b</sup>, Gorodnova E.A.<sup>a</sup>, Dolgushina N.V.<sup>a</sup>

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

<sup>b</sup> F. Inozemtsev City Clinical Hospital, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** The aim of the work was to determine frequency of lupus anticoagulant (LA) detection in patients at various degrees of COVID-19 severity as well as duration of LA circulation after the infectious disease. The study included 103 patients with COVID-19. The patients were observed during the hospital care and in ambulance, if required. The patients were admitted to the departments of infectious diseases arranged at the V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and F.I. Inozemtsev City Clinical Hospital. Treatment schedules and stratification of the patients by clinical severity was carried out in accordance with Interim Guidelines issued by the Ministry of Health of the Russian Federation for the prevention, diagnosis and treatment of new coronavirus infection (version 9). The following groups were formed: mild ( $n = 27$ ), moderate ( $n = 55$ ) and severe ( $n = 20$ ). The patients were tested for LA positivity in the course of disease: on the day of starting medical care (with outpatient observation), or on the day of hospitalization; repeated tests were made before discharge (inpatients), and later, 1-2 months and 7 months after recovery. Lupus anticoagulant was determined by two independent tests (dRVVT and SCT), i.e., as a screening test and a confirmation test. At initial examination, LA was found in 50 patients (49%). The effect of LA in 98% of cases was observed with dRVVT test, as an increase of normalized ratio (NR). The maximum median value of NR was 1.54 (0.97: 2.1) was revealed in patients with severe course of COVID-19 ( $p < 0.0001$ ) compared with other groups and correlated with severity of the infectious process ( $r = 0.491$ ,  $p < 0.0001$ ). In mild cases of COVID-19, LA was detected less often (4 cases, 14.8%) than in moderate severity cases (27, 49.1%), and severe patients (19, 95%) ( $p < 0.05$ ). Re-examinations of the patients before discharge from the hospital and 1-2 months later revealed high frequency of LA ( $p < 0.05$ ). However, no LA-positive test was found 7 months after discharge.

In patients with COVID-19, high frequency of circulating LA was registered, depending on severity of the infectious process. In addition, we have first shown that persistence of the circulating LA over post-infectious period does not exceed 7 months.

*Keywords:* COVID-19, severity COVID-19, lupus anticoagulant, test dRVVT, test SCT, LA circulation

### Введение

Волчаночный антикоагулянт (ВА) – группа гетерогенных IgG аутоантител к белкам, связанным с отрицательными фосфолипидами. ВА являются разновидностью антифосфолипидных антител (АФА), обладающих прокоагулянтными свойствами и определяющих способность пролонгировать фосфолипид-зависимые тесты свертывания крови [4]. ВА включены в критерии классификации Саппоро и считаются лучшим

маркером профиля АФА высокого риска развития тромботических осложнений [7].

Пациенты с новой коронавирусной инфекцией склонны к чрезмерной активации свертывания крови, нарушение свертывания коррелирует с тяжестью заболевания [6]. АФА обнаружены более чем у половины пациентов с COVID-19. Высокие титры АФА (IgG) активируют нейтрофилы, что приводит к выбросу внутриклеточных ловушек (NET) и образованию тромбов [1]. В литературе описаны случаи тромбоза у пациентов с

COVID-19 и антителами к кардиолипину (КЛ),  $\beta$ 2-гликопротеину ( $\beta$ 2-ГП), но без ВА [2]. Bowles и соавт. выявили высокую частоту ВА (91%) у госпитализированных пациентов с COVID-19, а Helms и соавт. показали, что ВА чаще обнаруживаются у пациентов в крайне тяжелом состоянии (87,7%), чем у больных с тяжелой степенью COVID-19 (45%) [5]. Эти данные свидетельствуют о том, что большинство госпитализированных пациентов с COVID-19 являются АФА-позитивными. Однако данных о клинической значимости ВА в риске развития тромбозов при COVID-19 и длительности циркулирования этих антител в постинфекционном периоде нет.

**Цель работы** – определить частоту выявления волчаночного антикоагулянта у пациентов разной степени тяжести COVID-19 и длительность его циркуляции после перенесенного инфекционного заболевания.

## Материалы и методы

В исследование было включено 103 пациента с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19). Сотрудники Центра с легкой и средней степенью тяжести проходили лечение в амбулаторных условиях. Пациенты, требующие наблюдения в условиях стационара (средней степени тяжести, в тяжелом состоянии), были госпитализированы в инфекционный госпиталь на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им В.И. Кулакова» Минздрава России в период с 23.04.2020 по 20.06.2020 или инфекционный стационар ГБУЗ «ГКБ им. Ф.И. Иноземцева ДЗМ» 28.12.2020 по 01.02.2021. Лечение пациентов и стратификация на группы тяжести: легкая ( $n = 27$ ), средняя ( $n = 55$ ) и тяжелая ( $n = 20$ ) проводилась в соответствии с Временными методическими рекомендациями МЗ РФ по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции, версия 9. Все пациенты были выписаны в удовлетворительном состоянии.

Исследование проведено в рамках государственного задания «Изучение влияния коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, на систему гемостаза» и одобрено на заседании Ученого совета ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (выписка № 2 от 09.02.2021 г.). Критерии включения: подтвержденный диагноз COVID-19, возраст старше 18 лет, подписанное информированное согласие на участие в исследовании. Критерии исключения: хирургическое вмешательство во время COVID-19, отказ пациента от продолжения участия в исследовании, терапия оральными антикоагулянтами прямого действия. Критерии невключения: беременность или период лактации (для женщин), наследственные коагуло-

патии, онкологические заболевания, системные поражения соединительной ткани, трансплантированные органы, ВИЧ-инфекция, сифилис, другие острые инфекционные заболевания, аутоиммунные заболевания, систематический прием антикоагулянтов/антиагрегантов.

Пациенты обследовались в день обращения за медицинской помощью (при амбулаторном наблюдении) или в день госпитализации, повторно – перед выпиской (пациенты стационара), затем через 1–2 месяца и 7 месяцев после выздоровления. Для взятия и транспортировки крови использовали закрытые системы S-Monovette® (SARSTEDT, Германия). Процедура получения образца крови для исследований гемостаза соответствовала требованиям преаналитического этапа. Аналитическими образцами служили аликваты бестромбоцитарной плазмы, полученные последовательным центрифугированием (15 мин при 1600 g, затем 5 мин при 10000 g) венозной крови с цитратом натрия 3,2%.

Согласно рекомендациям Международного общества по тромбозу и гемостазу, (ISTH) волчаночные антикоагулянты (ВА) определяли двумя независимыми тестами (dRVVT и SCT), включающими скрининговую и подтверждающую пробу. ВА определяли на автоматическом коагулометре – ACL TOP 700 (IL Werfen, США), используя реагенты HemosIL. Яд гадюки Рассела, используемый в тесте dRVVT, напрямую активировать X фактор свертывания, а входящий в состав реагента полибрен делает тест нечувствительным к присутствию гепарина в концентрации до 1 ЕД/мл. Поэтому образцы плазмы крови пациентов с содержанием НМГ более 1 МЕ/мл не анализировались. Реагент скрининг (dRVVT Screen) содержит низкое количество фосфолипидов, что делает его чувствительным к ВА, а избыточное количество фосфолипидов в реагенте (dRVVT Confirm) нейтрализует присутствующие ВА и способствует восстановлению времени свертывания. Аналогичный подход идентификации ВА используется в тесте с кварцевым активатором SCT (Screen, Confirm), но в состав не входит полибрен, поэтому определение ВА при приеме прямых антикоагулянтов или терапии гепарином может провоцировать ложнопозитивные результаты. В соответствии с документом C28-A3 CLSI для каждого лота реагента (dRVVT screen, dRVVT Confirm, SCT Screen, SCT Confirm) были определены средние значения в секундах, которые выступали в качестве постоянного знаменателя при расчете коэффициентов  $Screen_{ratio}$  и  $Confirm_{ratio}$ . Положительные результаты теста выражались нормализованным отношением  $(NR) = Screen_{ratio} / Confirm_{ratio}$ .

Тест на ВА считали позитивным при  $NR > 1,2$  любого из тестов (dRVVT и SCT).

Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel и MedCalc® Software. Данные представлены медианой (Me 95CI). Оценку различий между группами определяли U-критерием Манна–Уитни, корреляцию – критерием Спирмена.

## Результаты и обсуждение

Из 103 пациентов с диагнозом COVID-19, включенных в исследование, было 72 (69,9%) мужчины в возрасте 47,5 (40,8–56) лет и 30 женщин (29,1%) в возрасте 55,5 (41–62,8) лет. Сопутствующие заболевания: гипертоническая болезнь была в анамнезе у 62 пациентов (30,2%), сахарный диабет 2-го типа – у 16 пациентов (15,5%). Индекс массы тела (ИМТ) в группе пациентов с легким течением COVID-19 составил 28,4 (24,3–30), со средне-тяжелым – 31 (28,6–34,2) и с тяжелым – 32,8 (26,6–40,1). Все пациенты проживали на территории г. Москвы или Московской области.

При первичном обследовании 50 пациентов (49%) были ВА-позитивны: изолированно тестом dRVVT ВА был диагностирован у 46 пациентов (92%), тестом SCT – только у 1 (2%), а двумя тестами одновременно (dRVVT и SCT) у 1 пациента легкой степени и у 2 – тяжелой степени COVID-19. Эффект ВА оценивался пролонгированием времени свертывания фосфолипид-за-

висимых тестов (dRVVT screen, SCT Screen). Чем больше ВА в образце, тем длиннее время свертывания в тесте Screen и больше значение нормализованного отношения (NR).

Наибольшее значение медианы  $NR = 1,54$  (0,97:2,1) отмечалось в группе пациентов с тяжелым течением COVID-19 ( $p < 0,0001$ ) по сравнению с остальными (рис. 1). Нормализованное отношение теста dRVVT коррелировало со степенью тяжестью инфекционного процесса ( $r = 0,491$   $p < 0,0001$  (0,327:0,626)).

Сравнение частоты ВА-позитивных тестов у пациентов в группах с разной степенью тяжести COVID-19 показало следующее: при легком течении – 14,8%, при средней степени тяжести – почти у половины (49,1%), а в группе с тяжелой степенью – 95% ( $p < 0,05$ ) (табл. 1).

На наличие ВА пациенты были обследованы повторно, перед выпиской из стационара, частота обнаружения по-прежнему оставалась высокой ( $p > 0,05$ ). Сотрудники Центра, перенесшие COVID-19 в легкой и средней степени тяжести, были обследованы вторично через 1–2 месяца – ВА-позитивные результаты обнаружены у 4 человек, сокращение частоты ВА не выявлено ( $p > 0,05$ ). Через 7 месяцев у ВА-позитивных пациентов Центра и 5 пациентов из группы тяжелой степени COVID-19 провели повторную оценку ВА – ни один из тестов не выявил наличия ВА.

В нашем исследовании мы выявили высокую частоту обнаружения волчаночных антикоагулянтов в плазме крови, что согласуется с опубли-

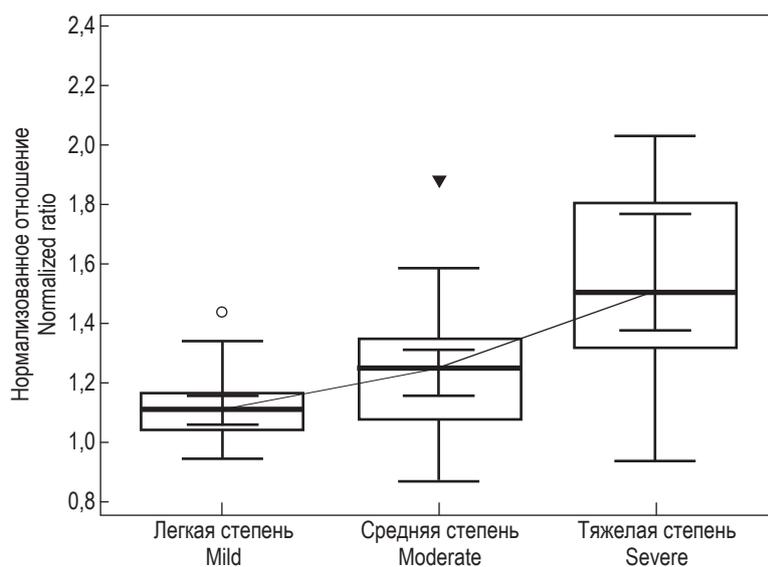


Рисунок 1. Эффект ВА в тесте с ядом гадюки Рассела у пациентов разной степени тяжести COVID-19 при первичном обследовании

Figure 1. Effect of LA in Russell's viper venom test in patients of various severity of COVID-19 at initial examination

**ТАБЛИЦА 1. ЧАСТОТА ВА У ПАЦИЕНТОВ РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ COVID-19 И ДИНАМИКА ЦИРКУЛИРОВАНИЯ ВА В ПОСТИНФЕКЦИОННОМ ПЕРИОДЕ**

TABLE 1. LA FREQUENCY IN PATIENTS OF VARYING SEVERITY OF COVID-19 AND DYNAMICS OF LA CIRCULATION IN THE POST-INFECTIOUS PERIOD

Степень тяжести Severity level	Первичное обследование Initial examination	Перед выпиской Before discharge	Через 1-2 месяца After 1-2 months	Через 7 месяцев After 7 months
легкая mild	4 (14,8%) n = 27	–	2 (8%) n = 25	0% n = 2
средняя moderate	27 (49,1%) n = 55	17 (39,5%) n = 43	2 (11,1%) n = 9	0% n = 2
тяжелая severe	19 (95%) n = 20	7 (58,3%) n = 12	–	0% n = 5

кованными ранее данными [2]. Helms J. и соавт. предположили, что образование ВА происходит ввиду повреждения и массовой гибели клеток. Вирус SARS-CoV-2 и провоспалительные цитокины являются причиной ремоделирования плазматической мембраны, включая экзоцитоз мембранных микрочастиц и экспозицию фосфолипидов, которые обычно скрыты от иммунных клеток [3]. Несмотря на то что связь между инфекциями и индукцией аутоантител давно известна [8], мы обнаружили зависимость частоты ВА от степени выраженности инфекционного процесса у пациентов с COVID-19. Кроме того, нами было впервые показано, что длительность циркулирования ВА в постинфекционном пери-

оде составляет не более 7 месяцев. Нерешенным остается вопрос о патогенетической роли ВА в развитии коагулопатии при COVID-19.

## Выводы

Инфекционный процесс, обусловленный вирусом SARS-CoV-2, является триггером повреждения клеток. Образование антифосфолипидных антител, включая ВА, спровоцировано нарушением целостности мембраны клеток и зависит от степени выраженности воспалительного процесса. В постинфекционном периоде наблюдается постепенное снижение количества циркулирующих ВА, через 7 месяцев происходит их полный регресс.

## Список литературы / References

1. Devreese K.M.J., Linskens E.A., Benoit D., Peperstraete H. Antiphospholipid antibodies in patients with COVID-19: a relevant observation? *J. Thromb. Haemost.*, 2020, Vol. 18, no. 9, pp. 2191-2201.
2. Harzallah I., Debliequis A., Drénou B. Lupus anticoagulant is frequent in patients with Covid-19. *J. Thromb. Haemost.*, 2020, Vol. 18, no. 8, pp. 2064-2065.
3. Helms J., Tacquard C., Severac F., Leonard-Lorant I., Ohana M., Delabranche X., Merdji H., Clere-Jehl R., Schenck M., Fagot Gandet F., Fafi-Kremer S., Castelain V., Schneider F., Grunebaum L., Anglés-Cano E., Sattler L., Mertes P.M., Meziani F.; CRICS TRIGGERSEP Group (Clinical Research in Intensive Care and Sepsis Trial Group for Global Evaluation and Research in Sepsis). High risk of thrombosis in patients with severe SARS-CoV-2 infection: a multicenter prospective cohort study. *Intensive Care Med.*, 2020, Vol. 46, no. 6, pp. 1089-1098.
4. Sayar Z., Moll R., Isenberg D., Cohen H. Thrombotic antiphospholipid syndrome: a practical guide to diagnosis and management. *Thromb. Res.*, 2021, no. 198, pp. 213-221.
5. Spihlman A.P., Gadi N., Wu S.C., Moulton V.R. COVID-19 and Systemic Lupus Erythematosus: Focus on Immune Response and Therapeutics. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 589474. doi: 10.3389/fimmu.2020.589474.
6. Tang N., Li D., Wang X., Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J. Thromb. Haemost.*, 2020, Vol. 18, no. 4, pp. 844-847.
7. Wahl D.G., Guillemin F., de Maistre E., Perret-Guillaume C., Lecompte T., Thibaut G. Meta-analysis of the risk of venous thrombosis in individuals with antiphospholipid antibodies without underlying autoimmune disease or previous thrombosis. *Lupus*. 1998, Vol. 7, no. 1, pp. 15-22.
8. Zuo Y., Estes S.K., Ali R.A., Gandhi A.A., Yalavarthi S., Shi H., Sule G., Gockman K., Madison J.A., Zuo M., Yadav V., Wang J., Woodard W., Lezak S.P., Lugogo N.L., Smith S.A., Morrissey J.H., Kanthi Y., Knight J.S. Prothrombotic autoantibodies in serum from patients hospitalized with COVID-19. *Sci. Transl. Med.*, 2020, Vol. 12, no. 570, eabd3876. doi: 10.1126/scitranslmed.abd3876.

**Авторы:**

**Безнощенко О.С.** — врач клинической лабораторной диагностики, младший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Шпилук М.А.** — научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Иванец Т.Ю.** — д.м.н., заведующая клинико-диагностической лабораторией ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Кречетова Л.В.** — д.м.н., заведующая лабораторией клинической иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Пырегов А.В.** — д.м.н., профессор, директор института анестезиологии-реаниматологии и трансфузиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Кодацкий Д.С.** — врач — анестезиолог-реаниматолог ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Тавлуева Е.В.** — д.м.н., заместитель главного врача по медицинской части ГБУЗ «Городская клиническая больница имени Ф.И. Иноземцева Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

**Мелкумян А.Р.** — к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики, заведующая центром лабораторной диагностики ГБУЗ «Городская клиническая больница имени Ф.И. Иноземцева Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

**Городнова Е.А.** — к.м.н., заведующая центром научных и клинических исследований ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Долгушина Н.В.** — д.м.н., профессор, заместитель директора, руководитель департамента организации научной деятельности ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Authors:**

**Beznozhchenko O.S.**, Doctor for Clinical Laboratory Diagnostics, Junior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

**Shpiluk M.A.**, Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

**Ivanets T.Yu.**, PhD, MD (Medicine), Head, Clinical Diagnostic Laboratory V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

**Krechetova L.V.**, PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Clinical Immunology, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

**Pyregov A.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Director of the Institute of Anesthesiology, Reanimatology and Transfusiology, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

**Kodatsky D.S.**, Anesthesiologist-Reanimatologist, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

**Tavluyeva E.V.**, PhD, MD (Medicine), Deputy Chief Physician for Medical Affairs, F. Inozemtsev City Clinical Hospital, Moscow, Russian Federation

**Melkumyan A.R.**, PhD (Medicine), Doctor for Clinical Laboratory Diagnostics, Head, Center of the Laboratory Diagnostics, F. Inozemtsev City Clinical Hospital, Moscow, Russian Federation

**Gorodnova E.A.**, PhD (Medicine), Head, Center for Scientific and Clinical Research, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

**Dolgushina N.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director, Head, Department of Organization of Scientific Activities, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Поступила 08.07.2021  
Принята к печати 20.07.2021

Received 08.07.2021  
Accepted 20.07.2021

## ГЛИКОЭРРЕЙ В ДИАГНОСТИКЕ И ТЕРАПИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ОРГАНОВ ЖЕНСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ

Шилова Н.В.<sup>1,2</sup>, Бовин Н.В.<sup>2</sup>, Нокель А.Ю.<sup>1,2</sup>, Зиганшина М.М.<sup>1</sup>,  
Хасбиуллина Н.Р.<sup>1</sup>, Вускович М.<sup>3</sup>, Хуфлейт М.Э.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова», Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>3</sup> Государственный университет Сан-Диего, Сан-Диего, США

<sup>4</sup> Медицинский колледж, Университет Вармия и Мазури, Ольштын, Польша

**Резюме.** Разработка эффективных способов предикции, диагностики и терапии органов женской репродуктивной системы является актуальной задачей. Большой интерес как в диагностическом, так и терапевтическом аспектах представляют естественные антигликановые антитела (АГАТ), т.к. АГАТ очень разнообразны, а их специфичность отобрана в ходе эволюции. В данной работе исследована возможность использования метода гликоэррея, а также сигнатурного подхода для предсказания эффективности проводимой терапии при раке молочной железы (РМЖ), а также целенаправленному поиску естественных антител с терапевтическим потенциалом.

Объектом исследования явилась сыворотка периферической крови условно здоровых доноров — женщин (n = 27) и пациентов с установленным диагнозом метастатический РМЖ перед началом проведения терапии (n = 29). Медианный возраст пациентов составил 48 лет. Медианный возраст здоровых составил 50 лет. Пациентки получали лечение сочетанной терапией доксирубицином и герцептином с разным исходом: 11 пациенток не ответили на лечение и 18 пациенток ответили (опухоль не диагностировалась). Для исследования АГАТ использовали гликоэррей, на котором напечатано более 200 различных гликанов. Связавшиеся с лигандами антитела детектировали с помощью Ig(G+M+A)-biot. Для поиска комбинации диагностически значимых АГАТ (сигнатуры) использовали разработанный ранее математический аппарат «Иммунорулер».

Исследована возможность использования гликоэррея для предсказания эффективности терапии на примере РМЖ. В исследование вошли пациентки, получавшие сочетанную терапию доксирубицином и герцептином, результат которой отслеживали по прошествии 18-24 недель. Оказалось, что сигнатура, состоящая из 10 АГАТ, с высокой чувствительностью и специфичностью (90 и 91% соответственно), позволяет предсказать эффективность назначенной терапии.

Подтверждена возможность диагностики РМЖ с использованием АГАТ. В уточненную сигнатуру вошло 5 антител: уровень двух АГАТ был значимо выше у пациентов, чем у доноров, и это, по-видимому, адаптивные антитела, появившиеся в ответ на возникшую патологию. Для трех других

### Адрес для переписки:

Шилова Надежда Владимировна  
ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»  
117997, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.  
Тел.: 8 (495) 336-02-55.  
E-mail: pumatnv@gmail.com

### Address for correspondence:

Shilova Nadezhda V.  
Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry  
117997, Russian Federation, Moscow,  
Miklukho-Maklay str., 16/10.  
Phone: 7 (495) 336-02-55.  
E-mail: pumatnv@gmail.com

### Образец цитирования:

Н.В. Шилова, Н.В. Бовин, А.Ю. Нокель, М.М. Зиганшина, Н.Р. Хасбиуллина, М. Вускович, М.Э. Хуфлейт «Гликоэррей в диагностике и терапии заболеваний органов женской репродуктивной системы» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 3. С. 419-424.  
doi: 10.46235/1028-7221-1039-GFD

© Шилова Н.В. и соавт., 2021

### For citation:

N.V. Shilova, N.V. Bovin, A.Yu. Nokel, M.M. Ziganshina, N.R. Khasbiullina, M. Vuskovic, M.E. Huflejt "Glycoarrays for diagnosis and therapy of the disorders of the female reproductive system", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 3, pp. 419-424.  
doi: 10.46235/1028-7221-1039-GFD

DOI: 10.46235/1028-7221-1039-GFD

антител сигналы у пациентов ниже, чем у здоровых индивидуумов, что может свидетельствовать об истощении гуморального звена иммунитета при развитии РМЖ. Т.е. такие АГАТ могут обладать терапевтическим потенциалом, и, благодаря использованию скрининговой технологии гликоэррея, их можно искать целенаправленно.

*Ключевые слова: органы женской репродуктивной системы, онкология, рак молочной железы, естественные антигликановые антитела, гликоэррей, сигнатура*

## GLYCOARRAYS FOR DIAGNOSIS AND THERAPY OF THE DISORDERS OF THE FEMALE REPRODUCTIVE SYSTEM

Shilova N.V.<sup>a,b</sup>, Bovin N.V.<sup>b</sup>, Nokel A.Yu.<sup>a,b</sup>, Ziganshina M.M.<sup>a</sup>, Khasbiullina N.R.<sup>a</sup>, Vuskovic M.<sup>c</sup>, Huflejt M.E.<sup>d</sup>

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

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

<sup>c</sup> San Diego State University, San Diego, USA

<sup>d</sup> Collegium Medicum, University of Warmia and Mazury, Olsztyn, Poland

**Abstract.** The development of effective methods for prediction, diagnostics and treatment of female reproductive disorders is an urgent task. Natural antiglycan antibodies (AGAT) are of great interest in both diagnostic and therapeutic aspects, since AGATs are very diverse, and their specificities were selected in the course of natural evolution. In this work, we investigated the possibility of using glycoarray technique, as well as the signature approach to predict effectiveness of therapy in breast cancer (BC), as well as a targeted search for natural antibodies with therapeutic potential.

We studied blood serum samples of apparently healthy female donors ( $n = 27$ ), and patients with established diagnosis of metastatic breast cancer prior to starting therapy ( $n = 29$ ). The median age of the patients was 48 years, 41% had “ER/PR+”-status, 59% – “ER/PR-”-status. The median age of healthy subjects was 50 years. The patients received combined therapy with doxorubicin and herceptin with different outcomes: 11 patients did not respond to treatment and 18 patients showed clinical response (the tumor was not revealed). For the study with AGAT, glycoarray was used, on which more than 200 different glycans were printed. The antibodies bound to the ligands were detected using biotinylated goat antibodies against human Ig (G+M+A). To search for a combination of diagnostically significant AGATs (signatures), the previously developed calculation tool “Immunoruler” was used.

An opportunity of using glycoarray to predict efficiency of therapy was studied in breast cancer patients. The study included patients receiving combination therapy with doxorubicin and herceptin, with clinical response monitored at 18-24 weeks. A signature consisting of 10 AGATs with high sensitivity and specificity (90 and 91%, respectively) proved to predict efficiency of the administered therapy.

The possibility of breast cancer diagnosis using AGAT has been further confirmed. The specified signature included five antibodies: the level of two AGATs was significantly higher in patients than in donors, which could be adaptive antibodies developed in response to emerging malignancy. For three other antibodies, the registered signals in patients were lower than in healthy controls, thus, probably, indicating depletion of humoral immunity during the development of breast cancer. Hence, such AGATs may have some therapeutic potential, and, by usage of glycoarray screening technology, they could be searched in purposeful manner.

*Keywords: female reproductive system, oncology, breast cancer, natural anti-glycan antibodies, glycoarray, signature*

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-04-00749.

### Введение

Для органов женской репродуктивной системы (ОЖРС) характерен широкий спектр заболева-

ний, включающий инфекционные и онкологические. Некоторые из них протекают бессимптомно, что часто приводит к трудно коррегируемым или необратимым последствиям – бесплодию, потере органа, но могут иметь и фатальный исход. Поэтому разработка эффективных способов

продикции, диагностики и терапии заболеваний ОЖРС является актуальной задачей. Особое внимание заслуживает появившийся в последние годы тренд к увеличению частоты встречаемости больших акушерских синдромов (в первую очередь преэклампсии) и онкологических заболеваний ОЖРС. Имеющиеся на сегодняшний день молекулярные маркеры не обладают достаточной чувствительностью и специфичностью для этих заболеваний, а терапевтические препараты обладают высокой токсичностью как для матери, так и для плода, что требует развития совершенно новых подходов как в диагностике, так и в терапии.

Большой интерес в этом аспекте представляют естественные антигликановые антитела (АГАТ). Это часть пула иммуноглобулинов, которые секретируются особой субпопуляцией В1-лимфоцитов (CD5<sup>+</sup>) без предварительной внешней стимуляции. Они участвуют в выведении патогенов через активацию системы комплемента, а также играют важную роль в надзоре за постоянно появляющимися трансформированными клетками. АГАТ очень разнообразны [2, 7]. Поскольку их специфичность отобрана в ходе эволюции, они представляют собой широчайший резервуар потенциальных маркеров для диагностики и прогностики различных заболеваний, в первую очередь для многофакторных патологий, к которым можно отнести аутоиммунные заболевания и большие акушерские синдромы, а также для онкологии, поскольку опухоли имеют неустойчивый геном и быстро меняющийся фенотип. АГАТ также имеют большой потенциал для использования в терапии, т.к. лечение препаратами иммуноглобулинов для внутривенного введения, которые содержат огромный набор естественных антител, уже давно применяется в медицинской практике, однако из всего пула специфичностей, которые присутствуют в этом препарате [15], лишь ограниченная часть оказывает реальный терапевтический эффект. Разработка подхода по целенаправленному поиску естественных антител с терапевтическим потенциалом позволила бы задействовать естественную защиту организма и использовать внутривенные иммуноглобулины более эффективно.

## Материалы и методы

Объектом исследования явилась сыворотка периферической крови условно здоровых доноров — женщин (n = 27) и пациентов с установленным диагнозом метастатический рак молочной железы (РМЖ) перед началом проведения терапии (n = 29). Медианный возраст пациентов составил 48 лет (диапазон 28-78), 41% имели статус ER/PR+, а 59% — ER/PR-. Медианный возраст здоровых составил 50 лет (диапазон 35-60). Далее эти пациентки получили лечение сочетанной

терапией доксирубицином и герцептином с разным исходом — 11 пациенток, у которых по прошествии 18-24 недель улучшений либо не было, либо опухоль по-прежнему диагностировалась, и 18 пациенток, у которых через 18-24 недели после начала терапии опухоль не диагностировалась.

Для исследования АГАТ использовали гликановый эррей (гликоэррей), представляющий собой подложку, на которой иммобилизовано от 200 до 400 гликанов — компонентов гликопротеинов, гликолипидов, фрагментов бактериальных полисахаридов и др. Связавшиеся с лигандами антитела детектировали с помощью биотинилированных вторичных антител козы, узнающих иммуноглобулины G, M и A, как описано в [16]. Гликоэррей позволяет фиксировать изменения в уровнях антител с высокой точностью, при этом сотни активностей могут быть протестированы с помощью одного чипа.

Для поиска комбинации диагностически значимых АГАТ (сигнатуры) по данным гликоэррея использовали разработанные ранее методологии и математический аппарат, названный «Иммунорулер» [16], с помощью которых можно дискриминировать «случаи» и «контроли», определять степень риска возникновения заболевания, а также прогнозировать его исход.

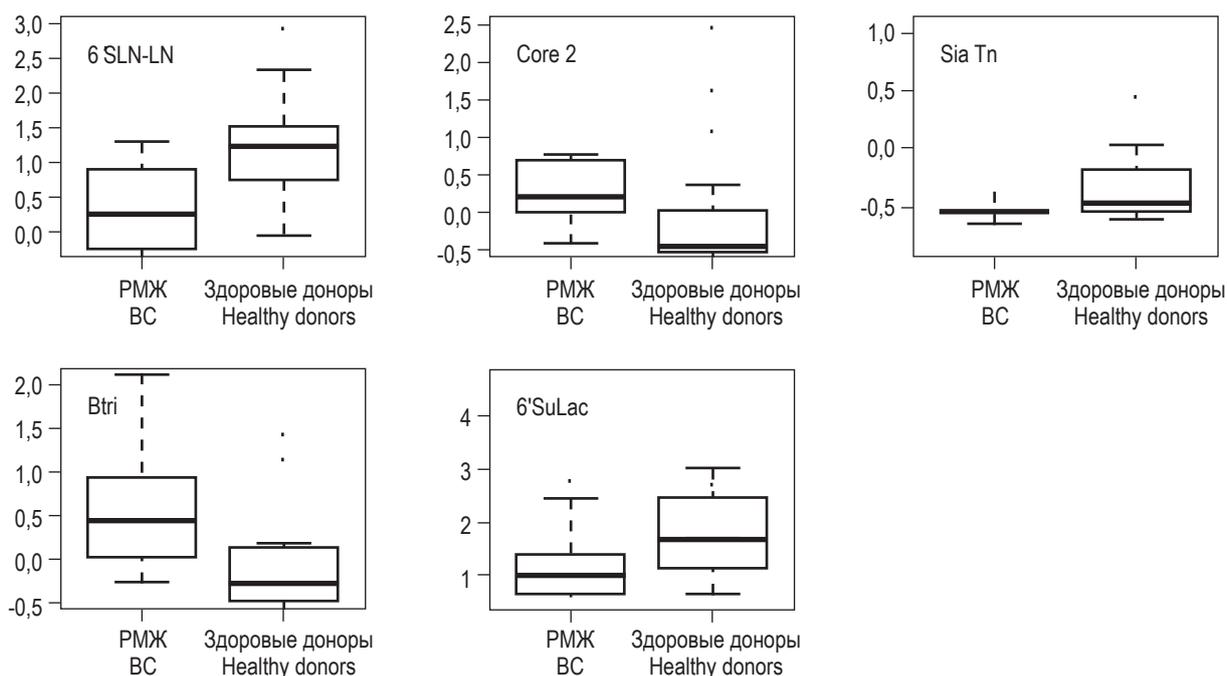
## Результаты и обсуждение

### Диагностика

В литературе описано множество заболеваний, при которых возникает аберрантное гликозилирование, что сопровождается изменениями в профилях АГАТ. Это характерно для онкологических [9, 11, 13], аутоиммунных заболеваний [5, 10, 17], а также осложненной беременности [13, 18]. Использование гликанового эррея и сигнатурного подхода уже позволило найти сигнатуры для таких видов рака ОЖРС, как рак молочной железы [3] и рак яичника [8]; при этом чувствительность и специфичность такого мультифакторного подхода заметно превышает показатели стандартных тестов [4, 8].

Нами была исследована возможность использования гликоэррея для предсказания эффективности терапии на примере РМЖ. В исследование вошли пациентки, получавшие сочетанную терапию химиотерапевтиком доксирубицином и герцептином, и результат которой отслеживали по прошествии 18-24 недель. Оказалось, что сигнатура, состоящая из 10 антигликановых антител, с высокой чувствительностью и специфичностью (90 и 91%, соответственно), позволяет предсказать эффективность назначенной терапии (рис. 1, см. 3-ю стр. обложки).

Эффективность сигнатурного подхода в диагностике была показана и для больших акушерских синдромов, таких как преэклампсия (ПЭ) и



**Рисунок 3. Боксплоты распределения сигналов в группах здоровых доноров и пациенток (PMЖ) для антител, вошедших в сигнатуру для рака молочной железы**

**Примечание. Специфичность АГАТ указана на боксплотах.**

Figure 3. Boxplots of signal distribution in groups of healthy donors and patients (BC) for antibodies included to signature for breast cancer

Note. Specificity of AGA is indicated on boxplots.

задержка роста плода (ЗРП), что позволяет дифференцировать пациенток с ПЭ и пациенток с ЗРП, а также пациенток с другими гипертензивными расстройствами во время беременности [1]. Особенностью этой работы является то, что для диагностики ПЭ и ЗРП проводили отдельное определение IgM и IgG (а не суммарно, как в других исследованиях), что позволило получить сигнатуры, содержащие иммуноглобулины обоих классов, что свидетельствует о вовлеченности антител обоих классов в патологический процесс.

#### Терапия

АГАТ, благодаря своим свойствам удалять трансформированные клетки, могут обладать и терапевтическим потенциалом, если их уровень понижен у пациентов с патологией по сравнению со здоровыми донорами. Однако поиск таких антител затруднен из-за большого разнообразия специфичностей. На сегодняшний день известно о нескольких АГАТ, которые снижены при патологии [6, 9, 11, 12], однако их специфичность в отношении антигенов опухоли была показана только для антител, направленных к дисахариду Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$  (LeC) на клетках линии рака молочной железы ZR-75-1 [14] и к углеводной

компоненте рецептора CD55 клеток рака желудка (точная мишень не установлена) [6]. Кроме того, недавние исследования, проведенные нашей группой, показали, что анти-LeC-антитела могут вызывать апоптоз клеток линии ZR-75-1 (клетки рака молочной железы человека), предположительно активируя внутренний путь (данные пока не опубликованы). Исследование, проведенное Turpitsyn и соавт. [14], выявило, что у 36% взятых в исследование пациенток антиген LeC экспрессировался клетками опухоли, а уровень анти-LeC в периферической крови был понижен, т.е. для более, чем трети женщин с PMЖ возможна разработка подхода, основанного на применении антителой терапии с использованием специфических анти-LeC-иммуноглобулинов. Однако описанные выше антитела были найдены больше по воле случая, чем целенаправленно.

Совместно с коллегами из компании Целлексикон (Ла Хойя, США) была получена уточненная сигнатура для рака молочной железы (анализировались данные по 56 индивидуумам), состоящая из пяти антигликановых антител (рис. 2, см. 3-ю стр. обложки).

Анализ антител, вошедших в эту сигнатуру, показал, что составляющие их АГАТ имеют разное содержание у пациенток по сравнению со здоровыми донорами (рис. 3).

Из рисунка 3 видно, что уровень двух АГАТ, вошедших в сигнатуру, значимо выше у пациентов, чем у доноров, и это, по-видимому, адаптивные антитела, появившиеся в ответ на возникшую патологию. Для трех антител сигналы у пациентов ниже, чем у здоровых индивидуумов, что может свидетельствовать об истощении гуморального звена иммунитета при развитии рака молочной железы. Т.е. такие АГАТ могут обладать терапев-

тическим потенциалом, и, благодаря использованию скрининговой технологии гликоэrray, их можно искать целенаправленно.

## Заключение

Гликоэrray становится инструментом, открывающим новые возможности в молекулярной диагностике сложных системных заболеваний, к которым, безусловно, относятся патологии ОЖРС, но также и инструментом поиска естественных антител, обладающих терапевтическим потенциалом.

## Список литературы / References

1. Зиганшина М.М., Шилова Н.В., Хасбиуллина Н.Р., Ракитко А.С., Тютюнник Н.В., Мантрова Д.А., Тютюнник В.Л., Бовин Н.В., Сухих Г.Т. Спектр и диагностическое значение антигликановых антител, выявляемых при развитии больших акушерских синдромов, связанных с дефектами плацентации // Российский аллергологический журнал, 2018. Т. 15. № 1. С. 37-39. [Ziganshina M.M., Shilova N.V., Khsbiullina N.R., Rakitko A.S., Tyutyunnik N.V., Mantrova D.A., Tyutyunnik V.L., Bovin N.V., Sukhikh G.T. Spectrum and diagnostic value of anti-glycan antibodies detected at big obstetrical syndrome development connected with defects of placentation. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergology Journal*, 2018, Vol. 15, no. 1, pp. 37-39. (In Russ.)]
2. Bovin N.V. Natural antibodies to glycans. *Biochemistry (Mosc.)*, 2013, Vol. 78, no. 7, pp. 786-797.
3. Bovin N.V., Huflejt M.E. Unlimited Glycochip. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 2008, Vol. 20, no. 115, pp. 245-258.
4. Butvilovskaya V.I., Popletaeva S.B., Chechetkin V.R., Zubtsova Z.I., Tsybul'skaya M.V., Samokhina L.O., Vinnitskii L.I., Ragimov A.A., Pozharitskaya E. I., Grigor'eva G.A., Meshalkina N.Y., Golysheva S.V., Shilova N.V., Bovin N.V., Zasedatelev A.S., Rubina A.Y. Multiplex determination of serological signatures in the sera of colorectal cancer patients using hydrogel biochips. *Cancer Med.*, 2016, Vol. 5, no. 7, pp. 1361-1372.
5. D'Alessandro M., Mariani P., Lomanto D., Bachetoni A., Speranza V. Alterations in serum anti- $\alpha$ -galactosyl antibodies in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Clin. Immunol.*, 2002, Vol. 103, no. 1, pp. 63-68.
6. Hensel F., Timmermann W., von Rahden B.H.A., Rosenwald A., Brandlein S., Illert B. Ten-year follow-up of a prospective trial for the targeted therapy of gastric cancer with the human monoclonal antibody PAT-SC1. *Oncol. Rep.*, 2014, Vol. 31, no. 3, pp. 1059-1066.
7. Huflejt M.E., Vuskovic M., Vasiliu D., Xu H., Obukhova P., Shilova N., Tuzikov A., Galanina O., Arun B., Lu K., Bovin N. Anti-carbohydrate antibodies of normal sera: findings, surprises and challenges. *Mol. Immunol.*, 2009, Vol. 46, no. 15, pp. 3037-3049.
8. Jacob F., Goldstein D.R., Bovin N.V., Pochechueva T., Spengler M., Caduff R., Fink D., Vuskovic M.I., Huflejt M.E., Heinzelmann-Schwarz V. Serum antiglycan antibody detection of nonmucinous ovarian cancers by using a printed glycan array. *Int. J. Cancer*, 2012, Vol. 130, no. 1, pp. 138-146.
9. Kurtenkov O. Profiling of naturally occurring antibodies to the thomsen-friedenreich antigen in health and cancer: the diversity and clinical potential. *Biomed Res. Int.*, 2020, Vol. 2020, pp. 1-12.
10. Maverakis E., Kim K., Shimoda M., Gershwin M.E., Patel F., Wilken R., Raychaudhuri S., Ruhaak L.R., Lebrilla C.B. Glycans in the immune system and the altered glycan theory of autoimmunity: a critical review. *J. Autoimmun.*, 2015, Vol. 57, pp. 1-13.
11. Smorodin E.P., Sergeyev B.L., Kurtenkov O.A. The Characterization of IgG Antibodies to GalNAc beta-terminated glycans of gastric cancer survivors. *Exp. Oncol.*, 2014, Vol. 36, no. 1, pp. 38-43.
12. Smorodin E., Sergeyev B., Klaamas K., Chuzmarov V., Kurtenkov O. The relation of the level of serum Anti-TF $\beta$ , -Tn and -Alpha-Gal IgG to survival in gastrointestinal cancer patients. *Int. J. Med. Sci.*, 2013, Vol. 10, no. 12, pp. 1674-1682.
13. Sukhikh G.T., Ziganshina M.M., Nizyaeva N.V., Kulikova G.V., Volkova J.S., Yarotskaya E.L., Kan N.E., Shchyogolev A.I., Tyutyunnik V.L. Differences of glycocalyx composition in the structural elements of placenta in preeclampsia. *Placenta*, 2016, Vol. 43, pp. 69-76.
14. Tupitsyn N.N., Udalova Y.A., Galanina O.E., Kadagidze Z.G., Borovkova N.B., Podolsky V.V., Shinkarev S.A., Gadetskaya N.A., Letyagin V.P., Obukhova P.S., Shilova N.V., Subbotina A.A., Bovin N.V. Tumor-associated glycan lewis c in breast cancer. *Immunol. Hemopoiesis*, 2009, Vol. 2, pp. 45-54.

15. von Gunten S., Smith D.F., Cummings R.D., Riedel S., Miescher S., Schaub A., Hamilton R.G., Bochner B.S. Intravenous immunoglobulin contains a broad repertoire of anticarbohydrate antibodies that is not restricted to the IgG2 subclass. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2009, Vol. 123, no. 6, pp. 1268-1276.
16. Vuskovic M.I., Xu H., Bovin N.V., Pass H.I., Huflejt M.E. Processing and analysis of serum antibody binding signals from printed glycan arrays for diagnostic and prognostic applications. *Int. J. Bioinform. Res. Appl.*, 2011, Vol. 7, no. 4, pp. 402-426.
17. Willison H.J. Glycoconjugates and neuroimmunological diseases. *Adv. Neurobiol.*, 2014, Vol. 9, pp. 543-566.
18. Ziganshina M.M., Pavlovich S.V., Bovin N.V., Sukhikh G.T. Hyaluronic acid in vascular and immune homeostasis during normal pregnancy and preeclampsia. *Acta Naturae*, 2016, Vol. 8, no. 3, pp. 59-71.

---

**Авторы:**

**Шилова Н.В.** — к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова»; старший научный сотрудник лаборатории химии углеводов ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

**Бовин Н.В.** — д.х.н., профессор, руководитель лаборатории химии углеводов ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

**Нокель А.Ю.** — к.х.н., научный сотрудник ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова»; научный сотрудник ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

**Зиганшина М.М.** — к.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова», Москва, Россия

**Хасбиуллина Н.Р.** — к.б.н., научный сотрудник ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова», Москва, Россия

**Вускович Марко** — профессор, ведущий сотрудник департамента компьютерных наук, Государственный университет Сан-Диего, Сан-Диего, США

**Хуфлейт Маргарет Элизабет** — к.б.н., научный сотрудник департамента общественного здоровья, факультет наук о здоровье, Медицинский колледж, Университет Вармия и Мазури, Ольштын, Польша

---

**Authors:**

**Shilova N.V.**, PhD (Chemistry), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology; Senior Research Associate, Laboratory of Carbohydrate Chemistry, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Bovin N.V.**, PhD, MD (Chemistry), Professor, Head, Laboratory of Carbohydrate Chemistry, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Biochemistry, Moscow, Russian Federation

**Nokel A.Yu.**, PhD (Chemistry), Research Associate, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology; Research Associate, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Biochemistry, Moscow, Russian Federation

**Ziganshina M.M.**, PhD (Biology), Leading Research Associate, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

**Khasbiullina N.R.**, PhD (Biology), Research Associate, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

**Vuskovic Marko**, Professor, Leading Research Associate, Department of Computer Science, San Diego State University, San Diego, USA

**Huflejt Margaret Elisabeth**, PhD (Biology), Research Associate, Department of Public Health, Faculty of Health Sciences, Collegium Medicum, University of Warmia and Mazury, Olsztyn, Poland

## ИСХОДЫ ПРОГРАММ ВРТ НА ФОНЕ ВНУТРИМАТОЧНОГО ВВЕДЕНИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК У ЖЕНЩИН С ПОВТОРНЫМИ НЕУДАЧАМИ ИМПЛАНТАЦИИ

Вторушина В.В., Перминова С.Г., Кречетова Л.В.

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

**Резюме.** Частота повторных неудач имплантации (repeated implantation failure-RIF) в программах вспомогательных репродуктивных технологий продолжает оставаться высокой и достигает 50-75%. Одним из методов иммунокоррекции при повторных неудачах имплантации является внутриматочное введение аутологичных моноклеарных клеток перед переносом эмбриона в программах вспомогательных репродуктивных технологий. Прямое влияние моноклеарных клеток на имплантацию впервые изучили в 2006 году и показали, что внутриматочное введение аутологичных моноклеарных клеток значительно повышало частоту имплантации, частоту клинической беременности и частоту родов у пациенток с повторными неудачами имплантации в анамнезе.

Целью данного исследования явилась оценка влияния внутриматочного введения аутологичных моноклеарных клеток периферической крови перед переносом эмбриона на исходы программ вспомогательных репродуктивных технологий у женщин с повторными неудачами имплантации в анамнезе и анализ цитокинового профиля супернатантов вводимых культур моноклеарных клеток периферической крови.

В исследование включены 129 женщин с повторными неудачами имплантации в программах вспомогательных репродуктивных технологий, случайно разделенных на три группы с внутриматочным введением перед переносом эмбриона в стимулированном цикле и в криоцикле: 1-я группа – моноклеарных клеток, активированных хорионическим гонадотропином человека, 2-я группа – моноклеарных клеток без активации хорионическим гонадотропином человека, 3-я группа – физиологического раствора (плацебо).

Клинико-анамнестические данные женщин всех трех групп не различались. Возраст женщин всех трех групп достоверно не различался. Число повторных неудач имплантации в анамнезе было сопоставимо в 3 группах. Анализ эмбриологических показателей также продемонстрировал отсутствие существенных различий в количестве перенесенных эмбрионов, в том числе хорошего качества.

В супернатантах активированных хорионическим гонадотропином человека моноклеарных клеток пациенток с наступившей имплантацией в криоцикле выявлены более высокие уровни IL-2 ( $p = 0,006$ ), IL-4 ( $p = 0,012$ ), IL-5 ( $p = 0,012$ ), IL-12p70 ( $p = 0,011$ ), IFN $\gamma$  ( $p = 0,012$ ), GM-CSF ( $p = 0,026$ ), TNF $\alpha$  ( $p = 0,021$ ), чем в супернатантах неактивированных моноклеарных клеток. Ча-

### Адрес для переписки:

Вторушина Валентина Валентиновна  
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский  
центр акушерства, гинекологии и перинатологии  
имени академика В.И. Кулакова» Министерства  
здравоохранения РФ  
117997, Россия, Москва, ул. Акад. Опарина, 4.  
Тел.: 8 (495) 438-11-83.  
E-mail: vtorushina@inbox.ru

### Address for correspondence:

Vtorushina Valentina V.  
V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics,  
Gynecology and Perinatology  
117997, Russian Federation, Moscow, Acad. Oparin str., 4.  
Phone: 7 (495) 438-11-83.  
E-mail: vtorushina@inbox.ru

### Образец цитирования:

В.В. Вторушина, С.Г. Перминова, Л.В. Кречетова  
«Исходы программ ВРТ на фоне внутриматочного  
введения аутологичных моноклеарных клеток у  
женщин с повторными неудачами имплантации»  
// Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24,  
№ 3. С. 425-434. doi: 10.46235/1028-7221-1050-001  
© Вторушина В.В. и соавт., 2021

### For citation:

V.V. Vtorushina, S.G. Perminova, L.V. Krechetova "Outcomes  
of IVF programs with intrauterine administration of autologous  
mononuclear cells in women with repeated implantation  
failure", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy  
Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 3, pp. 425-434.  
doi: 10.46235/1028-7221-1050-001  
DOI: 10.46235/1028-7221-1050-001

стота имплантации и частота наступления клинической беременности были значимо выше в группах при проведении внутриматочного введения аутологичных моноклеарных клеток как в стимулированном цикле, так и в криоцикле по сравнению с группами плацебо.

Цитокиновый профиль супернатантов культур моноклеарных клеток при внутриматочном введении влияет на эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий у женщин с повторными неудачами имплантации в анамнезе.

Полученные данные могут позволить персонализированный подход для использования различных видов иммунотерапии в программах вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с повторными неудачами имплантации в анамнезе.

*Ключевые слова:* повторные неудачи имплантации, внутриматочное введение, аутологичные моноклеарные клетки периферической крови, иммунотерапия, хорионический гонадотропин человека, цитокины

## OUTCOMES OF IVF PROGRAMS WITH INTRAUTERINE ADMINISTRATION OF AUTOLOGOUS MONONUCLEAR CELLS IN WOMEN WITH REPEATED IMPLANTATION FAILURE

Vtorushina V.V., Perminova S.G., Krechetova L.V.

*V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation*

**Abstract.** Frequency of the repeated implantation failure (RIF) in assisted reproductive technology programs remains to be high, reaching 50–75%. Intrauterine administration of autologous mononuclear cells before embryo transfer is a technique for the RIF immunocorrection being used in assisted reproductive technology programs. Direct effect of mononuclear cells upon implantation was first studied in 2006 and showed that intrauterine administration of autologous mononuclear cells prior to embryo transfer proved to significantly increase implantation frequency, as well as incidence of clinical pregnancy, and frequency of delivery in the patients with a history of RIF. The aim of this study was to evaluate the effect of intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells prior to embryo transfer upon the results of assisted reproductive technology programs in women with a history of RIF, and to evaluate cytokine profile of the supernates from the injected cultures of peripheral blood mononuclear cells.

The study included 129 women with RIF included into the assisted reproductive technology programs. The patients were divided into three groups with intrauterine administration before embryo transfer in a stimulated cycle and in a cryocycle: group 1, treated with mononuclear cells activated by human chorionic gonadotropin; group 2, with mononuclear cells without activation by human chorionic gonadotropin; group 3 who received saline solution (placebo). Clinical and anamnestic data of the women from these groups did not differ. The age of women in all three groups was also similar. The number of RIFs in their anamnesis was comparable for the 3 groups. Analysis of the embryological parameters also showed that there were no significant differences in the number of transferred embryos, including those of good quality.

The levels of IL-2 ( $p = 0.006$ ), IL-4 ( $p = 0.012$ ), IL-5 ( $p = 0.012$ ), IL-12p70 ( $p = 0.011$ ), IFN $\gamma$  ( $p = 0.012$ ), GM-CSF ( $p = 0.026$ ), and TNF $\alpha$  ( $p = 0.021$ ) were found to be higher in the supernatants of human chorionic gonadotropin-activated mononuclear cells of women with advanced cryocycle implantation, than in supernatants of inactivated chorionic gonadotropin mononuclear cells. Frequencies of implantation and clinical pregnancy were significantly higher in the groups with intrauterine administration of autologous mononuclear cells, both in stimulated cycle and the cryocycle compared to the placebo groups.

The cytokine profile of the mononuclear cell culture supernates upon intrauterine administration affects the efficiency of assisted reproductive technology programs in the women with RIF. Hence, the data obtained may allow us to develop a personalized approach to usage of various immunotherapies in assisted reproductive technology programs for the patients with a history of repeated implantation failure.

*Keywords:* repeated implantation failure, intrauterine administration, autologous mononuclear cells, immunotherapy, human chorionic gonadotropin, cytokines

## Введение

Повторные неудачи имплантации в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) – актуальная проблема, изучению которой посвящено значительное количество исследований. Несмотря на достаточно высокие современные достижения в сфере вспомогательных репродуктивных технологий, частота повторных неудач имплантации в программах ВРТ остается по-прежнему высокой и составляет 50-75% [14]. Большинство аспектов иммунного взаимодействия матери и эмбриона до сих пор остаются неуточненными, несмотря на то, что последние работы в области молекулярной биологии позволили определить некоторые иммунологические параметры, определяющие иммунные взаимоотношения между матерью и эмбрионом во время имплантации. В прежних работах считалось, что наступление и прогрессирование беременности связано с преобладанием Th2 профилем цитокинов (LIF, IL-1, IL-8, IL-11, IL-4 и IL-10), а преобладание Th1-цитокинов (IFN $\gamma$ , IL-2 и TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6) неблагоприятно для наступления беременности [7, 11]. Однако позднее появились данные о том, что мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови индуцируют выработку ряда цитокинов, таких как IL-1 $\alpha$ , IL-1 и TNF $\alpha$ , позитивно влияющих на рецептивность эндометрия [13]. Это стало предпосылкой использования внутриматочного введения аутологичных МНК перед переносом эмбриона в программах ВРТ при повторных неудачах имплантации в анамнезе. Роль МНК в обеспечении рецептивности эндометрия обсуждается с 1997 года, когда было показано, что клетки селезенки беременных мышей могут влиять на рецептивность эндометрия [10], а МНК, введенные внутриматочно перед переносом эмбриона, повышают вероятность имплантации [5]. Также было установлено, что МНК периферической крови, полученные у женщин на ранних сроках гестации, могут индуцировать продукцию прогестерона [6] и усиливать инвазию трофобласта эмбрионов мышей *in vitro* [4]. В 2006 году показали, что внутриматочное введение аутологичных МНК, которые культивировали с хорионическим гонадотропином человека (ХГч) в течение 48 часов, перед переносом эмбрионов, значительно повышало частоту имплантации, частоту наступления беременности и частоту родов у женщин с повторными неудачами имплантации в программах ВРТ [7, 11]. Однако в исследовании Santiba ez не было выявлено позитивного эффекта внутриматочного введения аутологичных МНК перед

переносом эмбриона на исходы программ ВРТ у женщин с повторными неудачами имплантации в анамнезе [9]. Позднее было показано, что внутриматочное введение МНК повышает частоту имплантации при переносе размороженных эмбрионов в программах ВРТ, как на фоне подготовки эндометрия препаратами эстрогенов и прогестерона, так и в естественном цикле у женщин, имеющих несколько неудач имплантации в анамнезе [12].

**Целью данного исследования** явилась оценка исходов программ ВРТ на фоне внутриматочного введения аутологичных МНК периферической крови перед переносом эмбриона у женщин с повторными неудачами имплантации в анамнезе и анализ цитокинового профиля супернатантов вводимых культур МНК.

## Материалы и методы

Проведено рандомизированное контролируемое исследование 129 женщин с повторными неудачами имплантации в анамнезе, обратившихся для проведения программ ВРТ и подписавших добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Женщины путем простой рандомизации были разделены на 3 группы, в зависимости от вида проводимой иммунотерапии: группа 1 – 42 женщины которым перед переносом эмбриона проводилось внутриматочное введение аутологичных МНК, активированных ХГч (АМНК), группа 2 – 42 женщины, которым проводилось внутриматочное введение аутологичных МНК без активации ХГч (МНК), группа 3 (плацебо) – 45 женщин, которым проводилось внутриматочное введение физиологического раствора.

В зависимости от различного вида программы ВРТ – стандартный фиксированный протокол с антагонистом гонадотропин-рилизинг гормона и препаратами рекомбинатного фолликулостимулирующего гормона (стимулированный цикл) или криоцикл – были выделены подгруппы в каждой из трех групп: подгруппа 1а – 17 женщин, которым внутриматочно вводили АМНК в стимулированном цикле, подгруппа 1б – 25 женщин, которым внутриматочно вводили АМНК в криоцикле; подгруппа 2а – 21 женщина, которым внутриматочно вводили МНК в стимулированном цикле, подгруппа 2б – 21 женщина, которым внутриматочно вводили МНК в криоцикле; подгруппа 3а – 22 женщины группы плацебо в стимулированном цикле и подгруппа 3б – 23 женщины группы плацебо в криоцикле. Всего в программах ВРТ участвовали 60 женщин в стимулированном цикле и 69 женщин – в криоцикле [1].

Перед проведением программы ВРТ пациенткам проводили полное клинико-лабораторное обследование в соответствии с Приказом МЗ РФ от 30 августа 2012 г. № 107н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению».

Возраст женщин был не старше 37 лет, отсутствие имплантации наблюдалось как минимум в 3 программах ВРТ при условии переноса эмбрионов хорошего качества.

Из исследования исключались супружеские пары у которых наблюдались: хромосомные аномалии, выраженная патозооспермия у мужчины, верифицированный хронический эндометрит, толщина эндометрия менее 7 мм, врожденные пороки развития половых органов, миома матки с узлами более 3 см, наружный генитальный эндометриоз III-IV степени, гидросальпинкс, «бедный ответ» яичников на гонадотропную стимуляцию.

Всем пациенткам с учетом повторных неудач имплантации в программах ВРТ оплодотворение выполнялось методом интраплазматической инъекции сперматозоидов (ICSI). Количество переносимых эмбрионов не превышало двух. В стимулированном цикле перенос эмбрионов в полость матки производили на 5-е сутки культивирования. В криоцикле перенос размороженных после витрификации эмбрионов на стадии бластоцисты в полость матки выполняли на 5-е сутки от начала приема препаратов микронизированного прогестерона. Перед переносом эмбриона в полость матки вводили фракцию аутологичных МНК периферической крови. Забор крови для получения МНК у всех исследуемых женщин осуществляли в стерильные вакутейнеры Monovette LH/9мл, SARSTEDT общим объемом 18 мл, содержащие в качестве антикоагулянта гепарин [1].

Методика выделения и внутриматочного введения МНК осуществлялась в соответствии с протоколом «Проведение иммунотерапии с помощью внутриматочного введения аутологичных мононуклеарных клеток», утвержденным на Ученом совете ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» МЗ РФ (протокол № 19 от 22.12.2015 г.) [1].

Процедуру выделения МНК проводили в стерильных условиях в ламинарном шкафу, оснащенном необходимым оборудованием. Периферическую кровь тщательно перемешивали, разводили в стерильном физиологическом растворе в соотношении 1:2 и выделяли МНК на градиенте фиколл-пак с плотностью 1,077. После центрифугирования в течение 30 минут

при 1500 об/мин отбирали кольцо, содержащее МНК, и переносили в другую пробирку для отмывания культуральной средой (RPMI-1640 с добавлением L-глутамин) путем центрифугирования в течение 10 минут при 1500 об/мин. Процедуру отмывки повторяли 3 раза. В полученной взвеси определяли количество клеток путем визуального подсчета в камере Горяева. Окончательная концентрация МНК составляла не менее 2025 млн в 1 мл. Взвесь МНК в 1 мл культуральной среды инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С в присутствии ХГч (10 мкл препарата «Прегнил» 500 МЕ/мл на  $1 \times 10^6$  клеток) в течение 48 часов или без ХГч. Через 48 часов инкубирования МНК ресуспендировали и в объеме 200 мкл в стерильной пробирке передавали для внутриматочного введения [1].

Полученные сразу после отбора из культивируемых плашек и после центрифугирования образцы избыточного бесклеточного объема супернатанта замораживали и хранили до анализа при -80 °С.

Эффективность программы ВРТ оценивали путем исследования концентрации ХГч в сыворотке крови через 12-14 дней после переноса эмбриона. При значениях ХГч  $\geq 20$  МЕ/л констатировали положительный результат. При условии положительного ХГч осуществляли ультразвуковое исследование через 21 день после переноса эмбриона. Частоту имплантации оценивали как отношение числа перенесенных эмбрионов к числу плодных яиц по данным УЗИ. Клиническую беременность диагностировали при наличии живого эмбриона по данным УЗИ через 4-5 недель после переноса эмбриона [1].

Определение концентрации цитокинов в супернатантах клеточных культур проводилось мультиплексным методом с использованием стандартной 9-плексной тест-системы Bio-Plex Pro Human Cytokine Th1/Th2 Assay (Bio-Rad, США) для определения GM-CSF, IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70, IL-13, TNF $\alpha$  на проточном иммуноанализаторе Bio-Plex 200 (Bio-Rad, США) и последующей обработкой полученных результатов с использованием приложения Bio-Plex Manager 6,0 Properties (Bio-Rad, США).

Для статистической обработки результатов исследования использовался Statistical Package for Social Sciences (SPSS v. 21.0). Для каждого количественного параметра были определены: среднее значение (M), ошибка среднего (m) в случае нормального распределения признака, медиана (Me) и интерквартильный размах (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>) – в случае отклонения распределения признака от нормального, для качественных данных – часто-

ты (%). Оценку характера распределения параметра осуществляли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения частот встречаемости признаков в анализируемых группах использовали критерий  $\chi^2$  с поправкой на непрерывность. Значимыми считали различия при  $p \leq 0,05$ . При попарном сравнении трех групп использовали t-критерий Стьюдента (при нормальном распределении признака) и Манна–Уитни (при отклонении распределения от нормального) с применением поправки Бонферони, и отклонения считались значимыми при  $p \leq 0,017$ .

## Результаты и обсуждение

Клинико-анамнестические данные женщин всех трех групп не различались. Возраст женщин (Me ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ )) 1-й группы составил 34 (30–35) лет, 2-й группы – 32 (30–35) лет, 3-й группы – 34 (31–36). Число неэффективных программ ВРТ в анамнезе было сопоставимо в 3 группах. Анализ эмбриологических показателей также продемонстрировал отсутствие существенных различий в количестве перенесенных эмбрионов, в том числе хорошего качества.

Сравнительная оценка исходов программ ВРТ при внутриматочном введении аутологичных МНК, как активированных ХГч (АМНК), так и без активации (МНК) перед переносом эмбриона в стимулированном цикле и криоцикле у женщин с повторными неудачами имплантации представлена в таблице 1.

Как следует из данных таблицы 1, в стимулированном цикле эффективность программ ВРТ при внутриматочном введении МНК, как активированных ХГч, так и без активации ХГч, была существенно выше по сравнению с группой плацебо, о чем свидетельствует более высокая частота биохимической беременности, клинической беременности, частота имплантации, частота прогрессирующей беременности и частота родов. Вместе с тем, в стимулированном цикле существенных различий в частоте анализируемых показателей у пациенток с иммунотерапией МНК в зависимости от активации ХГч не выявлено.

Анализ исходов криоциклов при использовании иммунотерапии также выявил позитивное влияние данной методики, о чем свидетельствуют существенно более высокие частота биохимической беременности, частота имплантации, частота наступления клинической беременности, частота прогрессирующей беременности и частота родов в сравнении с аналогичными показателями в группе плацебо. В криоциклах также отсутствовали различия в частоте анализируемых

показателей в зависимости от наличия или отсутствия активации МНК ХГч.

Цитокиновый профиль супернатантов культур МНК был проанализирован у женщин, получивших иммунотерапию как в стимулированном цикле, так и в криоцикле: при эффективных исходах в стимулированном цикле  $n_{\text{АМНК}} = 9$  и  $n_{\text{МНК}} = 6$ , в криоцикле –  $n_{\text{АМНК}} = 10$ ,  $n_{\text{МНК}} = 8$ , при неэффективных исходах в стимулированном цикле –  $n_{\text{АМНК}} = 7$ ,  $n_{\text{МНК}} = 5$  и в криоцикле  $n_{\text{АМНК}} = 10$ ,  $n_{\text{МНК}} = 5$  соответственно.

Не выявлено различий в цитокиновом профиле супернатантов культур МНК в каждом из типов циклов независимо от исходов программ ВРТ. Также не выявлено различий в цитокиновом профиле супернатантов культур вводимых клеток при обоих типах цикла, в зависимости от исхода настоящей программы ВРТ. Не выявлено различий в цитокиновом профиле супернатантов АМНК и МНК у женщин и в стимулированном цикле и в криоцикле при неэффективных исходах, а также при эффективных исходах у женщин в стимулированном цикле.

При эффективных исходах в криоциклах с использованием АМНК по сравнению с использованием МНК в цитокиновом профиле супернатантов были выявлены значимые различия (табл. 2).

Полученные результаты свидетельствуют, что при успешной имплантации в криоцикле супернатанты АМНК характеризуются более высоким уровнем провоспалительных цитокинов (IL-2, IL-5, IL-12p70, GM-CSF, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ), а также противовоспалительного IL-4.

В таблице 3 представлен цитокиновый профиль супернатантов клеток женщин с наступившей имплантацией в обоих типах циклов с использованием АМНК при внутриматочном введении.

Анализ данных в таблице 3 показывает, что в супернатантах АМПК у женщин с наступившей имплантацией в криоцикле выше уровень GM-CSF, IL-2 и TNF $\alpha$ , чем в супернатантах АМПК женщин в стимулированном цикле.

Таким образом, исследование цитокинового профиля супернатантов, вводимых вместе с суспензией аутологичных мононуклеарных клеток, стимулированных ХГч, показало, что в случае применения криоцикла супернатанты характеризуются более высоким уровнем провоспалительных цитокинов, которые, возможно, и способствуют успешной имплантации.

В литературе существует много противоречивых данных в отношении значимости различных иммунологических исследований и различных

**ТАБЛИЦА 1. ИСХОДЫ ПРОГРАММ ВРТ ПРИ ВНУТРИМАТОЧНОМ ВВЕДЕНИИ АУТОЛОГИЧНЫХ МНК В СТИМУЛИРОВАННОМ ЦИКЛЕ И КРИОЦИКЛЕ У ЖЕНЩИН С ПОВТОРНЫМИ НЕУДАЧАМИ ИМПЛАНТАЦИИ**

TABLE 1. OUTCOMES OF IVF PROGRAMS FOR INTRAUTERINE ADMINISTRATION OF AUTOLOGOUS MNC IN THE STIMULATED CYCLE AND CRYOCYCLE IN WOMEN WITH REPEATED IMPLANTATION FAILURE

Исходы программ ВРТ Outcomes of IVF programs	Группа АМНК Group AMNC	Группа МНК Group MNC	Группа плацебо Group placebo	Сравнение исходов в группах Comparison of outcomes in groups
<b>стимулированный цикл / stimulated cycle</b>				
Параметры Parameters	Подгруппа 1а Subgroup 1a n = 17	Подгруппа 2а Subgroup 2a n = 21	Подгруппа 3а Subgroup 3a n = 22	р-значение p-value
Биохимическая беременность Biochemical pregnancy	6 (35,3%)	7 (33,3%)	4 (18,2%)	p <sub>1-2</sub> = 0,988 p <sub>2-3</sub> = 0,006 p <sub>3-1</sub> = 0,034
Клиническая беременность Clinical pregnancy	5 (29,4%)	5 (23,8%)	3 (13,7%)	p <sub>1-2</sub> = 0,956 p <sub>2-3</sub> = 0,035 p <sub>3-1</sub> = 0,009
Имплантация Implantation	33,3%	28,6%	7,7%	p <sub>1-2</sub> = 0,873 p <sub>2-3</sub> = 0,010 p <sub>3-1</sub> = 0,001
Самопроизвольный выкидыш Spontaneous miscarriage	2 (11,8%)	2 (9,5%)	1 (4,5%)	p <sub>1-2</sub> = 0,873 p <sub>2-3</sub> = 0,165 p <sub>3-1</sub> = 0,324
Прогрессирующая беременность Progressive pregnancy	3 (17,6%)	3 (14,3%)	2 (9%)	p <sub>1-2</sub> = 0,435 p <sub>2-3</sub> = 0,011 p <sub>3-1</sub> = 0,025
Роды живым плодом Live birth	3 (17,6%)	3 (14,3%)	2 (9%)	p <sub>1-2</sub> = 0,367 p <sub>2-3</sub> = 0,035 p <sub>3-1</sub> = 0,024
<b>криоцикл / cryocycle</b>				
Параметры Parameters	Подгруппа 1б Subgroup 1b n = 25	Подгруппа 2б Subgroup 2b n = 21	Подгруппа 3б Subgroup 3b n = 23	р-значение p-value
Биохимическая беременность Biochemical pregnancy	10 (40%)	8 (38,1%)	6 (25%)	p <sub>1-2</sub> = 0,097 p <sub>2-3</sub> = 0,006 p <sub>3-1</sub> = 0,001
Клиническая беременность Clinical pregnancy	8 (36%)	7 (33,3%)	5 (20,8%)	p <sub>1-2</sub> = 0,095 p <sub>2-3</sub> = 0,025 p <sub>3-1</sub> = 0,005
Имплантация Implantation	35,4%	30,3%	9,8%	p <sub>1-2</sub> = 0,084 p <sub>2-3</sub> = 0,026 p <sub>3-1</sub> = 0,034
Самопроизвольный выкидыш Spontaneous miscarriage	1 (4%)	1 (4,8%)	1 (4,3%)	p <sub>1-2</sub> = 0,073 p <sub>2-3</sub> = 0,416 p <sub>3-1</sub> = 0,878
Прогрессирующая беременность Progressive pregnancy	7 (28%)	6 (28,6%)	4 (17,4%)	p <sub>1-2</sub> = 0,134 p <sub>2-3</sub> = 0,017 p <sub>3-1</sub> = 0,032
Роды живым плодом Live birth	7 (28%)	6 (28,6%)	2 (8,7%)	p <sub>1-2</sub> = 0,134 p <sub>2-3</sub> = 0,024 p <sub>3-1</sub> = 0,033

**ТАБЛИЦА 2. ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ СУПЕРНАТАНТОВ АМНК И МНК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЖЕНЩИН ПРИ ЭФФЕКТИВНОМ ИСХОДЕ ДАННОЙ ПРОГРАММЫ ВРТ В КРИОЦИКЛЕ, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 2. CYTOKINE PROFILE OF THE AMNC AND MNC SUPERNATANTS IN THE PERIPHERAL BLOOD OF WOMEN WITH AN EFFECTIVE OUTCOME OF THIS CRYOCYCLE IVF PROGRAM, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

Цитокин Cytokine	Концентрация цитокина / Cytokine concentration	
	МНК / MNC (n = 8)	АМНК / AMNC (n = 10)
<b>IL-2 (пг/мл)</b> IL-2 (pg/ml)	15,4 (10,9-19,1)	60,1 (46,6-110,4) p = 0,0002 *
<b>IL-4 (фг/мл)</b> IL-4 (f/ml)	170 (140-235)	530 (333-958) p = 0,012*
<b>IL-5 (пг/мл)</b> IL-5 (pg/ml)	1,8 (1,5-2,2)	3,7 (2,7-13,2) p = 0,012*
<b>IL-10 (пг/мл)</b> IL-10 (pg/ml)	24,4 (17,7-47,1)	102,2 (26,1-239,8)
<b>IL-12p70 (пг/мл)</b> IL-12p70 (pg/ml)	0,6 (0,5-0,6)	0,9 (0,7-1,3) p = 0,011*
<b>IL-13 (пг/мл)</b> IL-13 (pg/ml)	0,7 (0,4-0,9)	2,1 (0,7-2,9)
<b>GM-CSF (пг/мл)</b> GM-CSF (pg/ml)	0,9 (0,5-2,2)	20,4 (8-163) p = 0,006*
<b>IFN<math>\gamma</math> (пг/мл)</b> IFN $\gamma$ (pg/ml)	0,6 (0,5-0,6)	1,1 (0,8-2,0) p = 0,012*
<b>TNF<math>\alpha</math> (пг/мл)</b> TNF $\alpha$ (pg/ml)	800 (390-1216)	4622 (2055-5873) p = 0,002*

Примечание. \* – различия со значениями в подгруппе АМНК значимы p ≤ 0,05 (критерий Манна–Уитни).  
 Note. \*, differences with the values in the AMNC subgroup are significant p ≤ 0.05 (Mann–Whitney test).

**ТАБЛИЦА 3. ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ СУПЕРНАТАНТОВ АМНК У ЖЕНЩИН С ЭФФЕКТИВНЫМ ИСХОДОМ ДАННОЙ ПРОГРАММЫ ВРТ В СТИМУЛИРОВАННОМ ЦИКЛЕ И КРИОЦИКЛЕ, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 3. CYTOKINE PROFILE OF AMNC SUPERNATANTS IN WOMEN WITH AN EFFECTIVE OUTCOME OF THIS IVF PROGRAM IN THE STIMULATED CYCLE AND CRYOCYCLE, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

Цитокин Cytokine	Концентрация цитокина / Cytokine concentration	
	стимулированный цикл stimulated cycle (n = 9)	криоцикл cryocycle (n = 10)
<b>IL-2 (пг/мл)</b> IL-2 (pg/ml)	31,0 (15,3-45,5)	60,1 (46,6-110,4) p = 0,018*
<b>IL-4 (фг/мл)</b> IL-4 (f/ml)	380 (165-490)	530 (333-958)
<b>IL-5 (пг/мл)</b> IL-5 (pg/ml)	2,5 (1,6-3,5)	3,7 (2,7-6,8)
<b>IL-10 (пг/мл)</b> IL-10 (pg/ml)	101 (30-229)	102 (26-240)
<b>IL-12p70 (пг/мл)</b> IL-12p70 (pg/ml)	0,68 (0,60-0,92)	0,92 (0,72-1,29)
<b>IL-13 (пг/мл)</b> IL-13 (pg/ml)	2,1 (0,5-3,0)	2,1 (0,9-2,9)
<b>GM-CSF (пг/мл)</b> GM-CSF (pg/ml)	0,8 (0,6-1,5)	20,4 (8,0-162,6) p = 0,009*
<b>IFN<math>\gamma</math> (пг/мл)</b> IFN $\gamma$ (pg/ml)	0,8 (0,5-0,8)	1,1 (0,8-2,0)
<b>TNF<math>\alpha</math> (пг/мл)</b> TNF $\alpha$ (pg/ml)	1530 (841-2095)	4622 (2055-5873) p = 0,018*

Примечание. \* – различия между группами значимы при p ≤ 0,05 (критерий Манна–Уитни).  
 Note. \*, differences between groups are significant at p ≤ 0.05 (Mann–Whitney test).

видов иммунотерапии у женщин с повторными неудачами имплантации [2, 9]. Внутриматочное введение аутологичных мононуклеарных клеток периферической крови перед переносом эмбрионов является одним из новых методов иммунотерапии.

В данном исследовании мы оценивали эффективность внутриматочного введения аутологичных МНК, как активированных ХГч, так и МНК без активации перед переносом эмбриона в стимулированном цикле и криоцикле у пациенток с повторными неудачами имплантации. Полученные данные продемонстрировали значимое повышение частоты биохимической беременности, частоты имплантации, частоты наступления клинической беременности, частоты прогрессирующей беременности и частоты родов живым плодом в группе пациенток с проведением внутриматочного введения МНК, как активированных ХГч, так и МНК без активации перед переносом эмбриона у пациенток с повторными неудачами имплантации, как в стимулированном цикле, так и в криоцикле по сравнению с группой плацебо.

Обсуждаются несколько механизмов действия МНК. МНК могут индуцировать дифференциацию эндометрия, что повышает вероятность имплантации эмбриона. МНК могут индуцировать асептические воспалительные реакции в полости матки *in vivo* [4]. ХГч потенцирует эти множественные эффекты, непосредственно участвуя в регуляции имплантации эмбриона, стимулируя секрецию цитокинов и хемокинов в МНК, таких как LIF и IL-1, MMP-2, MMP-9 и VEGF, способствующих инвазии трофобласта [8]. Следовательно, можно предположить, что МНК, активированные ХГч, повышают частоту имплантации и частоту наступления клинической беременности за счет создания адекватного баланса цитокинов Th2/Th1 и адекватного уровня и функции Т-регуляторных клеток, создавая благоприятное

иммунное микроокружение для имплантации эмбриона.

Сравнительный анализ оценки эффективности данного метода иммунотерапии в зависимости от активации МНК и вида программы ВРТ показал, что активация МНК ХГч повышает эффективность криоциклов в 1,2 раза, но не влияет на исходы стимулированных циклов, что, вероятно, связано с эффектами ХГч, используемого в качестве триггера овуляции в стимулированных циклах, что согласуется с данными литературы о снижении частоты клинической беременности в стимулированных циклах по сравнению с криоциклами [3].

## Заключение

Таким образом, можно заключить, что активация мононуклеарных клеток периферической крови хорионическим гонадотропином приводит к высокому уровню продукции про- и противовоспалительных цитокинов, что обуславливает более высокую эффективность данного вида иммунотерапии. В результате проведенного исследования показано, что внутриматочное введение аутологичных МНК перед переносом эмбриона повышает эффективность программ ВРТ у пациенток с повторными неудачами имплантации в анамнезе. Полученные данные могут позволить персонализированный подход для использования различных видов иммунотерапии в программах ВРТ у пациенток с повторными неудачами имплантации.

## Благодарности

Авторы выражают огромную признательность и благодарность: аспиранту Амян Татьяне Сергеевне – за организацию и проведение процедуры внутриматочного введения МНК, участие в подборе пациентов и формирование базы данных.

## Список литературы / References

1. Амян Т.С., Кречетова Л.В., Перминова С.Г., Вторушина В.В. Эффективность внутриматочного введения аутологичных мононуклеарных клеток периферической крови перед переносом эмбриона у пациенток с повторными неудачами имплантации в программах вспомогательных репродуктивных технологий // Гинекология, 2018. Т. 2, № 2. С. 28-33. [Amyan T.S., Krechetova L.V., Perminova S.G., Vtorushina V.V. Effectiveness of intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells before embryo transfer in patients with repeated implantation failures in assisted reproductive technology programs. *Ginekologiya = Gynecology*, 2018, Vol. 2, no. 2, pp. 28-33. (In Russ.)]
2. Huang P. Effects of intrauterine perfusion of human chorionic gonadotropin in women with different implantation failure numbers. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2018, Vol. 79, no. 2. doi: 10.1111/aji.12809.
3. Imakawa K., Bai R., Fujiwara H., Kusama K. Conceptus implantation and placentation: molecules related to epithelial-mesenchymal transition, lymphocyte homing, endogenous retroviruses, and exosomes. *Reprod. Med. Biol.*, 2016, Vol. 15, no. 1, pp. 1-11.

4. Lea R.G., Sandra O. Immunoendocrine aspects of endometrial function and implantation. *Reproduction*, 2007, Vol. 134, pp. 389-404.
5. Makrigiannakis A., BenKhalifa M., Vrekoussis T., Mahjub S., Kalantaridou S.N. Gurgan: repeated implantation failure: a new potential treatment option. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2011, Vol. 45, pp. 380-384.
6. Nakayama T., Fujiwara H., Maeda M. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in early pregnancy promote embryo invasion *in vitro*: hCG enhances the effects of PBMC. *Hum. Reprod.*, 2002, Vol. 17, pp. 207-212.
7. Okitsu O., Kiyokawa M., Oda T., Miyake K., Sato Y., Fujiwara H. Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells increases clinical pregnancy rates in frozen/thawed embryo transfer cycles of patients with repeated implantation failure. *J. Reprod. Immunol.*, 2011, Vol. 92, pp. 82-87.
8. Saito S., Nakashima A., Shima T., Ito M., Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2010, Vol. 63, pp. 601-610.
9. Santibañez A., García J., Pashkova O., Colín O., Castellanos G., Sánchez A.P., De la Jara J.F. Effect of intrauterine injection of human chorionic gonadotropin before embryo transfer on clinical pregnancy rates from *in vitro* fertilisation cycles: a prospective study. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2014, Vol. 12, 9. doi: 10.1186/1477-7827-12-9.
10. Takabatake K., Fujiwara H., Goto Y., Nakayama T., Higuchi T., Fujita J., Maeda M., Mori T. Splenocytes in early pregnancy promote embryo implantation by regulating endometrial differentiation in mice. *Hum. Reprod.*, 1997, Vol. 12, pp. 2102-2107.
11. Yoshinaga K. Review of factors essential for blastocyst implantation for their modulating effects on the maternal immune system. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 2008, Vol. 19, pp. 161-169.
12. Yoshioka S., Fujiwara H., Nakayama T., Kosaka K., Mori T., Fujii S. Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells promotes implantation rates in patients with repeated failure of IVF-embryo transfer. *Hum. Reprod.*, 2006, Vol. 21, pp. 3290-3294.
13. Yu N., Yang J., Guo Y., Fang J., Yin T., Luo J., Li X., Li W., Zhao Q., Zou Y., Xu W. Intrauterine administration of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) improves endometrial receptivity with embryonic implantation dysfunction. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2014, Vol. 71, pp. 24-33.
14. Zeyneloglu H.B., Onalan G. Remedies for recurrent implantation failure. *Semin. Reprod. Med.*, 2014, Vol. 32, pp. 297-305.

---

**Авторы:**

**Вторушина В.В.** — к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Authors:**

**Vtorushina V.V.**, PhD (Medicine), Doctor for Clinical Laboratory Diagnostics, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

**Перминова С.Г.** — д.м.н., ведущий научный сотрудник  
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский  
центр акушерства, гинекологии и перинатологии  
имени академика В.И. Кулакова» Министерства  
здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Кречетова Л.В.** — д.м.н., заведующая лабораторией  
клинической иммунологии ФГБУ «Национальный  
медицинский исследовательский центр акушерства,  
гинекологии и перинатологии имени академика  
В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ,  
Москва, Россия

**Perminova S.G.**, MD, PhD (Medicine), Leading Research  
Associate, V. Kulakov National Medical Research Center for  
Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian  
Federation

**Krechetova L.V.**, MD, PhD (Medicine), Head, Laboratory of  
Clinical Immunology, V. Kulakov National Medical Research  
Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow,  
Russian Federation

---

Поступила 17.07.2021  
Принята к печати 20.07.2021

---

Received 17.07.2021  
Accepted 20.07.2021

## **ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ УРОВНЕМ АНТИГЛИКАНОВЫХ АНТИТЕЛ КРОВИ И КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫМИ ПАРАМЕТРАМИ ПАЦИЕНТОК С НОРМАЛЬНОЙ И ОСЛОЖНЕННОЙ УМЕРЕННОЙ ПРЕЭКЛАМПСИЕЙ БЕРЕМЕННОСТЬЮ**

**Зиганшина М.М.<sup>1</sup>, Шилова Н.В.<sup>1,2</sup>, Хасбиуллина Н.Р.<sup>1</sup>,  
Тютюнник Н.В.<sup>1</sup>, Кан Н.Е.<sup>1</sup>, Наумов В.А.<sup>1</sup>, Тютюнник В.Л.<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>3</sup> Перинатальный центр Европейского медицинского центра, Москва, Россия

**Резюме.** Одним из новых трендов в изучении патогенеза преэклампсии (ПЭ) является исследование развития гликопатологии в функциональной системе мать-плацента-плод. Учитывая важность углевод-белковых взаимодействий для морфогенеза плаценты, взаимодействий в иммунной системе, формирования толерантности к аллоантигенам плода, особую роль в патогенезе ПЭ могут иметь антигликановые антитела (АгАт), которые способны вмешиваться в эти взаимодействия, изменяя их. Поскольку продукция антител происходит на фоне имеющихся естественных антител, а также адаптивных, приобретенных в течение жизни, очевидно, что имеется значительное число факторов, которые находятся во взаимосвязи с АгАт, что имеет значение для патогенеза и выявления факторов риска заболевания. Цель исследования — определение взаимосвязи между содержанием АгАт в крови и клинико-лабораторными параметрами у пациенток с физиологической беременностью и ПЭ.

В исследование включены 146 беременных: основную группу I составила 51 пациентка с умеренной ПЭ, группу сравнения — 95 условно здоровых беременных. Изучены клинико-анамнестические данные, особенности течения беременности, данные лабораторных обследований, данные представительного спектра АгАт. АгАт (IgG и IgM) исследовались в сыворотке крови с помощью гликоципа, содержащего 473 гликана и 216 полисахаридов. Для определения связи между переменными были использованы непараметрический метод ранговой корреляции по Спирмену для анализа количественных данных, и Т-критерий Вилкоксона для анализа качественных данных.

### **Адрес для переписки:**

Зиганшина Марина Михайловна  
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ  
117997, Россия, Москва, ул. Акад. Опарина, 4.  
Тел.: 8 (903) 105-97-46.  
E-mail: mmz@mail.ru

### **Address for correspondence:**

Ziganshina Marina M.  
V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology  
117997, Russian Federation, Moscow, Acad. Oparin str., 4.  
Phone: 7 (903) 105-97-46.  
E-mail: mmz@mail.ru

### **Образец цитирования:**

М.М. Зиганшина, Н.В. Шилова, Н.Р. Хасбиуллина, Н.В. Тютюнник, Н.Е. Кан, В.А. Наумов, В.Л. Тютюнник «Взаимосвязь между уровнем антигликановых антител крови и клинико-лабораторными параметрами пациенток с нормальной и осложненной умеренной преэклампсией беременностью» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 3. С. 435-444.  
doi: 10.46235/1028-7221-1034-RBT

© Зиганшина М.М. и соавт., 2021

### **For citation:**

M.M. Ziganshina, N.V. Shilova, N.R. Khasbiullina, N.V. Tyutyunnik, N.E. Kan, V.A. Naumov, V.L. Tyutyunnik "Relationship between the level of antiglycan antibodies in the blood and clinical and laboratory parameters of patients with normal pregnancy and pregnancy complicated by moderate preeclampsia", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 3, pp. 435-444.  
doi: 10.46235/1028-7221-1034-RBT  
DOI: 10.46235/1028-7221-1034-RBT

Установлено, что в основной группе выявляется больше корреляционных связей между уровнем АгАт различных специфичностей и клинико-лабораторными параметрами, чем в группе сравнения. Отягощенный гинекологический и инфекционный анамнез, осложнения во время беременности ассоциированы с изменениями профиля АгАт обоих классов у пациенток, беременность которых осложнена умеренной ПЭ, что свидетельствует о патогенетическом значении этих антител. У здоровых беременных уровень антител к ряду гликанов реципрокно связан с количеством лимфоцитов, тромбоцитов и АЛТ, что может свидетельствовать о регуляторной роли этих антител, поскольку лимфоцитоз, тромбоцитопения и повышение трансаминаз в крови относятся к патологическим состояниям.

Выявленные взаимосвязи между уровнем АгАт и клинико-анамнестическими и лабораторными параметрами свидетельствуют о различных паттернах корреляционных взаимосвязей в норме и при патологии, что, по-видимому, указывает на патогенетическое значение АгАт ряда специфичностей при ПЭ, и их регуляторную роль при нормальной беременности.

*Ключевые слова:* гуморальный иммунитет, беременность, преэклампсия, гликаны, антигликановые антитела, микроцир

## RELATIONSHIP BETWEEN THE LEVEL OF ANTIGLYCAN ANTIBODIES IN THE BLOOD AND CLINICAL AND LABORATORY PARAMETERS OF PATIENTS WITH NORMAL PREGNANCY AND PREGNANCY COMPLICATED BY MODERATE PREECLAMPSIA

Ziganshina M.M.<sup>a</sup>, Shilova N.V.<sup>a,b</sup>, Khasbiullina N.R.<sup>a</sup>,  
Tyutyunnik N.V.<sup>a</sup>, Kan N.E.<sup>a</sup>, Naumov V.A.<sup>a</sup>, Tyutyunnik V.L.<sup>a,c</sup>

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

<sup>b</sup> M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup> Perinatal Center of European Medical Center, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** One of the new trends in the study of the pathogenesis of preeclampsia (PE) is the study of the development of glycopathology in the functional mother-placenta-fetus system. Given the importance of carbohydrate-protein interactions for the morphogenesis of the placenta, interactions in the immune system, and the formation of tolerance to fetal alloantigens, anti-glycan antibodies (AgAbs), which can interfere with these interactions, changing them, may play a special role in the pathogenesis of PE. Since the production of antibodies occurs against the background of existing natural antibodies, as well as adaptive ones acquired during life, it is obvious that there are a significant number of factors that are interrelated with AgAbs, which is important for the pathogenesis and identification of risk factors for the disease. Objective: to determine the relationship between the content of AgAbs in the blood and clinical and laboratory parameters in patients with physiological pregnancy and PE.

The study includes 146 pregnant women: the main group I consisted of 51 patients with moderate PE, the comparison group – 95 conditionally healthy pregnant women. Clinical and anamnestic data, peculiarities of the course of pregnancy, data of laboratory examinations, data of a representative spectrum of AgAbs were studied. AgAbs (IgG and IgM) were studied in serum using a glycoarray containing 473 glycans and 216 polysaccharides. To determine the relationship between the variables, the nonparametric Spearman rank correlation method was used for the analysis of quantitative data, and the Wilcoxon T-test for the analysis of qualitative data.

It was found that in the main group there were more correlations between the level of AgAbs of various specificities and clinical and laboratory parameters than in the comparison group. A burdened gynecological and infectious history, complications during pregnancy are associated with changes in the profile of AgAbs of both classes in patients whose pregnancy is complicated by moderate PE, which indicates the pathogenetic significance of these antibodies. In healthy pregnant women, the level of antibodies to a number of glycans is reciprocally related to the number of lymphocytes, platelets, and ALT, which may indicate the regulatory role

of these antibodies, since lymphocytosis, thrombocytopenia, and increased transaminases in the blood are pathological conditions.

The revealed relationships between the AgAbs level and clinical-anamnestic and laboratory parameters indicate different patterns of correlation relationships in health and disease, which apparently indicates the pathogenetic significance of AgAbs with a number of specificities in PE, and their regulatory role in normal pregnancy.

*Keywords: humoral immunity, pregnancy, preeclampsia, glycans, anti-glycan antibodies, microarray*

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-015-00102.

## Введение

Преэклампсия (ПЭ) относится к группе специфических для беременности синдромов, проявляется во второй половине беременности, и характеризуется высокой частотой материнской и перинатальной заболеваемости [4, 6]. Одним из патогенетических факторов развития ПЭ является плацентарная ишемия, которая формируется вследствие неполноценной перестройки спиральных артерий в результате нарушения процессов инвазии трофобласта [15]. Другим, немаловажным фактором развития плацентарной ишемии является экстрагенитальная патология матери, в частности, врожденные и приобретенные тромбофилии [10].

Гипоксически-ишемические повреждения ткани могут нарушать процессы гликозилирования в клетке [5]. Как было показано ранее, при ПЭ установлен измененный углеводный фенотип в структурах плацентарного барьера, что проявляется в нарушении экспрессии гликанов и их функциональных остатков, которые являются лигандами эндогенных лектинов, широко представленных на клетках иммунной и репродуктивной систем и опосредующих межклеточные коммуникации, в том числе в иммунной системе [14]. Высказываются предположения, что измененный углеводный фенотип при ПЭ может: приводить к нарушенным межклеточным контактам при плацентации [12]; способствовать формированию DAMPs (Danger Associated Molecular Patterns, образ опасности); реализовываться в активированном фенотипе клеток и структур плаценты, что инициирует эффекторные реакции в иммунной системе [13]. Все вышеописанное свидетельствует, что измененный углеводный фенотип является фактором развития системного воспалительного ответа, эндотелиальной дисфункции и провоцирует изменения в функционировании гуморального и клеточного звеньев иммунной системы, что ведет к иммунной дезадаптации и нарушению формирования иммунологической толерантности к полуаллогенному плоду. Вследствие этого, особый инте-

рес представляет исследование антигликановых антител (АгАт) крови, поскольку измененные гликаны могут распознаваться иммунной системой как неоантигены или DAMPs, что сдвигает гомеостатический баланс в пуле естественных АгАт, существующий в норме, а также провоцирует синтез адаптивных антител. Этот факт остается малоизученным при беременности, а также отсутствуют исследования, которые посвящены выявлению связи между АгАт и клинико-лабораторными особенностями и факторами риска при ПЭ. **Целью исследования** явилось определение взаимосвязи между уровнем АгАт в крови и клинико-лабораторными параметрами у пациенток с физиологической беременностью и ПЭ.

## Материалы и методы

В исследование включены 146 беременных: группу I (основную) составила 51 пациентка с беременностью, осложненной умеренной ПЭ и группа II (сравнения) – 95 условно здоровых беременных. Беременные включались в исследование по методу подбора пар. Критерием отсеки для включения в группы явился срок беременности  $\geq 34$  недель. Критериями включения для основной группы являлись: одноплодная беременность, наступившая в естественном цикле, осложненная умеренной ПЭ, подтвержденной данными клинико-лабораторных исследований. Для группы сравнения – отсутствие ПЭ. Критериями исключения для обеих групп являлись: резус-конфликт; острые воспалительные заболевания при беременности; тяжелая экстрагенитальная патология; пороки развития плода; онкологические и аутоиммунные заболевания; лечение низкомолекулярными гепаринами. Беременные были ознакомлены с целью и методами исследования, дали письменное добровольное информированное согласие. Всем пациенткам, включенным в исследование, выполнен стандартный набор обследования согласно приказу Министерства здравоохранения РФ № 572н, включая клинический и биохимический анализы крови, гемостазиограмму и проведено изучение клинико-анамнестических данных.

АгАт (IgG и IgM) исследовались в сыворотке крови с помощью гликоципа, содержащего

473 гликана (гликаны чипа представляют собой фрагменты О- и N-цепей гликопротеинов; олигосахариды гликолипидов; бактериальные полисахариды; антигены групп крови углеводной природы и их модифицированные производные) и 216 полисахаридов (производство ООО «Семиотик»). Полный список гликанов и полисахаридов гликочипа представлен в таблице М1 метаданных. Исследование проводилось по протоколу, описанному в [11], который предусматривал последовательное нанесение на чип анализируемых сывороток крови и антител, узнающих человеческие IgG и IgM, меченные Су3 и Су5, соответственно. Интенсивность флуоресценции, выраженную в относительных единицах (уеф), измеряли с помощью конфокального сканера ProScanArrayGx (PerkinElmer, США) с разрешением 10 мкм. Полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения ScanArrayExpress 4.0, используя метод фиксированных колец диаметром 70 мкм, а также Microsoft Excel. Уровень AgAt (отражающий аффинность антител и их количество) характеризовали с помощью медианы интенсивностей флуоресценции повторов лигандов гликочипа.

Полученные данные по уровню AgAt были проверены на корреляцию с количественными и качественными данными клинико-лабораторных параметров пациенток включая возраст, вес матери и новорожденного, уровень лейкоцитов, нейтрофилов абсолютных и относительных, тромбоцитов, гемоглобина, белка в моче, фибронектина, протромбинового индекса, ферментов аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ) и клиническими данными, включая характеристику соматической патологии, репродуктивной функции, течения беременности.

Для определения связи между переменными (антителами и клинико-лабораторными данными пациенток) были использованы непараметрический метод ранговой корреляции по Спирмену для анализа количественных данных, и Т-критерий Вилкоксона для анализа качественных данных, для выявления направленности и выраженности изменений и рассчитывалась вероятность ошибки для выявленной корреляции. В качестве порога достоверности использовали значение  $p\text{-val} < 0,05$  с учетом поправки FDR (коэффициент ложных обнаружений).

## Результаты и обсуждение

Все беременные, включенные в исследование, были сопоставимы по возрасту и срокам беременности. Проведение сравнительного анализа исходной клинической характеристики показало у женщин основной группы превалирование

заболеваний сердечно-сосудистой и мочевыводящей систем, а также статистически значимые различия в частоте нарушения жирового обмена 1 степени ( $n = 14, 16,9\%$ ) (OR = 3,5 (1,4-32,4)). Среди гинекологических заболеваний отмечено увеличение частоты миомы матки ( $n = 15, 18,0\%$ ) (OR = 15,4 (2,0-120,3)), хронического эндометрита ( $n = 5, 6,0\%$ ) (OR = 4,5 (0,5-39,2)), сальпингофорита ( $n = 4, 4,8\%$ ) (OR = 3,5 (0,4-32,4)).

Течение настоящей беременности при ПЭ в I триместре чаще осложнялось ранним токсикозом умеренной и тяжелой степени ( $n = 15, 18,1\%$ ), (OR = 0,8 (0,4-1,6)) и угрозой прерывания ( $n = 29, 34,9\%$ ), (OR = 1,1 (0,6-2,2)) с формированием ретрохориальной гематомы (по данным УЗИ) ( $n = 5, 6,0\%$ ) (OR = 1,2 (0,2-12,1)), ( $p < 0,05$ ). Во II триместре в основной группе достоверно чаще отмечалась угроза прерывания ( $n = 21, 25,3\%$ ), (OR = 3,4 (1,3-9,1),  $p < 0,05$ ). Обращает на себя внимание также более высокая частота анемии ( $n = 14, 16,9\%$ ) (OR = 2,1 (0,5-8,4),  $p > 0,05$ ) и задержки роста плода (ЗРП) ( $n = 3, 3,6\%$ ) (OR = 1,3 (0,4-1,9),  $p > 0,05$ ). В III триместре беременности выявлялась достоверно более высокая частота ЗРП ( $n = 9, 10,8\%$ ) (OR = 4,5 (1,4-9,6),  $p < 0,05$ ) и маловодия ( $n = 8, 9,6\%$ ) (OR = 1,3 (1,4-2,9),  $p < 0,05$ ).

Межгрупповые различия были выявлены по ряду AgAt IgG класса, в том числе по антителам к бактериальным полисахаридам и антителам к гликанам – «образам опасности» (данные не представлены), что свидетельствует о преимущественно адаптивном происхождении этих антител, несмотря на то, что большинство имеющихся данных о естественных AgAt (в литературе преимущественно представлены данные о AgAt IgM класса) указывают на их консервативный репертуар и постоянный уровень в крови [1, 9].

Анализ результатов корреляционного анализа показал, что связи между AgAt и качественными/количественными клинико-лабораторными признаками в обеих группах различны. В группе сравнения отмечается наличие корреляционных связей между заболеваниями передающимися половым путем (ЗППП), которые пациентки перенесли в анамнезе, среди которых преобладает вирус простого герпеса (ВПГ) (связь с рядом антител М класса), хламидиоз и уреоплазмоз (связь с антителами обоих классов), а также угрозой I и II триместров (табл. 1). В таблице 2 представлены обобщенные данные значимых корреляционных связей, выявленных в основной группе между антителами и качественными признаками, среди которых преобладают ЗППП, особенно вирус папилломы человека (ВПЧ), наличие ретрохориальной гематомы (РХГ) в первом триместре беременности, гинекологическими заболеваниями

**ТАБЛИЦА 1. ОЦЕНКА КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СВЯЗИ МЕЖДУ УРОВНЕМ АНТИГЛИКАНОВЫХ АНТИТЕЛ И КЛИНИКО-АНАМНЕСТИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ (КАЧЕСТВЕННЫЕ ПРИЗНАКИ) В ГРУППЕ СРАВНЕНИЯ**

TABLE 1. ASSESSMENT OF THE CORRELATION BETWEEN THE LEVEL OF ANTI-GLYCAN ANTIBODIES AND CLINICAL AND ANAMNESTIC PARAMETERS (QUALITATIVE CHARACTERISTIC) IN THE COMPARISON GROUP

Класс антител_Номер гликана / Короткое название гликана* Antibody class_Glycan number / Short name of the glycan*	p-val**	Среднее значение в группе с наличием признака Average value in the group with presented characteristic	Среднее значение в группе с отсутствием признака Average value in the group without characteristic	Качественный признак Qualitative characteristic
IgM_237/ABtri	0,023	11,05	11,93	Уреаплазмоз Ureaplasmosis
IgM_529/LSTb	0,027	9,88	9,19	Хламидиоз Chlamydiosis
IgG_151/TF6'Su	0,027	9,50	10,96	Вирус простого герпеса Herpes simplex virus
IgM_103/core5	0,030	12,95	14,64	Вирус простого герпеса Herpes simplex virus
IgG_479/Htype1Lac	0,036	9,56	10,91	Бактериальный вагиноз Bacterial vaginosis
IgM_1608/Proteusmirabilis O23	0,036	10,84	11,70	Угроза II триместра Risk in II trimester
IgM_241/(Ga6)3b isomaltotriose	0,036	11,78	10,50	Вирус простого герпеса Herpes simplex virus
IgG_1605/Proteusmirabilis O11	0,039	9,11	8,47	Уреаплазмоз Ureaplasmosis
IgM_434/GD3	0,042	8,90	9,73	Вирус простого герпеса Herpes simplex virus
IgG_497/LeYLac	0,044	9,33	8,21	Хламидиоз Chlamydiosis
IgM_398/LeC(Fm)3'LeC	0,044	13,20	14,49	Вирус простого герпеса Herpes simplex virus
IgG_497/LeYLac	0,045	9,09	9,70	Угроза I триместра Risk in I trimester

Примечание. \* – структуры гликанов, соответствующие номерам и коротким названиям, представлены в файлах метаданных, \*\* – данные отсортированы по значению p-val (от меньшего к большему) в каждой группе.

Note. \*, glycan structures corresponding to numbers and short names are presented in metadata files; \*\*, data sorted by p-val (lowest to highest) in each group.

ями, подъемом артериального давления, ЗРП и нарушением жирового обмена. Поскольку, при анализе клинических данных, большинство отмеченных выше качественных признаков были отмечены, как имеющие значимо более высокую частоту при ПЭ, АгАт, для которых выявлены корреляционные связи с ними, по-видимому, имеют патогенетическое значение.

Анализ данных таблиц 1 и 2 свидетельствует, что: а) в основной группе выявляется более широкий спектр корреляционных связей с АгАт различных специфичностей; б) отягощенный гинекологический и инфекционный анамнез,

осложнения во время беременности, ассоциированы с изменениями профиля АгАт обоих классов у пациенток, беременность которых осложнена умеренной ПЭ. Также обращает на себя внимание факт, что в основной группе установлена связь антител к низкомолекулярной форме гиалуроновой кислоты (HyalU13-ol) и ее структурному дисахариду (GUb3GN) с клиническими симптомами, в частности развитием ЗРП во время беременности, наличием миомы и ВПЧ в анамнезе. Как известно, низкомолекулярная гиалуроновая кислота выделяется в кровоток при шелушивании эндотелиального гликокаликса

**ТАБЛИЦА 2. ОЦЕНКА КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СВЯЗИ МЕЖДУ УРОВНЕМ АНТИГЛИКАНОВЫХ АНТИТЕЛ И КЛИНИКО-АНАМНЕСТИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ (КАЧЕСТВЕННЫЕ ПРИЗНАКИ) В ОСНОВНОЙ ГРУППЕ**

TABLE 2. ASSESSMENT OF THE CORRELATION BETWEEN THE LEVEL OF ANTI-GLYCAN ANTIBODIES AND CLINICAL AND ANAMNESTIC PARAMETERS (QUALITATIVE CHARACTERISTIC) IN THE MAIN GROUP

Класс антител_Номер гликана / Короткое название гликана* Antibody class_Glycan number / Short name of the glycan*	p-val**	Среднее значение в группе с наличием признака Average value in the group with presented characteristic	Среднее значение в группе с отсутствием признака Average value in the group without characteristic	Качественный признак Qualitative characteristic
IgG_164/GUb3GN	0,004	9,75	10,78	<b>Миома</b> Myoma
IgG_529/LSTb	0,005	9,13	8,27	<b>Задержка развития плода</b> Fetal growth retardation
IgG_293/3'SL	0,009	8,31	8,47	<b>Угроза I триместра</b> Risk in I trimester
IgG_479/Htype1Lac	0,020	8,81	8,01	<b>Вирус папилломы человека</b> Human papilloma virus
IgM_2010/ Shigellaboydiitype 7	0,022	13,07	11,09	<b>Цитомегаловирус</b> Cytomegalovirus
IgG_398/LeC(Fm)3'LeC	0,022	9,87	8,93	<b>Хронический эндометрит</b> Chronic endometritis
IgG_818/ANa4ANa	0,023	12,74	14,95	<b>Хронический пиелонефрит</b> Chronic pyelonephritis
IgM_398/LeC(Fm)3'LeC	0,025	12,44	14,20	<b>Ретрохориальная гематома</b> Subchorionic hematoma
IgM_632/HyalU13-ol	0,027	11,57	10,23	<b>Вирус папилломы человека</b> Human papilloma virus
IgM_241/(Ga6)3b	0,028	12,30	8,63	<b>Ретрохориальная гематома</b> Subchorionic hematoma
IgG_296/6'SL-Gly	0,029	8,59	7,83	<b>Миома</b> Myoma
IgM_296/6'SL-Gly	0,030	9,55	8,54	<b>Ретрохориальная гематома</b> Subchorionic hematoma
IgG_241/(Ga6)3b	0,030	9,84	7,68	<b>Ретрохориальная гематома</b> Subchorionic hematoma
IgM_293/3'SL	0,030	9,78	8,98	<b>Цитомегаловирус</b> Cytomegalovirus
IgM_1608/Proteusmirabilis O23	0,032	11,28	9,22	<b>Ретрохориальная гематома</b> Subchorionic hematoma
IgG_296/6'SL-Gly	0,032	8,55	7,23	<b>Ретрохориальная гематома</b> Subchorionic hematoma
IgM_164/GUb3GN	0,033	12,77	12,03	<b>Задержка развития плода</b> Fetal growth retardation
IgM_529/LSTb	0,034	9,48	9,90	<b>Повышение АД во II триместре</b> High Arterial pressure in II trimester
IgM_529/LSTb	0,035	9,76	8,91	<b>Хронический эндометрит</b> Chronic endometritis

Таблица 2 (окончание)  
Table 2 (continued)

Класс антител_Номер гликана / Короткое название гликана* Antibody class_Glycan number / Short name of the glycan*	p-val**	Среднее значение в группе с наличием признака Average value in the group with presented characteristic	Среднее значение в группе с отсутствием признака Average value in the group without characteristic	Качественный признак Qualitative characteristic
IgG_632/GD3	0,039	8,87	9,31	<b>Повышение АД во II триместре</b> High Arterial pressure in II trimester
IgG_434/GD3	0,039	8,27	7,64	<b>Нарушение жирового обмена I степени</b> Lipid metabolism disorder I rate
IgM_293/3'SL	0,039	9,79	9,18	<b>Вирус папилломы человека</b> Human papilloma virus
IgM_2010/Shigellaboydiitype 7	0,039	12,76	13,18	<b>Повышение АД во II триместре</b> High Arterial pressure in II trimester
IgM_123/Mb4GN	0,042	12,14	8,91	<b>Ретрохориальная гематома</b> Subchorionic hematoma
IgG_398/LeC(Fm)3'LeC	0,042	10,02	9,49	<b>Угроза I триместра</b> Risk in I trimester
IgG_241/(Ga6)3b	0,043	9,60	10,18	<b>Угроза II триместра</b> Risk in II trimester
IgM_818/ANa4ANa	0,044	13,75	13,03	<b>Повышение АД во I триместре</b> High Arterial pressure in I trimester
IgG_273/Fb2LN	0,044	8,73	8,51	<b>Угроза II триместра</b> Risk in II trimester
IgG_151/TF6'Su	0,045	9,31	8,55	<b>Уреаплазмоз</b> Ureaplasmosis
IgM_237/ABtri	0,046	10,80	11,36	<b>Токсикоз легкой степени</b> Mild toxicosis

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

вследствие развития воспалительной реакции [2]. Повышенный уровень антител к гиалуроновой кислоте и ее структурному дисахариду был нами выявлен ранее, что свидетельствует о развитии эндотелиальной дисфункции при ПЭ и может являться фактором, препятствующим восстановлению эндотелиального гликокаликса и, следовательно, восстановлению физиологической регуляции артериального давления [3]. Поэтому выявленные связи, также подтверждают патогенетическое значение AgAt со специфичностью к гиалуроновой кислоте при ПЭ.

При анализе связей между уровнем AgAt и клинико-лабораторными параметрами (количе-

ственные признаки) было установлено, что в группе сравнения уровень антител к ряду гликанов реципрокно связан с количеством лимфоцитов, тромбоцитов и уровнем АЛТ, что может свидетельствовать о регуляторной роли этих антител, поскольку лимфоцитоз, тромбоцитопения и повышение трансаминаз в крови относятся к патологическим состояниям (таблица 3). Выявленные связи могут быть отражением участия данных антител в регуляции контролируемой воспалительной реакции, которая развивается при физиологически протекающей беременности. Подобные, предположительно регуляторные, связи не выявляются при ПЭ.

**ТАБЛИЦА 3. ОЦЕНКА КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СВЯЗИ МЕЖДУ УРОВНЕМ АНТИГЛИКАНОВЫХ АНТИТЕЛ И КЛИНИКО-АНАМНЕСТИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ (КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ПРИЗНАКИ) В ГРУППАХ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**TABLE 3. ASSESSMENT OF THE CORRELATION BETWEEN THE LEVEL OF ANTI-GLYCAN ANTIBODIES AND CLINICAL AND ANAMNESTIC PARAMETERS (QUALITATIVE CHARACTERISTIC) IN GROUPS**

Антигликановые антитела, класс Anti-glycan antibodies, class	r	p-val	Параметр Characteristic
<b>Группа сравнения</b> Comparison group			
<b>Анти-LeYЛac (IgG)</b> Anti-LeYЛac (IgG)	0,878	0,022	<b>уровень лимфоцитов</b> lymphocyte level
<b>Антитела к О-полисахариду <i>P. mirabilis</i> 23 (IgM)</b> Antibodies to O-polysaccharide <i>P. mirabilis</i> 23 (IgM)	0,742	0,035	<b>АЛТ</b> ALT
<b>Анти-core5 (IgG)</b> Anti-core5 (IgG)	0,740	0,036	<b>АСТ</b> AST
<b>Антитела к О-полисахариду <i>P. mirabilis</i> 11 (IgM)</b> Antibodies to O-polysaccharide <i>P. mirabilis</i> 11 (IgM)	-0,281	0,029	<b>уровень тромбоцитов</b> thrombocyte level
<b>Антитела к О-полисахариду <i>Sh. boydii</i> type 7 (IgG)</b> Antibodies to O-polysaccharide <i>Sh. boydii</i> type 7 (IgG)	-0,764	0,027	<b>АЛТ</b> ALT
<b>Антитела к О-полисахариду <i>P. mirabilis</i> 23 (IgG)</b> Antibodies to O-polysaccharide <i>P. mirabilis</i> 23 (IgG)	-0,825	0,043	<b>уровень лимфоцитов</b> lymphocyte level
<b>Антитела к О-полисахариду <i>P. mirabilis</i> 11 (IgG)</b> Antibodies to O-polysaccharide <i>P. mirabilis</i> 11 (IgG)	-0,834	0,039	<b>уровень лимфоцитов</b> lymphocyte level
<b>Антитела к изомальтотриозе (IgG)</b> Antibodies to maltotriose (IgG)	-0,965	0,002	<b>уровень лимфоцитов</b> lymphocyte level
<b>Основная группа</b> Main group			
<b>Антитела к О-полисахариду <i>P. mirabilis</i> O23 (IgG)</b> Antibodies to O-polysaccharide <i>P. mirabilis</i> O23 (IgG)	0,374	0,011	<b>масса тела</b> body weight
<b>Анти-LeC(Fm)3'LeC (IgM)</b> Anti-LeC(Fm)3'LeC (IgM)	-0,318	0,033	<b>масса тела</b> body weight

При умеренной ПЭ установлены слабые корреляционные связи между уровнем АгАт и массой тела пациенток, что может указывать на патогенетическое значение этих антител, поскольку нарушение жирового обмена является фактором риска развития ПЭ.

Развитие полуаллогенного плода при физиологической беременности сопровождается формированием состояния иммунологической толерантности, которая обеспечивается целым комплексом гуморальных и клеточных реакций. В частности, имеются данные о блокирующих антителах, которые маскируют фетальные антигены и выполняют, в ряде случаев, регуляторную функцию [8]. Как свидетельствуют проведенные ранее исследования блокирующих антител, определенное их количество выявляется вне бе-

ременности, и возрастает при физиологической беременности [7]. Их продукция происходит на фоне исходно присутствующих в организме естественных антител, а также адаптивных антител, которые являются отражением перенесенных заболеваний в течение жизни. Поэтому предположение о том, что АгАт могут быть ассоциированы с факторами риска развития ПЭ, ее клиническими симптомами и клиническими лабораторными маркерами, которые отражают развитие воспалительной реакции, и свидетельствуют о дисфункции органов-мишеней ПЭ, подтвердилось в данном исследовании. Выявленные корреляционные связи свидетельствуют о формировании специфических корреляционных паттернов, отличающих норму от патологии, что требует дальнейших исследований и подтверждений.

## Заключение

Таким образом, выявленные взаимосвязи между уровнем АгАт и клинико-анамнестическими и лабораторными параметрами при нормальной беременности, и осложненной преэклампсией умеренной степени, свидетельствуют о различных паттернах корреляционных взаимосвязей в норме и при патологии, что, по-видимому, указывает на патогенетическое значение АгАт ряда специфичностей при ПЭ, и их регуляторную роль при нормальной беременности. Полученные ре-

зультаты демонстрируют связь АгАт с факторами риска развития ПЭ, различными осложнениями беременности и требуют дальнейшего более подробного уточнения, которое позволит более глубоко изучить патогенез ПЭ и идентифицировать молекулярные маркеры ее развития.

## Благодарности

Авторы выражают благодарность Биобанку ФГБУ НМИЦ АГиП им. академика В.И. Кулакова Минздрава России за сбор и хранение образцов сыворотки крови, используемой в исследовании.

## Список литературы / References

1. Бовин Н.В. Естественные антитела к гликанам // Биохимия, 2013 Т. 78, № 7. С. 1008-1022. [Bovin N. Natural antibodies to glycans. *Biokhimiya = Biochemistry (Mosc.)*, 2013, Vol. 78, no. 7, pp. 1008-1022. (In Russ.)]
2. Зиганшина М.М., Павлович С.В., Бовин Н.В., Сухих Г.Т. Гиалуроновая кислота сосудистом и иммунном гомеостазе при физиологической беременности и преэклампсии // *Acta Naturae*, 2016. Т. 8, № 3 (30). С. 66-79. [Ziganshina M.M., Pavlovich S.V., Bovin N.V., Sukhikh G.T. Hyaluronic Acid in Vascular and Immune Homeostasis during Normal Pregnancy and Preeclampsia. *Acta Naturae*, 2016, Vol. 3, no. 3 (30), pp. 66-79. (In Russ.)]
3. Зиганшина М.М., Шилова Н.В., Хасбиуллина Н.Р., Новаковский М.Е., Николаева М.А., Кан Н.Е., Вавина О.В., Николаева А.В., Тютюнник Н.В., Сергунина О.А., Бот И., Тютюнник В.Л., Бовин Н.В., Сухих Г.Т. Аутоантитела к антигенам эндотелия при преэклампсии // *Акушерство и гинекология*, 2016. № 3. С. 24-31. [Ziganshina M.M., Shilova N.V., Khasbiullina N.R., Novakouski M.E., Nikolayeva M.A., Kan N.E., Vavyna O.V., Nikolayeva A.V., Tyutyunnik N.V., Srgunina O.A., Bot I., Tyutyunnik V.L., Bovin N.V., Sukhikh G.T. Autoantibodies to endothelial antigens in preeclampsia. *Akusherstvo I gynecologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2016; no. 3, pp. 24-31. (In Russ.)]
4. Шувалова М.П., Фролова О.Г., Ратушняк С.С., Гребенник Т.К., Гусева Е.В. Преэклампсия и эклампсия как причина материнской смертности // *Акушерство и гинекология*, 2014. Т. 8. С. 81-87. [Shuvalova M.P., Frolova O.G., Ratushnyak S.S., Grebennik T.K., Guseva E.V. Preeclampsia and eclampsia as the cause of maternal death. *Akusherstvo I gynecologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2014, Vol. 8, pp. 81-87. (In Russ.)]
5. Arriagada C., Silva P., Torres V.A. Role of glycosylation in hypoxia-driven cell migration and invasion. *Cell Adh. Migr.*, 2019, Vol. 13, pp. 13-22.
6. Brown M.A., Magee L.A., Kenny L.C., Karumanchi S.A., McCarthy F.P., Saito Sh., Hall D.R., Warren C.E., Adoyi G., Ishaku S. on behalf of the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). The hypertensive disorders of pregnancy: ISSHP classification, diagnosis & management recommendations for international practice. *Pregnancy Hypertens.*, 2018, Vol. 13, pp. 291-310.
7. Canellada A., Gentile T., Dokmetjian J., Margni R.A. Occurrence, properties, and function of asymmetric IgG molecules isolated from non-immune sera. *Immunol. Invest.*, 2002, Vol. 31, no. 2, pp. 107-120.
8. Gutierrez G., Gentile T., Miranda S., Margni R.A. Asymmetric antibodies: a protective arm in pregnancy. *Chem. Immunol. Allergy*, 2005, Vol. 89, pp. 158-168.
9. Huflejt M.E., Vuskovic M., Vasiliu D., Xu H., Obukhova P., Shilova N., Tuzikov A., Galanina O., Arun B., Lu K., Bovin N. Anti-carbohydrate antibodies of normal sera: findings, surprises and challenges. *Mol. Immunol.*, 2009, Vol. 46, no. 15, pp. 3037-3049.
10. Kemp M., Thomas W. Antiphospholipid syndrome in obstetrics. *Lupus*, 2018, Vol. 27, pp. 28-31.
11. Khasbiullina N.R., Shilova N.V., Navakouski M.J., Nokel A.Y., Blixt O., Kononov L.O., Knirel Y.A., Bovin N.V. The Repertoire of Human Antiglycan Antibodies and Its Dynamics in the First Year of Life. *Biochemistry (Mosc.)*, 2019, Vol. 84, no. 6, pp. 608-616.
12. Pang P.C., Haslam S.M., Dell A., Clark G.F. The human fetoembryonic defense system hypothesis: Twenty years on. *Mol. Aspects Med.*, 2016, Vol. 51, pp. 71-88.
13. Rabinovich G.A., Toscano M.A. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2009, Vol. 9, no. 5, pp. 338-352.
14. Sukhikh G.T., Ziganshina M.M., Nizyaeva N.V., Kulikova G.V., Volkova J.S., Yarotskaya E.R., Kan N.E., Shchyogolev A.I., Tyutyunnik V.L. Differences of glycocalyx composition in the structural elements of placenta in preeclampsia. *Placenta*, 2016, Vol. 43, pp. 69-76.
15. Zárate A., Saucedo R., Valencia J., Manuel L., Hernández M. Early disturbed placental ischemia and hypoxia creates immune alteration and vascular disorder causing preeclampsia. *Arch. Med. Res.*, 2014, Vol. 45, no. 7, pp. 519-524.

**Авторы:**

**Зиганшина М.М.** — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Шилова Н.В.** — к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ; старший научный сотрудник лаборатории углеводов ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

**Хасбиуллина Н.Р.** — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Тютюнник Н.В.** — к.м.н., научный сотрудник лаборатории инновационных технологий ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Кан Н.Е.** — д.м.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Наумов В.А.** — научный сотрудник лаборатории биоинформатики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Тютюнник В.Л.** — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник центра научных и клинических исследований департамента организации научной деятельности ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ; главный врач Перинатального центра Европейского медицинского центра, Москва, Россия

**Authors:**

**Ziganshina M.M.**, PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

**Shilova N.V.**, PhD (Chemistry), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology; Senior Research Associate, Laboratory of Carbohydrates, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Khasbiullina N.R.**, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

**Tyutyunnik N.V.**, PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Innovative Technologies, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

**Kan N.E.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director for Research, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

**Naumov V.A.**, Research Associate, Laboratory of Bioinformatics, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

**Tyutyunnik V. L.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Research Associate, Research and Development Service, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology; Chief Physician, Perinatal Center of European Medical Center, Moscow, Russian Federation

Поступила 29.06.2021  
Принята к печати 20.07.2021

Received 29.06.2021  
Accepted 20.07.2021

# ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://rusimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Российский иммунологический журнал» и «Инструкцией по подготовке и отправке статьи», представленной на сайте.

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 & 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, нарицательные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. 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 «Российский иммунологический журнал» 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. Рукопись может быть возвращена авторам, если она им не соответствует.

1. 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 «Российский иммунологический журнал» 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.

2. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.

3. 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 каждого из соавторов статьи (полностью, на русском и английском языках);

- подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа (В случае, если авторами статьи являются сотрудники разных учреждений, то последние нумеруются по порядку, начиная с единицы, и соответствующая цифра размещается после фамилии автора, представляющего данное

учреждение. Для маркировки авторов в англоязычной части статьи вместо цифр используются латинские буквы (a, b, c, d и т.д.);

- 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 (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\_Порядковый номер рисунка. Название рисунка»).

6) Файл в формате .doc, .docx, .tiff, 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, в начале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована — для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) — редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы www.e-library.ru

4. Текст 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.

5. Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям, описанным в Правилах для авторов, расположенных на странице «О Журнале».

6. Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать из раздела Рецензирование, на странице «О Журнале».

## Авторские права

Авторы, публикующие в данном журнале, соглашаются со следующим:

1. Авторы сохраняют за собой авторские права на работу и предоставляют журналу право первой публикации работы на условиях лицензии Creative Commons Attribution License, которая позволяет другим распространять данную работу с обязательным сохранением ссылок на авторов оригинальной работы и оригинальную публикацию в этом журнале.

2. Авторы сохраняют право заключать отдельные контрактные договоренности, касающиеся неэксклюзивного распространения версии работы в опубликованном здесь виде (например, размещение ее в институтском хранилище, публикацию в книге), со ссылкой на ее оригинальную публикацию в этом журнале.

3. Авторы имеют право размещать их работу в сети Интернет (например, в институтском хранилище или персональном сайте) до и во время процесса рассмотрения ее данным журналом, так как это может привести к продуктивному обсуждению и большему количеству ссылок на данную работу (См. The Effect of Open Access).

## Приватность

Имена и адреса электронной почты, введенные на сайте этого журнала, будут использованы исключительно для целей, обозначенных этим журналом, и не будут использованы для каких-либо других целей или предоставлены другим лицам и организациям.

**Вы можете оформить подписку на журнал «Российский иммунологический журнал» через отделения связи:**

**Каталог «Пресса России» — индекс 15590.**

**Подписка на электронную версию журнала на сайте [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)**

## АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

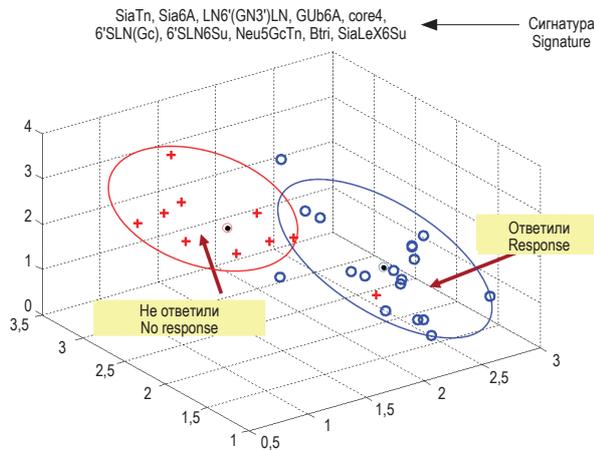
Абакумова Т.В.	355	Деева Н.С.	373	Наумов В.А.	435
Аванесова Т.Г.	409	Дианова Д.Г.	387	Николаева М.А.	391
Антонеева И.И.	355	Долгих О.В.	387	Нокель А.Ю.	419
Арефьева А.С.	391	Долгушина Н.В.	413	Перминова С.Г.	425
Бабаян А.А.	391	Дударева М.В.	409	Поленок Е.Г.	381
Безнощенко О.С.	413	Ермолова Н.В.	409	Понасенко А.В.	377
Бердюгина О.В.	363	Зиганшина М.М.	419, 435	Пырегов А.В.	413
Бовин Н.В.	419	Иванец Т.Ю.	413	Сухих А.С.	373
Вавин Г.В.	373	Инвиева Е.В.	399	Тавлуева Е.В.	413
Воронина Е.Н.	381	Калинина Е.А.	391	Тетрашвили Н.К.	399
Вторушина В.В.	399, 425	Кан Н.Е.	435	Тютюнник В.Л.	435
Вускович М.	419	Кодацкий Д.С.	413	Тютюнник Н.В.	435
Гареева Ю.В.	381	Кречетова Л.В.	399, 413, 425	Хасбиуллина Н.Р.	419, 435
Генинг С.О.	355	Кривцов А.В.	387	Хуфлейт М.Э.	419
Генинг Т.П.	355	Крукиер И.И.	409	Цепочкина А.В.	377
Глушков А.Н.	381	Крюков П.М.	373	Шабалдин А.В.	373, 377
Гноевых В.В.	355	Левкович М.А.	409	Шилова Н.В.	419, 435
Гордеева Л.А.	381	Мелкумян А.Р.	413	Шмулевич С.А.	377
Городнова Е.А.	413	Мун С.А.	381	Шпилюк М.А.	413

## ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

антигликановые антитела	436	нейтрофилокины	356
антирадикальная активность	387	нейтрофилы	356
апоптоз	410	онкология	420
аутологичные мононуклеарные клетки периферической крови	426	органы женской репродуктивной системы	420
АФА	414	повторные неудачи имплантации	426
беременность	392, 400, 436	преэклампсия	436
ВИЧ	364	привычный выкидыш	400
внутриматочная инфекция	382	проточная цитометрия	364
внутриматочное введение	426	рак молочной железы	420
волчаночный антикоагулянт	414	рак яичников	356
врожденные пороки развития	382	ригидность мембраны	356
врожденные пороки сердца	374, 377	семенная плазма	392
гамма-глобулин	374	сигнатура	420
генетический полиморфизм	382	тест dRVVT	414
гликаны	436	тест SCT	414
гликоэзрей	420	туберкулема	364
гуморальный иммунитет	436	факторный анализ	364
дефект межжелудочковой перегородки	377	фрагментация ДНК сперматозоида	387
дефект межпредсердной перегородки	377	хорионический гонадотропин человека	426
доброкачественная опухоль яичников	356	циркуляция	414
естественные антигликановые антитела	420	цитокины	392, 426
иммунитет	410	эффективность ВРТ	392
иммунная система	400	CD11b	364
иммунокоррекция	400	COVID-19	414
иммунология	364	HLA-DR	364
иммунопрофилактика	374	HLA-G	382
иммунотерапия	426	MIF	400
иммуноцитотерапия	400	NK-клетки	364, 410
интерлейкины	392	NKT-клетки	364
микрочип	436	T-лимфоциты	410
наружный генитальный эндометриоз	410	TLR	377

**ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ГЛИКОЭРРЕЙ В ДИАГНОСТИКЕ И ТЕРАПИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ОРГАНОВ ЖЕНСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ» (АВТОРЫ: ШИЛОВА Н.В., БОВИН Н.В., НОКЕЛЬ А.Ю., ЗИГАНШИНА М.М., ХАСБИУЛЛИНА Н.Р., ВУСКОВИЧ М., ХУФЛЕЙТ М.Э. [с. 419-424])**

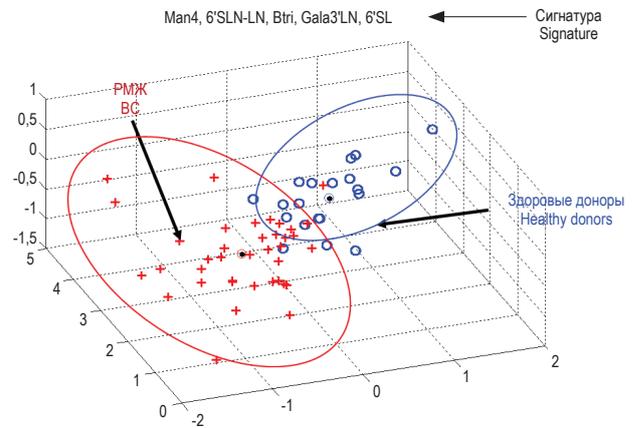
ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "GLYCOARRAYS FOR DIAGNOSIS AND THERAPY OF THE DISORDERS OF THE FEMALE REPRODUCTIVE SYSTEM" (AUTHORS: SHILOVA N.V., BOVIN N.V., NOKEL A.YU., ZIGANSHINA M.M., KHASBIULLINA N.R., VUSKOVIC M., HUFLEJT M.E. [pp. 419-424])



**Рисунок 1.** 3D-точечная диаграмма прогнозируемых средних значений интенсивности флуоресценции на основе гликанов, вошедших в сигнатуру для 29 пациенток с РМЖ (III стадии), которые получали сочетанную терапию доксирубицином и герцептином  
Примечание. Оси X, Y и Z на диаграмме – линейная комбинация средней интенсивности АГАТ, вошедших в сигнатуру (специфичность антител указана над диаграммой). Уровень значимости разделения на респондеров (o) и нереспондеров (+) – 0,020.

Figure 1. 3D scatter plot of projected mean fluorescence intensities based on glycans, including to signature for 29 patients with BC (III stage) who received combined therapy with doxorubicin and herceptin

Note. X, Y and Z-axis, of the diagram are linear combinations of mean intensities for AGA, included to the signature (specificity of AGA is indicated above the diagram). Significance level for responders (o) and non-responders (+) – 0.020.



**Рисунок 2.** 3D-точечная диаграмма прогнозируемых средних значений интенсивности флуоресценции на основе гликанов, вошедших в сигнатуру для 29 пациенток с метастатическим РМЖ (III стадии) до начала терапии и 27 условно здоровых доноров

Примечание. Оси X, Y и Z на диаграмме – линейная комбинация средней интенсивности гликанов, вошедших в сигнатуру (специфичность антител, вошедших в сигнатуру, указана над диаграммой). Уровень значимости дискриминации групп здоровых доноров (o) и пациенток (+) – 0,021.

Figure 2. 3D scatter plot of projected mean fluorescence intensities based on glycans, including to signature for 29 patients with metastatic BC (III stage) before therapy and 27 conditionally healthy donors

Note. X, Y and Z-axis, of the diagram are linear combinations of mean intensities for AGA, included to the signature (specificity of AGA is indicated above the diagram). Significance level for Healthy control subjects (o) and patients (+) – 0.021.

**ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:  
ПРЕССА РОССИИ – 15590**

ISSN 1028-7221



9 771234 567898