

БФУ

БАЛТИЙСКИЙ  
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ ИММАНУИЛА КАНТА

IKBFU

IMMANUEL KANT  
BALTIC FEDERAL  
UNIVERSITY



СОВРЕМЕННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ  
В БИОМЕДИЦИНЕ

2026 •  $\frac{\text{Том}}{\text{Vol.}}$  2 • № 1

ADVANCED TARGETS  
IN BIOMEDICINE

ISSN 3033-6740 (Online)

**БФУ** БАЛТИЙСКИЙ  
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ ИММАНИЛА КАНТА

**IKBFU** IMMANUEL KANT  
BAL TIC FEDERAL  
UNIVERSITY

# СОВРЕМЕННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ В БИОМЕДИЦИНЕ

2026 •  $\frac{\text{Том}}{\text{Vol.}}$  2 • № 1

## ADVANCED TARGETS IN BIOMEDICINE

Калининград  
Издательство Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта  
2026

**РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ**

*Л. С. Литвинова*, д-р мед. наук, проф., директор Центра иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта — главный редактор (Калининград, Россия)  
(AuthorID Scopus: 7007068521, <https://orcid.org/0000-0001-5231-6910>, ResearcherID: A-9672-2014)

*Д. Аточин*, д-р наук (биомедицина), Гарвардская медицинская школа (Бостон, США)  
(AuthorID Scopus: 6603545685, <https://orcid.org/0000-0002-2405-2070>)

*А. Г. Гончаров*, канд. мед. наук, доц., ст. науч. сотр. Центра иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта (Калининград, Россия)  
(AuthorID Scopus: 57196504924; <https://orcid.org/0000-0001-6967-8838>)

*А. Даринскас*, д-р наук (биомедицина), Институт онкологии, Вильнюсский университет (Вильнюс, Литва)  
(AuthorID Scopus: 8283876800; ResearcherID: HUY-8525-2022)

*Р. В. Деев*, канд. мед. наук, доц., первый заместитель директора НИИ морфологии человека им. акад. А. П. Авцына ФГБНУ РНЦХ им. акад. Б. В. Петровского, руководитель Лаборатории морфологии и патологии опорно-двигательного аппарата, заведующий кафедрой гистологии Медицинского университета Петровского (Москва, Россия)  
(AuthorID Scopus: 58898845100, <https://orcid.org/0000-0001-8389-3841>, ResearcherID: L-1658-2015)

*И. Н. Лаврик*, д-р наук (естественные науки), проф., Университет им. Отто фон Герике (Магдебург, Германия)  
(AuthorID Scopus: 6603297587; <https://orcid.org/0000-0002-9324-309X>; ResearcherID: C-1700-2009)

*М. Ю. Маслов*, д-р мед. наук, ведущ. науч. сотр., отделение болезней сердечно-сосудистой системы и метаболизма, Novartis Pharmaceuticals (Кембридж, США)  
(AuthorID Scopus: 7003427081; ResearcherID: HUY-8525-2022)

*С. Новицкий*, д-р наук (биомедицина), ведущ. науч. сотр., отделение онкологии, Amgen Inc. (Южный Сан Франциско, США)  
(AuthorID Scopus: 17344280000; ResearcherID: DJI-2306-2022)

*Ю. Л. Орлов*, д-р биол. наук, проф., Институт цифрового биодизайна и моделирования живых систем, Первый московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) (Москва, Россия)  
(AuthorID Scopus: 7102256498, <https://orcid.org/0000-0003-0587-1609>, ResearcherID: F-1520-2013)

*В. В. Рафальский*, д-р мед. наук, проф., Медицинский институт, БФУ им. И. Канта (Калининград, Россия)  
(AuthorID Scopus: 15023010400, <https://orcid.org/0000-0002-2503-9580>, ResearcherID: G-3172-2013)

*Г. Б. Сухоруков*, канд. физ.-мат. наук, проф., Сколковский институт науки и технологий (Москва, Россия)  
(AuthorID Scopus: 7006255547; ResearcherID: J-8338-2013)

*П. В. Федурев*, канд. биол. наук, доц., проректор по научной работе, БФУ им. И. Канта (Калининград, Россия)  
(AuthorID Scopus: 56663288700, <https://orcid.org/0000-0002-7577-6132>, ResearcherID: T-3035-2018)

*И. А. Хлусов*, д-р мед. наук, проф., рук. Лаборатории клеточных и микрофлюидных технологий, Сибирский государственный медицинский университет (Томск, Россия)  
(AuthorID Scopus: 7004826401; <https://orcid.org/0000-0003-3465-8452>, ResearcherID: A-4945-2014)

*К. А. Юрова*, д-р мед. наук, ст. науч. сотр., Центр иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта (Калининград, Россия)  
(AuthorID Scopus: 56520441800, <https://orcid.org/0000-0001-6146-3330>, ResearcherID: F-7614-2017)

**Учредитель**

Балтийский федеральный университет им. И. Канта

**Редакция**

236016, Россия, Калининград, ул. А. Невского, 14

**Издатель**

236016, Россия, Калининград, ул. А. Невского, 14

Журнал издаётся с 2025 г. Периодичность: 2 выпуска в год.  
Индексируется в РИНЦ

**EDITORIAL BOARD**

*Prof. Larisa S. Litvinova*, Dr. habil. (Medicine), Director of the Center for Immunology and Cellular Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Russia — Editor-in-chief  
(AuthorID Scopus: 7007068521, <https://orcid.org/0000-0001-5231-6910>, ResearcherID: A-9672-2014)

*Prof. Dmitriy Atochin*, Dr. habil. (Biomedicine),  
Assistant Professor, Harvard Medical School, USA  
(AuthorID Scopus: 6603545685, <https://orcid.org/0000-0002-2405-2070>)

*Adas Darinskas*, PhD (Biomedicine), Institute of Oncology, Vilnius University, Lithuania  
(AuthorID Scopus: 8283876800; ResearcherID: HIY-8525-2022)

*Prof. Roman V. Deev*, MD, PhD (Medicine), First Deputy Director of the A. P. Avtsyn Human Morphology Research Institute, of the FSBS B. V. Petrovsky Russian Scientific Center of Surgery, Head of the Laboratory of Morphology and Pathology of the Musculoskeletal System, Head of the Department of Histology, Petrovsky Medical University, Russia  
(AuthorID Scopus: 58898845100, <https://orcid.org/0000-0001-8389-3841>, ResearcherID: L-1658-2015)

*Prof. Andrei G. Goncharov*, PhD (Medicine), Senior Researcher, Center for Immunology and Cellular Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Russia  
(AuthorID Scopus: 57196504924; <https://orcid.org/0000-0001-6967-8838>)

*Pavel V. Feduraev*, PhD (Biology), Associate Professor, Vice-Rector for Research, Immanuel Kant Baltic Federal University, Russia  
(AuthorID Scopus: 56663288700, <https://orcid.org/0000-0002-7577-6132>, ResearcherID: T-3035-2018)

*Prof. Igor A. Khlusov*, MD, Dr. habil. (Medicine), Head of the Laboratory of Cellular and Microfluidic Technologies, Siberian State Medical University, Russia  
(AuthorID Scopus: 7004826401; <https://orcid.org/0000-0003-3465-8452>, ResearcherID: A-4945-2014)

*Prof. Inna Lavrik*, Dr. habil. (Natural Sciences),  
Otto von Guericke University Magdeburg, Germany  
(AuthorID Scopus: 6603297587; <https://orcid.org/0000-0002-9324-309X>; ResearcherID: C-1700-2009)

*Mikhail Maslov*, Dr. habil. (Medicine), Principal Scientist, Novartis Pharmaceuticals, USA  
(AuthorID Scopus: 7003427081; ResearcherID: HIY-8525-2022)

*Sergey V. Novitskiy*, Dr. habil. (Biomedicine),  
Principal Scientist, Oncology Department, Amgen Inc., USA  
(AuthorID Scopus: 17344280000; ResearcherID: DJI-2306-2022)

*Prof. Yuriy L. Orlov*, Dr. habil. (Biology), Institute of Digital Design and Simulation of Living Systems, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Russia  
(AuthorID Scopus: 7102256498, <https://orcid.org/0000-0003-0587-1609>, ResearcherID: F-1520-2013)

*Prof. Vladimir V. Rafalskiy*, Dr. habil. (Medicine), Medical Institute, Immanuel Kant Baltic Federal University, Russia  
(AuthorID Scopus: 15023010400, <https://orcid.org/0000-0002-2503-9580>, ResearcherID: G-3172-2013)

*Prof. Gleb B. Sukhorukov*, PhD (Physics, Mathematics),  
Skolkovo Institute of Science and Technology, Russia  
(AuthorID Scopus: 7006255547; ResearcherID: J-8338-2013)

*Kristina A. Yurova*, Dr. habil. (Medicine), Senior Researcher, Center for Immunology and Cellular Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Russia  
(AuthorID Scopus: 56520441800, <https://orcid.org/0000-0001-6146-3330>, ResearcherID: F-7614-2017)

**Founders**

Immanuel Kant Baltic Federal University

**Address**

14 A. Nevskogo St., Kaliningrad, Russia, 236016

**Editorial Office**

14 A. Nevskogo St., Kaliningrad, Russia, 236016

The journal has been published since 2025. Publication frequency: 2 issues per year.  
Indexed in the Russian Science Citation Index

## СОДЕРЖАНИЕ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>Воронкова О. В., Беспалова И. Д., Есимова И. Е., Осихов И. А.</i> Анализ экспрессии генов адипоцитов в жировой ткани у пациентов с метаболическим синдромом .....                                                                                                                       | 6   |
| <i>Трулев А. С., Кутукова Н. А., Кудрявцев И. В.</i> Роль Fcγ-рецепторов в реализации биологического действия С-реактивного белка на тучные клетки человека .....                                                                                                                          | 17  |
| <i>Курбатова О. В., Коняшин М. В., Анушенко А. О., Купцова Д. Г., Петричук С. В., Мовсисян Г. Б., Радыгина Т. В., Акулова С. С., Семикина Е. Л., Винокурова А. В., Потапов А. С., Фисенко А. П.</i> Иммунологические нарушения при гликогеновой болезни типа Ib (клинический случай) ..... | 46  |
| <i>Мусаходжаева Д. А., Азизова З. Ш., Исанбаева Л. М., Ишмуратова Л. Э.</i> Цитокиновая дисрегуляция в патогенезе эндометриоза, миомы матки и их сочетанной формы.....                                                                                                                     | 60  |
| <i>Кравцов И. В., Сюткина А. С., Нехаева Т. Л.</i> Современные иммунологические подходы к поиску биомаркеров эффективности и безопасности иммунотерапии в онкологии .....                                                                                                                  | 69  |
| <i>Гаврилова Е. Д., Гойман Е. В., Демченко Е. Н., Чуб Е. В., Вольский Н. Н., Козлов В. А.</i> Модулирование воспалительной реакции в экспериментальных моделях у мышей различных линий с использованием синтетических лигандов TLR9 .....                                                  | 89  |
| <i>Горохова А. В., Насибов Т. Ф., Рыжкова А. Ю., Лешенкова А. В., Порохова Е. Д., Дзюман А. Н., Авдеева Е. Ю., Белоусов М. В., Хлусов И. А.</i> Влияние хелидоновой кислоты природного происхождения на морфофункциональное состояние внутренних органов в эксперименте .....              | 101 |
| <i>Гимранова И. А., Акмалова Г. М., Гареев Е. М., Гриценко В. А.</i> Таксономические особенности оральных микробиомов у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта и их взаимосвязь с иммунологическими показателям .....                                                         | 124 |

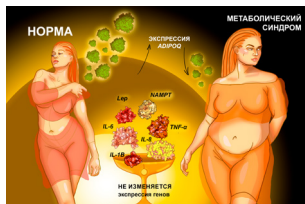
## CONTENTS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>Voronkova O. V., Bespalov I. D., Esimova I. E., Osikhov I. A.</i> Adipocytokine gene expression analysis in adipose tissue in patients with metabolic syndrome .....                                                                                                                    | 6   |
| <i>Trulioff A. S., Kutukova N. A., Kudriavtsev I. V.</i> The role of Fcγ-receptors in the biological action of C-reactive protein on human mast cells.....                                                                                                                                 | 17  |
| <i>Kurbatova O. V., Konyashin M. V., Anoushenko A. O., Kuptsova D. G., Petruchuk S. V., Movsisyan G. B., Radygina T. V., Akulova S. S., Semikina E. L., Vinokurova A. V., Potapov A. S., Fisenko A. P.</i> Immunological Disorders in Glycogen Storage Disease Type Ib: A Case Report..... | 46  |
| <i>Musakhodjaeva D. A., Azizova Z. Sh., Isanbaeva L. M., Ishmuratova L. E.</i> Cytokine dysregulation in the pathogenesis of endometriosis, uterine fibroids and their combined forms .....                                                                                                | 60  |
| <i>Kravtsov I. V., Syutkina A. S., Nekhaeva T. L.</i> Modern Immunological Approaches to the Search for Biomarkers Predicting Efficacy and Safety of Cancer Immunotherapy .....                                                                                                            | 69  |
| <i>Gavrilova E. D., Goiman E. V., Demchenko E. N., Chub E. V., Volsky N. N., Kozlov V. A.</i> Modulation of the inflammatory response in experimental models of mice of different strains using synthetic TLR9 ligands .....                                                               | 89  |
| <i>Gorokhova A. V., Nasibov T. F., Ryzhkova A. Yu., Leshenkova A. V., Porokhova E. D., Dzyuman A. N., Avdeeva E. Yu., Belousov M. V., Khlusov I. A.</i> The effect of naturally occurring chelidonic acid on the morphofunctional status of internal organs: an experimental study .....   | 101 |
| <i>Gimranova I. A., Akmalova G. M., Gareev E. M., Gritsenko V. A.</i> Taxonomic composition of the oral microbiome and its relationship with immune parameters in periodontal inflammatory disease .....                                                                                   | 124 |

Оригинальная исследовательская статья

## АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ АДИПОЦИТОВ В ЖИРОВОЙ ТКАНИ У ПАЦИЕНТОВ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

О. В. Воронкова, И. Д. Беспалова, И. Е. Есимова, И. А. Осихов\*



Сибирский государственный медицинский университет,  
634050, Россия, Томск

\* Автор-корреспондент: osikhov.25-88@yandex.ru

### Для цитирования:

Воронкова О. В., Беспалова И. Д.,  
Есимова И. Е., Осихов И. А. Анализ  
экспрессии генов адипоцитов  
в жировой ткани у пациентов  
с метаболическим синдромом.  
*Современные направления в биомеди-*  
*цине.* 2026;2(1):6–16.  
<https://doi.org/10.5922/ATB-2026-2-1-1>

Поступила  
19.01.2026 г.  
Прошла рецензирование  
23.02.2026 г.  
Принята к печати  
25.02.2026 г.  
Опубликована  
09.09.2026 г.

© Воронкова О. В., Беспалова И. Д.,  
Есимова И. Е., Осихов И. А., 2026  
© Оформление, БФУ им. И. Канта,  
2026

**Резюме:** Адипоциты, иммунные клетки и стромально-васкулярные элементы являются источником большого количества биологически активных веществ. Эффекты большинства адипоцитокинов хорошо изучены, однако роль отдельных молекул, секретируемых жировой тканью, в патогенезе воспаления при метаболическом синдроме (МС) и ассоциированных с ним заболеваний окончательно не выяснена и часто трактуется специалистами неоднозначно.

**Цель** — оценка экспрессии генов адипоцитокинов в биоптатах (фрагментах) висцеральной жировой ткани большого сальника у больных с МС.

**Материалы и методы.** В исследовании приняли участие 19 человек: основная группа — 14 пациентов с МС, группа сравнения — 5 пациентов без МС. В биоптатах жировой ткани большого сальника, полученных во время плановой эндоскопической холецистэктомии, исследовали уровень экспрессии генов цитокинов (*IL1B*, *IL6*, *IL8*, *TNF-α*) и пептидных гормонов (*LEP* (лептин), *NAMPT* (висфатин), *RETN* (резистин), *ADIPOQ* (адипонектин)) по уровню матричной РНК с помощью количественной ПЦР в реальном времени с предварительной наработкой комплементарной ДНК в реакции обратной транскрипции.

**Результаты.** Значимых различий по уровню мРНК *IL-1B*, *-6*, *-8*, *TNF-α*, а также гормонов *LEP*, *NAMPT*, *RETN* в жировой ткани у пациентов с МС и лиц группы сравнения выявлено не было ( $p > 0,05$ ). Статистически значимые различия были установлены только по уровню экспрессии гена *ADIPOQ*: у пациентов с МС уровень экспрессии гена *ADIPOQ* в жировой ткани оказался в среднем в 2,8 раза ниже, чем в группе сравнения (2,34 и 0,81 усл. ед. соответственно,  $p < 0,05$ ).

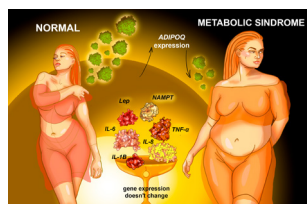
**Заключение.** Анализ профилей экспрессии генов ключевых адипоцитокинов, функциональных и метаболических особенностей висцеральной жировой ткани представляется перспективным для поиска диагностических и прогностических и маркеров МС и ассоциированных с ним заболеваний.

**Ключевые слова:** метаболический синдром, жировая ткань, адипоцитокины, экспрессия генов

Original research article

## ADIPOCYTOKINE GENE EXPRESSION ANALYSIS IN ADIPOSE TISSUE IN PATIENTS WITH METABOLIC SYNDROME

O. V. Voronkova, I. D. Beshpalova, I. E. Esimova, I. A. Osikhov\*



Siberian State Medical University,  
634050 Tomsk, Russia

\* Correspondence: osikhov.25-88@yandex.ru

### To cite this article:

Voronkova O. V.,  
Beshpalova I. D., Esimova I. E.,  
Osikhov I. A. Adipocytokine gene  
expression analysis in adipose tissue  
in patients with metabolic syndrome.  
*Advanced targets in Biomedicine*.  
2026;2(1):6–16.  
<https://doi.org/10.5922/ATB-2026-2-1-1>

### Received

19.01.2026

Revised

23.02.2026

Accepted

25.02.2026

Published

09.09.2026

© Voronkova O. V., Beshpalova I. D.,  
Esimova I. E., Osikhov I. A., 2026  
© Design, IKBFU, 2026

**Abstract:** Adipocytes, immune cells, and cells of the stromal vascular fraction are sources of many biologically active substances. The effects of most adipocytokines are well studied; however, the role of individual molecules secreted by adipose tissue in the pathogenesis of inflammation associated with metabolic syndrome (MS) and related diseases has not been fully elucidated and remains a matter of debate.

**Aim** — To evaluate the expression of adipocytokine genes in biopsies (fragments) of visceral adipose tissue of the gastrocolic omentum in patients with MS.

**Materials and methods.** The study included 19 patients: the main group — 14 patients with MS, the comparison group — 5 patients without MS. The level of expression of cytokine genes (*IL1B*, *IL6*, *IL8*, *TNF-α*) and peptide hormones (*LEP* (leptin), *NAMPT* (visfatin), *RETN* (resistin), *ADIPOQ* (adiponectin)) was studied in biopsies of adipose tissue of the greater omentum obtained during planned cholecystectomy for medical reasons by the level of matrix RNA using quantitative real-time PCR with preliminary development of complementary DNA in the reverse transcription reaction.

**Results.** There were no significant differences in the level of mRNA of *IL-1B*, *-6*, *-8*, *TNF-α*, as well as the hormones *LEP*, *NAMPT*, *RETN* in adipose tissue in patients with MS and in the comparison group ( $p > 0.05$ ). Statistically significant differences were established only in the level of *ADIPOQ* gene expression: the level of *ADIPOQ* gene expression in adipose tissue was on average 2.8 times lower than in the comparison group (2.34 and 0.81 units, respectively,  $p < 0.05$ ).

**Conclusion.** Analysis of the expression profiles of genes encoding key adipocytokines and of the functional and metabolic characteristics of visceral adipose tissue appears promising for identifying diagnostic and prognostic markers of MS and associated diseases.

**Keywords:** metabolic syndrome, adipose tissue, adipocytokines, gene expression

## Введение

Долгое время считалось, что жировая ткань выполняет лишь депонирующую функцию, в частности выступает в качестве резервного источника субстратов для энергетического обмена. В настоящее время доказано, что адипоциты обладают высокой секреторной активностью, а белая жировая ткань, являясь источником гормоноподобных веществ, реализует свои системные эффекты и значительно влияет на патогенез сердечно-сосудистых, неврологических, эндокринных и других заболеваний [1–3].

Хронический субклинический воспалительный процесс в висцеральной жировой ткани при ее избыточном накоплении является одним из патогенетических факторов метаболического синдрома (МС) — комплекса гормональных и метаболических нарушений у больных с атеросклерозом, гипертонией, ожирением и сахарным диабетом 2-го типа [4; 5].

Секреторный профиль адипоцитов характеризуется широким спектром биологически активных молекул с про- и противовоспалительными свойствами. К ним относятся пептидные гормоны (лептин, адипонектин, апелин, резистин, оментин, васпин, компоненты ренин-ангиотензиновой системы и др.), вазоактивные вещества (простагландины, лейкотриены и др.), хемокины и цитокины [6–8].

Эффекты большинства адипоцитокинов хорошо изучены, однако роль отдельных молекул, секретируемых жировой тканью, в патогенезе воспаления при МС и связанных с ним патологий окончательно не выяснена и часто трактуется специалистами неоднозначно. Например, общепринятым является представление об адипонектине как о гормоне с антиатерогенными, противовоспалительными и инсулинсенситизирующими свойствами [9]. В последние годы в научной литературе обсуждается феномен под названием «адипонектиновый парадокс», демонстрирующий неканонические провоспалительные эффекты адипонектина [10; 11]. В ряде исследований была обнаружена положительная взаимосвязь высокой сывороточной концентрации адипонектина с частотой неблагоприятных исходов у больных с хронической сердечной недостаточностью, развитием воспалительных и аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, сахарный диабет 1-го типа, хроническая обструктивная болезнь легких и др., а также некоторых видов рака [12–14].

Таким образом, сведения о физиологической и патологической роли адипокинов пополняются, однако механизмы реализации их плеiotропных эффектов до конца не изучены [9]. На наш взгляд, это связано с особенностями методических подходов к оценке секреторного потенциала клеточных элементов жировой ткани, поскольку в большинстве исследований их секреция исследуется по уровню концентрации анализируемых веществ в крови [14; 15]. Такой подход не позволяет в полной мере охарактеризовать секреторную активность непосредственно адипоцитов, поскольку сходный спектр, например интерлейкинов, характерен для клеток иммунной системы, эндотелиоцитов, фибробластов и др. [4]. Кроме того, при исследовании патогенетических факторов такого сложного симптомокомплекса, как МС, необходимо учитывать еще и такие аспекты, как коморбидный фон пациента, глубина нарушений обмена веществ (углеводного: уровень глюкозы, инсулина, индекс инсулинорезистентности (НОМА-IR); липидного: уровень общего холестерина, липопротеинов низкой плотности, триацилглицеролов), а также степень выраженности субклинического хронического воспаления, например по уровню белков острой фазы в крови: С-реактивного белка, неоптерина, фибриногена и др. [16].

Анализируя плеiotропные эффекты адипокинов, также следует принимать во внимание локализацию экспрессирующих их адипоцитов [17]. Например, при абдоминальном — метаболически неблагоприятном — варианте ожирения выраженная гипертрофия адипоцитов сопровождается накоплением в жировой ткани иммунных клеток (макрофагов и лимфоцитов), функциональная, в том числе секреторная, активность которых может значительно влиять на спектр продуцируемых адипоцитарных гормонов и других биологически активных веществ [18–20].

## Цель исследования

Цель исследования — оценить экспрессию генов адипоцитокинов в биоптатах висцеральной жировой ткани у лиц с метаболическим синдромом.

## Материалы и методы

В исследовании приняли участие 19 человек в возрасте от 26 до 70 лет (19 женщин), распределенных на 2 группы: в основную группу вошли пациенты с МС (всего 14 женщин, средний возраст —  $45,7 \pm 4,1$  лет, индекс массы тела (ИМТ)  $38,1 \pm 2,4$  кг/м<sup>2</sup>), в группу сравнения — пациенты без признаков МС (5 женщин), средний возраст —  $38,6 \pm 5,5$  лет, ИМТ  $23,5 \pm 4,3$  кг/м<sup>2</sup>). Диагностика составляющих МС проводилась в соответствии с рекомендациями Консенсуса Российского кардиологического общества и Российского научного медицинского общества терапевтов по критериям (на 2025 г.) при обнаружении трех показателей: одного основного и двух дополнительных. Основным критерий — абдоминальное ожирение, при котором окружность талии составляет  $>80$  см у женщин. Дополнительные критерии: артериальная гипертензия (артериальное давление  $\geq 130/80$  мм рт. ст. или прием гипотензивных препаратов), повышение концентрации холестерина липопротеидов низкой плотности ( $>3,0$  ммоль/л), снижение концентрации холестерина липопротеидов высокой плотности ( $<1,2$  ммоль/л), повышение уровня триацилглицеролов ( $\geq 1,7$  ммоль/л), гипергликемия натощак (концентрация глюкозы в плазме крови натощак  $\geq 6,1$  ммоль/л), нарушение толерантности к глюкозе (концентрация глюкозы в плазме крови через 2 ч после нагрузки глюкозой в пределах  $\geq 7,8$  и  $<11,1$  ммоль/л).

Все обследованные лица были госпитализированы в хирургический стационар для проведения плановой холецистэктомии по медицинским показаниям (желчно-каменная болезнь (ЖКБ)). Исследование было утверждено на заседании локального этического комитета СибГМУ (рег. № 2862 от 28.11.2011). Критерии исключения: наличие активного воспалительного процесса в желчном пузыре; присутствие осложнений ЖКБ и воспалительных процессов другой локализации, развитие злокачественных новообразований, системных заболеваний соединительной ткани, прием гормональных препаратов. Все пациенты, участвовавшие в исследовании, подписали информированное согласие.

Материалом для исследования были биоптаты висцеральной жировой ткани из большого сальника, которые получали в ходе эндоскопической операции. Биоптаты висцеральной жировой ткани в объеме 1 см<sup>3</sup> замораживали при  $-70$  °C в растворе для стабилизации РНК и хранения образцов (RNA-later, Thermo FS, США). Оценку уровня экспрессии мРНК адипоцитокинов клетками висцеральной жировой ткани проводили с применением количественной ПЦР в реальном времени. Из образцов жировой ткани выделяли общую РНК с помощью набора «Qiagen RNeasy Mini Kit Lipid Tissue» («QIAGEN», США). Оценку качества тотальной РНК определяли электрофоретическим методом по соотношению плотности бэндов, равноценных большой (28S) и малой (18S) рибосомным субъединицам рРНК.

В реакции обратной транскрипции с использованием обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей Молони (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, M-MLV RT) («Медиген», Россия) нарабатывали комплементарную ДНК. Далее осуществляли постановку ПЦР в реальном времени с использованием прямого и обратного праймеров для генов адипоцитокинов («Биосинтез», Россия):

- ИЛ-1 $\beta$  (ген *IL1B*: for 5'-ATG-GAC-AAG-CTG-AGG-AAG-ATG-3';  
— rev 5'-CCC-ATG-TGT-CGA-AGA-AGA-TAG-G-3');
- ИЛ-6 (ген *IL6*: for 5'-GAC-AGC-CAC-TCA-CCT-CTT-C-3';  
— rev 5'-GTG-CCT-CTT-TGC-TGC-TTT-C-3');
- ИЛ-8 (ген *IL8*: for 5'-GGA-CAA-GAG-CCA-GGA-AGA-AA-3';  
— rev 5'-GGG-TGG-AAA-GGT-TTG-GAG-TAT-3');
- TNF- $\alpha$  (ген *TNF- $\alpha$* : for 5'-CAG-GCA-GTC-AGA-TCA-TCT-TCT-C-3';

- rev 5'-CTG-GTT-ATC-TCT-CAG-CTC-CAC-3');
- адипонектин (ген *ADIPOQ*: for 5'-CAT-CTC-CTC-CTC-ACT-TCC-ATT-C-3';
- rev 5'-GTC-GTG-GTT-TCC-TGG-TCA-T-3');
- лептин (ген *LEP*: for 5'-AAG-CTG-TGC-CCA-TCC-AAA-3';
- rev 5'-GTC-CAA-ACC-GGT-GAC-TTT-CT-3');
- резистин (ген *RETN*: for 5'-AAT-GAG-AGG-ATC-CAG-GAG-GT-3';
- rev 5'-CTG-GCA-GTG-ACA-TGT-GGT-3');
- висфатин (ген *NAMPT*: for 5'-GTG-GAG-GTT-TGC-TAC-AGA-AGT-3';
- rev 5'-TGG-GTC-CTT-GAA-GAC-GTT-AAT-C-3').

ПЦР проводили в детектирующем термоциклере (MiniOpticon «Biorad», США). В качестве нормировочного гена использовали  $\beta$ -actin (бета-актин) (for 5'-CTG-GCA-CCC-AGC-ACA-ATG-3'; rev 5'-AGC-GAG-GCC-AGG-ATG-GA-3'). Количество ДНК в пробах было представлено в виде процентов от количества бета-актина (сравнительный Ст-метод). При анализе результатов ПЦР в реальном времени оперировали абсолютными значениями концентраций (копий на мл), полученными по прибору. Производили расчет средних значений для дублей по бета-актину в отдельности для каждого образца ДНК. Вслед за этим значения концентраций по каждому гену для данного образца делили на среднее значение для дублей по бета-актину для этого образца. По полученным процентным значениям рассчитывали средние для дублей и использовали эти показатели в последующих исследованиях (усл. ед.) [21].

Результатом циклического процесса ПЦР является экспоненциальное увеличение количества специфического фрагмента ДНК, которое можно описать формулой  $A = M \cdot 2^n$ , где  $A$  — количество специфических (ограниченных праймерами) продуктов реакции амплификации после завершения цикла  $n$ ;  $M$  — начальное количество ДНК-мишеней;  $n$  — число циклов амплификации;  $2$  — коэффициент эффективности реакции ПЦР (эффективность ПЦР). Реальное значение эффективности отдельных циклов амплификации может быть, по некоторым данным, от 78 до 97 %. Если в пробе присутствуют ингибиторы реакции, то имеющиеся значения могут быть намного меньше, поэтому фактическое количество специфических продуктов амплификации описывали по формуле  $A(n) = M \cdot (1 + E)^n$ ,  $0 < E < 1$ , где  $E$  — значение эффективности реакции. В процессе амплификации на исходной цепи синтезируются также и длинные фрагменты, но их накопление происходит в арифметической прогрессии по формуле  $K(n) = M \cdot n$ , где  $K(n)$  — количество длинных продуктов амплификации (фрагментов), полученных после цикла  $n$  [22; 23].

При оценке полученных данных были использованы методы статистического описания, а также методы проверки статистических гипотез. Статистическую обработку полученных результатов проводили путем создания единой электронной базы данных с использованием пакета «Microsoft Office Access 2016» и последующей обработкой полученных результатов с использованием пакета программ STATISTICA 10.0 (StatSoft, Inc., USA). Количественные данные, не подчиняющиеся нормальному закону, представляли в виде медианы, интерквартильного размаха 25-го и 75-го перцентилей —  $Me$  (LQ; UQ). Проверку нормальности распределения проводили методом Шапиро — Уилка и представляли в виде среднего и стандартного отклонения ( $M \pm SD$ ). При отсутствии нормального распределения при сравнении средних групповых количественных признаков применяли тест Манна — Уитни (U-тест) или t-критерия Стьюдента. Различие двух сравниваемых величин полагали достоверным при уровне значимости  $p < 0,05$ . Качественные признаки были представлены в виде  $n$ , % (число больных с данным признаком, % от их количества в группе). Для оценки статистической взаимосвязи между показателями вычисляли коэффициент ранговой корреляции Спирмена ( $r$ ). Для анализа связи между независимыми переменными и зависимой переменной использовали логистический регрессионный анализ (с целью приведения распределения к нормальному, применяли логарифмическое преобразование данных), определяя коэффициент корреляции ( $R$ ).

## Результаты

Способность синтезировать и секретировать большое количество медиаторов, включая цитокины, хемокины, белки внеклеточного матрикса, гормоны, факторы роста и вазоактивные вещества, определяет функциональный плеiotропизм висцеральной жировой ткани и ее системное влияние на различные физиологические и патологические процессы в организме [24; 25].

Доказано, что воспаление жировой ткани представляет важный компонент МС [4; 5]. Морфологическую основу такого воспаления составляют как гипертрофированные адипоциты, так и иммунокомпетентные клетки: лейкоциты — нейтрофильные гранулоциты, лимфоциты, макрофаги с провоспалительным фенотипом (M1), инфильтрирующие жировую ткань [26; 27].

В ходе проведенного исследования было выявлено, что экспрессия генов провоспалительных цитокинов и пептидных гормонов происходит в висцеральной жировой ткани как у пациентов с МС, так и у лиц без проявлений МС (табл. 1). Статистически значимых различий по уровню мРНК *IL-1B*, *-6*, *-8*, *TNF-α*, а также гормонов *LEP*, *NAMPT*, *RETN* в жировой ткани у пациентов с МС и лиц группы сравнения выявлено не было.

Таблица 1

Уровень экспрессии мРНК адипоцитокинов в жировой ткани большого сальника у пациентов с метаболическим синдромом, Me (LQ; UQ)

Table 1

The level of adipocytokine mRNA expression in the adipose tissue of the greater omentum in patients with metabolic syndrome, Me (LQ; UQ)

| Анализируемый параметр                     | Обследованные пациенты |                   | p     |
|--------------------------------------------|------------------------|-------------------|-------|
|                                            | Без МС (n = 5)         | С МС (n = 14)     |       |
| Ген <i>IL1B</i> ( <i>IL-1β</i> ), усл. ед. | 0,75 (0,27; 0,81)      | 0,37 (0,31; 0,56) | >0,05 |
| Ген <i>IL6</i> ( <i>IL-6</i> ), усл. ед.   | 1,27 (0,33; 1,32)      | 0,66 (0,39; 2,38) | >0,05 |
| Ген <i>IL8</i> ( <i>IL-8</i> ), усл. ед.   | 0,05 (0,001; 0,22)     | 0,05 (0,01; 0,15) | >0,05 |
| Ген <i>TNF</i> ( <i>TNF-α</i> ), усл. ед.  | 1,94 (1,45; 1,98)      | 1,36 (1,07; 1,96) | >0,05 |
| Ген <i>LEP</i> (лептин), усл. ед.          | 0,20 (0,02; 0,31)      | 0,16 (0,05; 0,31) | >0,05 |
| Ген <i>NAMPT</i> (висфатин), усл. ед.      | 0,21 (0,17; 0,21)      | 0,16 (0,14; 0,20) | >0,05 |
| Ген <i>RETN</i> (резистин), усл. ед.       | 0,14 (0,143; 0,28)     | 0,17 (0,14; 0,22) | >0,05 |
| Ген <i>ADIPOQ</i> (адипонектин), усл. ед.  | 2,34 (2,26; 2,54)      | 0,81 (0,59; 1,34) | <0,05 |

Примечание: p — статистическая значимость межгрупповых различий.

Note: p — statistical significance of intergroup differences.

Статистически значимые различия были обнаружены только по уровню экспрессии гена *ADIPOQ*. Так, в группе пациентов с МС уровень экспрессии гена *ADIPOQ* в жировой ткани оказался в среднем в 2,8 раза ниже, чем в группе сравнения ( $p < 0,05$ ).

## Обсуждение

Ряд научно-исследовательских работ свидетельствует о том, что в отличие от других адипоцитокинов уровень продукции адипонектина в висцеральной жировой ткани при МС и ожирении и его концентрация в крови снижаются [28—31].

Установлено, что только в зрелых клетках висцеральной жировой ткани (адипоцитах) осуществляется экспрессия гена *ADIPOQ*. При этом реализуется аутокринный эффект адипонектина — дифференцировка адипоцитов развивается быстрее [29; 31].

Следовательно, снижение продукции адипонектина при ожирении носит компенсаторный характер и составляет часть механизмов, ориентированных на ограничение роста жировой ткани [32]. Помимо этого адипонектин способен оказывать влияние на метаболические процессы за счет цитокиноподобного действия. Так, в эксперименте на мышах — моделях ожирения было продемонстрировано, что гиперэкспрессия гена адипонектина вызывала снижение инфильтрации жировой ткани мононуклеарными лейкоцитами и стимулировала угнетение секреции провоспалительных цитокинов [33; 34]. Таким образом, снижение экспрессии гена *ADIPOQ* при метаболическом синдроме можно рассматривать как один из патогенетических факторов, способствующих развитию метаболического воспалительного процесса в жировой ткани.

Согласно литературным источникам, некоторые цитокины, такие как ИЛ-6, TNF- $\alpha$ , тормозят экспрессию гена адипонектина [35—37]. Мы не выявили изменений в экспрессии генов биоптатов жировой ткани в отношении провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , -6, -8, TNF- $\alpha$ ), вероятно, ввиду методологических ограничений исследования. Был проведен анализ мРНК — начальный этап экспрессии генов [38], а также использованы образцы висцеральной жировой ткани только одной локализации (большой сальник) и малый объем выборки (19 человек). Однако наши результаты в отношении экспрессии генов *ADIPOQ*, *IL-6* и *TNF- $\alpha$*  в жировой ткани большого сальника согласуются с данными, полученными L. Litvinova et al. [39]. Авторы исследовали особенности экспрессионной активности жировой ткани различной локализации у пациентов с МС и при сравнении экспрессии генов адипокинов в жировой ткани большого сальника, брыжейки и подкожного жирового депо зарегистрировали повышенный уровень экспрессии генов *IL6* и *TNF- $\alpha$*  только в брыжеечной жировой ткани.

В работе М. А. Василенко отмечено, что непосредственно функциональная активность жировой ткани брыжейки тонкого кишечника (а не подкожной жировой ткани или большого сальника) играет значимую роль в патогенезе инсулинорезистентности при ожирении, что доказано повышенным уровнем экспрессии в биоптатах генов *LEP*, *SERPINA12*, *RARRES2*, *IL6* и *TNF- $\alpha$* , кодирующих соответственно лептин, васпин, химерин, ИЛ-6 и TNF- $\alpha$  [40]. Эти данные соответствуют современным представлениям о функциональной гетерогенности различных жировых депо [41; 42].

## Заключение

В результате сравнительного анализа экспрессии генов адипоцитокинов нами было установлено снижение более чем в 2,5 раза экспрессии гена *ADIPOQ* в жировой ткани большого сальника у пациентов с метаболическим синдромом при сопоставимых с контрольными значениями уровнях экспрессии генов, кодирующих провоспалительные цитокины (ИЛ-1 $\beta$ , -6, -8, TNF- $\alpha$ ), лептин, висфатин и резистин. Особенности клеточного состава жировой ткани (адипоциты, стромальные клетки, макрофаги, лимфоциты, гранулоциты) и широкий спектр секретируемых биологически активных веществ (компоненты экстрацеллюлярного матрикса, гормоны, цитокины, хемокины, вазоактивные вещества) определяют необходимость использования дифференциальных подходов к анализу метаболической и функциональной активности жировой ткани разной локализации. Анализ профилей экспрессии генов ключевых адипоцитокинов, функциональных и метаболических особенностей висцеральной жировой ткани представляется перспективным для поиска диагностических и прогностических и маркеров метаболического синдрома и сопряженных с ним патологий.

**Финансирование.** Это исследование не получало внешнего финансирования.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи. Все авторы утвердили окончательную

версию рукописи и принимают на себя ответственность за все аспекты работы, подразумевающую надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью или добросовестностью любой части работы.

#### **Вклад авторов:**

**О. В. Воронкова** — разработка концепции и дизайна научной работы, составление текста рукописи и критический пересмотр рукописи;

**И. Д. Беспалова** — проведение обследования, лечение пациентов, статистический анализ;

**И. Е. Есимова** — сбор данных, анализ и интерпретация данных, статистический анализ;

**И. А. Осихов** — сбор данных, анализ и интерпретация данных, составление текста рукописи.

**Funding.** This study received no external funding.

**Conflict of Interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article. All authors approved the final version of the manuscript and take responsibility for all aspects of the work, including ensuring that any questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

#### **Authors' contribution:**

**O. V. Voronkova** — development of the concept and design of scientific work, drafting of the manuscript text and critical revision of the manuscript;

**I. D. Bepalova** — conducting an examination, patient treatment, statistical analysis;

**I. E. Esimova** — data collection, data analysis and interpretation, statistical analysis;

**I. A. Osikhov** — data collection, data analysis and interpretation, drafting of the manuscript text.

## **Список литературы**

1. Harvey I., Boudreau A., Stephens J. M. Adipose tissue in health and disease. *Open Biol.* 2020, 10(12), 200291, DOI: 10.1098/rsob.200291.
2. Brandao B. B., Poojari A., Rabiee A. Thermogenic Fat: Development, Physiological Function, and Therapeutic Potential. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22(11), 5906, DOI: 10.3390/ijms22115906.
3. Чернядьева Т. И., Бонцевич Р. А., Гаус О. В. Эндокринные гастроэнтерологические аспекты метаболической дисфункции. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2024, 229(9), 36—43, DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-229-9-36-43.
4. Беспалова И. Д., Рязанцева Н. В., Калюжин В. В., Афанасьева Д. С., Мурашев Б. Ю., Осихов И. А. Системное воспаление в патогенезе метаболического синдрома и ассоциированных с ним заболеваний. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск).* 2013, 117(2), 5—9.
5. Беспалова И. Д., Калюжин В. В., Мурашев Б. Ю., Осихов И. А., Кощавцева Ю. И., Тетенева А. В., и др. Субпопуляционный состав и прооксидантная активность клеток висцеральной жировой ткани пациенток с метаболическим синдромом. *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины.* 2022, 37(3), 114—120, DOI: 10.29001/2073-8552-2022-37-3-114-120.
6. Stolarczyk E. Adipose tissue inflammation in obesity: a metabolic or immune response? *Curr. Opin. Pharmacol.* 2017, 37, 35—40, DOI: 10.1016/j.coph.2017.08.006.
7. Kawai T., Autieri M. V., Scalia R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2021, 320(3), C375—C391, DOI: 10.1152/ajpcell.00379.2020.
8. Кириллова Е. Д., Вторушина В. В., Кречетова Л. В., Иванец Т. Ю., Чернуха Г. Е. Избыток жировой ткани и хроническое субклиническое воспаление при синдроме поликистозных яичников. *Акушерство и гинекология.* 2023, 4, 111—119, DOI: 10.18565/aig.2023.56.
9. Шкляев С. С., Мельниченко Г. А., Волеводз Н. Н., Фалалеева Н. А., Иванов С. А., Каприн А. Д., и др. Адипонектин: плейотропный гормон с множеством функций. *Проблемы эндокринологии.* 2021, 67(6), 98—112, DOI: 10.14341/probl12827.

10. Шишкина В. В., Глухов А. А., Андреев А. А., Коваленко Н. С., Елисеев М. В., Лаптиёва А. Ю., и др. Адипоциты и роль их гормональной активности в развитии ожирения. Ожирение и метаболизм. 2025, 22(3), 245—254, DOI: 10.14341/omet13149.
11. Cybulska A. M., Schneider-Matyka D., Walaszek I., Panczyk M., Ćwiek D., Lubkowska A., et al. Predictive biomarkers for cardiometabolic risk in postmenopausal women: insights into visfatin, adropin, and adiponectin. *Front. Endocrinol.* 2025, 16, 1527567, DOI: 10.3389/fendo.2025.1527567.
12. Menzaghi C., Trischitta V. The adiponectin paradox for all-cause and cardiovascular mortality. *Diabetes.* 2018, 67(1), 12—22, DOI: 10.2337/dbi17-0016.
13. Choi H. M., Doss H. M., Kim K. S. Multifaceted Physiological Roles of Adiponectin in inflammation and diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21(4), 1219, DOI: 10.3390/ijms21041219.
14. Lee C. H., Lui D., Cheung C., Fong C., Yuen M., Chow W. S., et al. Higher circulating adiponectin concentrations predict incident cancer in type 2 diabetes — The adiponectin paradox. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2020, 105(4), e1387—e1396, DOI: 10.1210/clinem/dgaa075.
15. Климонтов В. В., Булумбаева Д. М., Бгатова Н. П., Таскаева Ю. С., Орлов Н. Б., Фазулли-на О. Н., и др. Концентрации адипокинов в сыворотке крови у пациентов с сахарным диабетом 2 типа: взаимосвязи с распределением, гипертрофией и васкуляризацией подкожной жировой ткани. *Сахарный диабет.* 2019, 22(4), 336—347, DOI: 10.14341/DM10129.
16. Айрапетян С. А., Шишкин А. Н. Современные представления о лабораторных маркерах метаболического синдрома. *Juvenis Scientia.* 2025, 11(2), 5—20, DOI: 10.32415/jscientia\_2025\_11\_2\_5-20.
17. Семикова Г. В., Халимов Ю. Ш., Волкова А. Р. Патофизиологические и клинические аспекты старения жировой ткани. *Ожирение и метаболизм.* 2025, 22(1), 41—51, DOI: 10.14341/omet13069.
18. Вербовой А. Ф., Вербовая Н. И., Долгих Ю. А. Ожирение — основа метаболического синдрома. *Ожирение и метаболизм.* 2021, 18(2), 142—149, DOI: 10.14341/omet12707.
19. Кытикова О. Ю., Антонюк М. В., Кантур Т. А., Новгородцева Т. П., Денисенко Ю. К. Распространенность и биомаркеры метаболического синдрома. *Ожирение и метаболизм.* 2021, 18(3), 302—312, DOI: 10.14341/omet12704.
20. Дедов И. И., Шестакова М. В., Мельниченко Г. А., Мазурина Н. В., Андреева Е. Н., Бондаренко И. З., Гусова З. Р., и др. Междисциплинарные клинические рекомендации «Лечение ожирения и коморбидных заболеваний». *Ожирение и метаболизм.* 2021, 18(1), 5—99, DOI: 10.14341/omet12714.
21. Livak K. J., Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001, 25(4), 402—408, DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
22. Гарафутдинов Р. Р., Баймиев Ан. Х., Малеев Г. В., Алексеев Я. И., Зубов В. В., Чемерис Д. А., и др. Разнообразие праймеров для ПЦР и принципы их подбора. *Биомика.* 2019, 11(1), 23—70, DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-04.
23. Баранова Е. Е., Гнетецкая В. А., Беленикин М. С. Неинвазивное определение пола и резус-фактора плода методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. М.: ФГБОУ ДПО РМАНПО. 2018, 56 с., ISBN 978-5-7249-2913-4.
24. Burhans M. S., Hagman D. K., Kuzma J. N., Schmidt K. A., Kratz M. Contribution of Adipose Tissue Inflammation to the Development of Type 2 Diabetes Mellitus. *Compr. Physiol.* 2018, 9(1), 1—58, DOI: 10.1002/cphy.c170040.
25. Koenen M., Hill M. A., Cohen P., Sowers J. R. Obesity, Adipose Tissue and Vascular Dysfunction. *Circ. Res.* 2021, 128(7), 951—968, DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.121.318093.
26. Engin A. The Pathogenesis of Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2017, 960, 221—245, DOI: 10.1007/978-3-319-48382-5\_9.
27. Shapiro H., Lutaty A., Ariel A. Macrophages, meta-inflammation, and immuno-metabolism. *Scientific World Journal.* 2011, 11, 2509—2529, DOI: 10.1100/2011/397971.

28. Frühbeck G., Catalan V., Rodríguez A., Ramírez B., Becerril S., Salvador J., et al. Adiponectin-leptin Ratio is a Functional Biomarker of Adipose Tissue Inflammation. *Nutrients*. 2019, 11(2), 454, DOI: 10.3390/nu11020454.
29. Reneau J., Goldblatt M., Gould J., Kindel T., Kastenmeier A., Higgins R., et al. Effect of adiposity on tissue-specific adiponectin secretion. *PLoS One*. 2018, 13(6), e0198889, DOI: 10.1371/journal.pone.0198889.
30. Motoshima H., Wu X., Sinha M. K., Hardy V. E., Rosato E. L., Barbot D. J., et al. Differential regulation of adiponectin secretion from cultured human omental and subcutaneous adipocytes: effects of insulin and rosiglitazone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002, 87(12), 5662–5667, DOI: 10.1210/jc.2002-020635.
31. Drolet R., Belanger C., Fortier M., Huot C., Mailloux J., Legare D., et al. Fat depot-specific impact of visceral obesity on adipocyte adiponectin release in women. *Obesity (Silver Spring)*. 2009, 17(3), 424–430, DOI: 10.1038/oby.2008.555.
32. Алфёрова В. И., Мустафина С. В. Адипоцитокины сквозь призму метаболических фенотипов человека. *Доктор.Ру*. 2023, 22(4), 18–23, DOI: 10.31550/1727-2378-2023-22-4-18-23.
33. Маркова Т. Н., Мищенко Н. К., Петина Д. В. Адипоцитокины: современный взгляд на дефиницию, классификацию и роль в организме. *Проблемы Эндокринологии*. 2022, 68(1), 73–80, DOI: 10.14341/probl12805.
34. Yadav A., Kataria M. A., Saini V., Yadav A. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. *Clin. Chim. Acta*. 2013, 417, 80–84, DOI: 10.1016/j.cca.2012.12.007.
35. Таянский Д. А., Денисенко А. Д. Влияние адипонектина на обмен углеводов, липидов и липопротеинов: анализ сигнальных механизмов. *Ожирение и метаболизм*. 2021, 18(2), 103–111, DOI: 10.14341/omet12754.
36. Kim J. Y., van de Wall E., Laplante M., Azzara A., Trujillo M. E., Hofmann S. M., et al. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 2007, 117(9), 2621–2637, DOI: 10.1172/JCI31021.
37. Graff E. C., Fang H., Wanders D., Judd R. L. The Absence of Adiponectin Alters Niacin's Effects on Adipose Tissue Inflammation in Mice. *Nutrients*. 2020, 12(8), 2427, DOI: 10.3390/nu12082427.
38. Liu M., Liu F. Transcriptional and post-translational regulation of adiponectin. *Biochem. J.* 2009, 425(1), 41–52, DOI: 10.1042/BJ20091045.
39. Litvinova L., Atochin D., Vasilenko M., Fattakhov N., Zatolokin P., Vaysbeyn I., et al. Role of adiponectin and proinflammatory gene expression in adipose tissue chronic inflammation in women with metabolic syndrome. *Diabetol. Metab. Syndr.* 2014, 6(1), 137, DOI: 10.1186/1758-5996-6-137.
40. Василенко М. А. Роль тканеспецифической продукции адипокинов и провоспалительных молекул в развитии инсулинорезистентности при ожирении. Диссертация к. б. н., Калининград, 2016, 191.
41. Романцова Т. И. Жировая ткань: цвета, депо и функции. *Ожирение и метаболизм*. 2021, 18(3), 282–301, DOI: 10.14341/omet12748.
42. Ким О. Т., Дадаева В. А., Нуруллина Г. И., Драпкина О. М. Хроническое воспаление при ассоциированных с ожирением заболеваниях. *Профилактическая медицина*. 2025, 28(1), 115–121, DOI: 10.17116/profmed202528011115.

## Об авторах

**Ольга Владимировна Воронкова**, доцент, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой биологии и генетики, Сибирский государственный медицинский университет, Россия.

ORCID: 0000-0001-9478-3429

E-mail: voronkova-ov@yandex.ru

**Инна Давидовна Беспалова**, доцент, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой пропедевтики внутренних болезней с курсом терапии педиатрического факультета, Сибирский государственный медицинский университет, Россия.

ORCID: 0000-0002-4513-6329

E-mail: innadave@mail2000.ru

**Ирина Евгеньевна Есимова**, доцент, доктор медицинских наук, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, профессор кафедры биологии и генетики, Сибирский государственный медицинский университет, Россия.

ORCID: 0000-0002-7508-2878

E-mail: orevi@mail.ru

**Иван Анатольевич Осихов**, доцент, кандидат медицинских наук, доцент кафедры биологии и генетики, Сибирский государственный медицинский университет, Россия.

ORCID: 0000-0002-4873-7680

E-mail: osikhov.25-88@yandex.ru

## The authors

**Olga V. Voronkova**, Associate Professor, Dr. habil. (Medicine), Head of the Department of Biology and Genetics, Siberian State Medical University, Russia.

ORCID: 0000-0001-9478-3429

E-mail: voronkova-ov@yandex.ru

**Inna D. Bespalova**, Associate Professor, Dr. habil. (Medicine), Head of the Department of Propaedeutics of Internal Diseases, the Faculty of Pediatrics, Siberian State Medical University, Russia.

ORCID: 0000-0002-4513-6329

E-mail: innadave@mail2000.ru

**Irina E. Esimova**, Associate Professor, Dr. habil. (Medicine), Professor, the Department of Biochemistry and Molecular Biology; Professor, the Department of Biology and Genetics, Siberian State Medical University, Russia.

ORCID: 0000-0002-7508-2878

E-mail: orevi@mail.ru

**Ivan A. Osikhov**, Associate Professor, PhD (Medicine), the Department of Biology and Genetics, Siberian State Medical University, Russia.

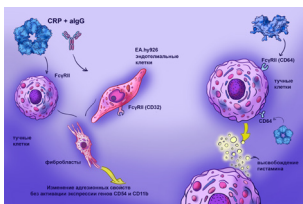
ORCID: 0000-0002-4873-7680

E-mail: osikhov.25-88@yandex.ru

Оригинальная исследовательская статья

## РОЛЬ Fcγ-РЕЦЕПТОРОВ В РЕАЛИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА НА ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА

А. С. Трулев<sup>1\*</sup>, Н. А. Кутукова<sup>1</sup>, И. В. Кудрявцев<sup>2</sup>



<sup>1</sup> Лаборатория общей иммунологии,  
Институт экспериментальной медицины,  
197022, Россия, Санкт-Петербург

<sup>2</sup> Лаборатория клеточной иммунологии,  
Институт экспериментальной медицины,  
197022, Россия, Санкт-Петербург

\* Автор-корреспондент: trulioff@gmail.com

### Для цитирования:

Трулев А. С., Кутукова Н. А.,  
Кудрявцев И. В. Роль  
Fcγ-рецепторов в реализации био-  
логического действия С-реактивного  
белка на тучные клетки человека.  
*Современные направления в биомеди-  
цине.* 2026;2(1):17—45.  
<https://doi.org/10.5922/ATB-2026-2-1-2>

Поступила  
10.03.2026 г.  
Прошла рецензирование  
27.04.2026 г.  
Принята к печати  
30.04.2026 г.  
Опубликована  
09.09.2026 г.

© Трулев А. С., Кутукова Н. А.,  
Кудрявцев И. В. 2026  
© Оформление, БФУ им. И. Канта,  
2026

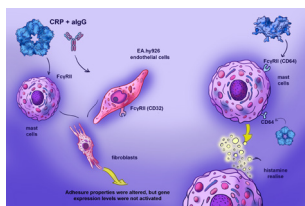
**Аннотация:** Современные данные убедительно подтверждают ключевую роль тучных клеток в запуске провоспалительных реакций и регенераторные свойства фибробластов на этапе разрешения воспалительного процесса. Тем не менее вопросы их синергии в острой фазе воспалительного ответа, включая влияние белков острой фазы на межклеточную коммуникацию, остаются малоисследованными. В рамках настоящей работы при помощи проточной цитометрии и количественной флуоресцентной оценки клеточной адгезии мы смогли показать, что стимуляция Fcγ-рецепторов тучных клеток линии НМС-1 специфическими лигандами (С-реактивный белок, агрегированные иммуноглобулины G, сывороточный Р-компонент амилоида) приводит к усилению адгезивных свойств клеток к элементам стромы — фибробластам и межклеточному матриксу. Примечательно, что нативные тучные клетки НМС-1 не демонстрируют секреторного ответа на стимуляцию С-реактивного белка в виде высвобождения гистамина. Способность к запуску дегрануляционной реакции с выделением гистамина при контакте с С-реактивным белком связана с экспрессией высокоаффинных FcγRI-рецепторов, индуцируемой на мембране тучных клеток под действием IFNγ. Эти данные раскрывают новые аспекты регуляции межклеточных взаимодействий в условиях острого воспаления, подчеркивая роль цитокиновой модуляции в реализации эффекторных функций иммунокомпетентных клеток.

**Ключевые слова:** тучные клетки, воспаление, С-реактивный белок, Fcγ-рецепторы

Original research article

## THE ROLE OF Fc $\gamma$ -RECEPTORS IN THE BIOLOGICAL ACTION OF C-REACTIVE PROTEIN ON HUMAN MAST CELLS

A. S. Trulioff<sup>1\*</sup>, N. A. Kutukova<sup>1</sup>, I. V. Kudriavtsev<sup>2</sup>



<sup>1</sup> Laboratory of General Immunology, Institute  
of Experimental Medicine,  
197022, St. Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Laboratory of Cellular Immunology,  
Institute of Experimental Medicine,  
197022, St. Petersburg, Russia

\* Corresponding author: trulioff@gmail.com

### To cite this article:

Trulioff A. S., Kutukova N. A.,  
Kudriavtsev I. V. The role  
of Fc $\gamma$ -receptors in the biological  
action of C-reactive protein on human  
mast cells. *Advanced Targets  
in Biomedicine*. 2026;2(1):17–45.  
<https://doi.org/10.5922/ATB-2026-2-1-2>

Received  
10.03.2026  
Revised  
27.04.2026  
Accepted  
30.04.2026  
Published  
09.09.2026

© Trulioff A. S., Kutukova N. A.,  
Kudriavtsev I. V., 2026  
© Design, IKBFU, 2026

**Abstract:** Current evidence convincingly supports the key role of mast cells in triggering pro-inflammatory reactions, and of fibroblasts in tissue regeneration during the resolution phase of inflammation. Nevertheless, questions concerning their synergy during the acute phase of the inflammatory response — including the influence of acute-phase proteins on intercellular communication — remain poorly studied. In this work, using flow cytometry and quantitative fluorescence-based assessment of cell adhesion, we demonstrate that stimulation of Fc $\gamma$  receptors on HMC-1 mast cells with specific ligands (C-reactive protein, aggregated immunoglobulin G, and serum amyloid P component) enhances the adhesive properties of these cells toward stromal elements — fibroblasts and the extracellular matrix. Notably, native HMC-1 mast cells did not show a secretory response to C-reactive protein stimulation in the form of histamine release. The ability to trigger a degranulation response with histamine release upon contact with C-reactive protein was associated with the expression of high-affinity Fc $\gamma$ RI receptors, induced on the mast cell membrane by IFN $\gamma$ . These findings reveal new aspects of the regulation of intercellular interactions under conditions of acute inflammation, highlighting the role of cytokine modulation in the effector functions of immunocompetent cells.

**Keywords:** mast cells, inflammation, C-reactive protein, Fc $\gamma$ -receptors

## Введение

Тучные клетки (мастоциты) (ТК) представляют собой полифункциональные элементы иммунной системы, участвующие не только в аллергических реакциях, но и в широком спектре физиологических и патологических процессов. Эволюционно эти клетки возникли рано: их аналоги обнаружены у асцидий и членистоногих, где они выполняют функции, сходные с тучными клетками млекопитающих [1]. Современные исследования расширили представления о роли мастоцитов, подтвердив их участие в противовирусном и антибактериальном ответе, формировании иммунной толерантности, ангиогенезе и репарации тканей. Их дисфункция ассоциирована с развитием ревматоидного артрита [2], рассеянного склероза [3] и фиброзных заболеваний [5].

Локализация мастоцитов в организме имеет выраженную специфику. Они концентрируются вблизи эпителиальных барьеров — кожи, слизистых желудочно-кишечного тракта и воздухоносных путей. Примечательно, что их распределение подчиняется двум закономерностям: плотность возрастает ближе к эпидермису и в дистальных зонах (кожа лица, ладоней), что коррелирует с повышенным риском контакта с патогенами [6]. В отличие от других гемопоэтических клеток зрелые мастоциты не циркулируют в крови, а резидентно закрепляются в тканях. Механизмы их миграции остаются предметом дискуссий, однако ключевую роль в этом процессе играют взаимодействия адгезивных молекул с компонентами внеклеточного матрикса [7].

Фибробласты как основные стромальные клетки соединительной ткани формируют микроокружение для созревания и функционирования мастоцитов. Активация последних инициирует каскад воспалительных реакций: через выделение медиаторов (гистамин, цитокины) усиливается сосудистая проницаемость, что клинически проявляется классической тетрадой воспаления: гиперемией, отеком, гипертермией и болью [8].

Особый интерес представляют пентраксины — белки острой фазы, включая С-реактивный белок (CRP) и сывороточный амилоидный Р-компонент (SAP). Эти олигомерные структуры выполняют опсонизирующую функцию, связывают апоптотические клетки и регулируют активность комплемента [9]. Динамика их синтеза при воспалении различается: уровень CRP возрастает в 100—1000 раз (до 200 мкг/мл), тогда как концентрация SAP колеблется незначительно (около 30 мкг/мл) [10]. CRP взаимодействует с широким спектром лигандов, включая фибронектин, ламинин и патоген-ассоциированные молекулы, что указывает на его роль в модуляции межклеточных взаимодействий [11].

Несмотря на обширные данные о провоспалительной активности мастоцитов и репаративной функции фибробластов, их кооперация на ранних стадиях воспаления изучена недостаточно. Дискуссионным остается вопрос о рецепторных механизмах, опосредующих влияние CRP на клетки соединительной ткани.

## Цель исследования

Целью настоящего исследования стало изучение роли CRP в регуляции взаимодействий мастоцитов с фибробластами и эндотелием, а также оценка участия Fcγ-рецепторов в этих процессах.

## Материалы и методы

### Культуры клеток

Линия тучных клеток НМС-1 были любезно предоставлены профессором Дж. Г. Баттерфилдом (Mayo Clinic, Rochester, США). Клетки культивировали в Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, «Биолот», Санкт-Петербург) с добавлением

10%-ной фетальной телячьей сыворотки (FCS), гентамицина (40 мкг/мл) и 1,2 мМ моноглицерила. Пересев клеток производили каждые 3–4 дня при достижении плотности клеток  $1,5–2 \cdot 10^6$  клеток/мл.

Фибробласты человека были любезно предоставлены Д. А. Могиленко. Фибробласты были выделены из крайней плоти здоровых доноров. EA.hy926 — перевиваемая линия клеток эндотелия человека была любезно предоставлена доктором К.-Дж.С. Эджелл (Университет Северной Калифорнии, США). Как эндотелиальные клетки EA.hy926, так и фибробласты — адгезионные культуры. Клетки культивировали в среде DMEM (Sigma) с добавлением 10%-ного ЭТС (Gibco), 40 мкг/мл сульфата гентамицина («Биолот», Санкт-Петербург, РФ) и 2 мМ L-глутамин («Биолот», Санкт-Петербург, РФ). Пересев производили по достижении конфлюэнтного монослоя, 2–3 раза в неделю. Для дезинтеграции монослоя использовали раствор трипсина-версена 1:1 («Биолот», Санкт-Петербург, РФ).

Все использованные в работе клеточные культуры инкубировали в полистироловых флаконах объемом 50 мл («Orange Scientific», Бельгия) при 37 °C в присутствии 5%-ного CO<sub>2</sub>.

### **Оценка токсического эффекта исследуемых препаратов на клетки НМС-1**

В работе использовались препараты CRP (Calbiochem) и агрегированного нагреванием при 63 °C IgG (ИмТэк). Производили тестирование возможного влияния различных доз препаратов, применяемых в экспериментах, на жизнеспособность клеток линии НМС-1. Оценку цитотоксичности проводили при помощи проточной цитометрии по появлению клеток с гиподиплоидным набором ДНК при помощи окраски клеток йодистым пропидием. Препараты CRP и aIgG исследовали в финальных концентрациях 5, 10 и 50 мкг/мл.

По завершении инкубации клеток с исследуемыми веществами клетки отмывали избытком забуференного физиологического раствора (ЗФР). Полученный осадок ресуспендировали в 100 мкл ЗФР и добавляли 900 мкл 70° этанола, охлажденного до –20 °C. Непосредственно перед анализом клетки осаждали центрифугированием (7 мин при 300 g) и переводили в ЗФР. После этого в образцы вносили 0,1%-ный раствор йодистого пропидия и проводили окраску в течение 30 мин в темноте при комнатной температуре. По завершении инкубации проводили цитофлуорометрический учет на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter Inc., США).

### **Проточная цитометрия**

Оценку экспрессии различных поверхностных молекул на клетках производили на проточном цитометре Navios (Beckman-Coulter) с использованием моноклональных антител. Для каждого из моноклональных антител (CD16, CD32, CD64, CD11b и CD54) были использованы соответствующие изотипические контроли. Все антитела и изотипические контроли, использованные в данной работе, были производства компании Beckman Coulter Inc. (США). Окраску поверхностных антигенов антителами производили в соответствии с инструкциями производителя. Результаты экспериментов выражали в условных единицах MFI (среднее геометрическое), характеризующих среднюю интенсивность флуоресценции.

### **Оценка активации тучных клеток по выходу гистамина методом Шора**

Для оценки способности лигандов Fcγ-рецепторов вызывать дегрануляцию тучных клеток отбирали нужное количество клеток, отмывали раствором Хэнкса (Биолот) и ресуспендировали в растворе Хэнкса, содержащем 0,1 % бычьего сывороточного альбумина (BSA, Sigma). Затем к клеткам добавляли интересующие нас вещества, в качестве положительного контроля использовали вещество 48/80 (Sigma) в концентрации 20 мкг/мл. После 30-минутной инкубации при 37 °C клетки осаждали центрифугиро-

ванием (5 мин 300 g), надосадочную жидкость отбирали и замораживали при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Для тотального выхода гистамина из тучных клеток (ТК) клетки разводили деионизированной водой и разрушали замораживанием / оттаиванием.

Количество высвободившегося гистамина определяли модифицированным методом Шора. Результат выражали в виде отношения RFU в надосадочной жидкости к сумме RFU в надосадке и RFU оставшегося в клетках гистамина.

### **Оценка адгезии клеток друг к другу**

Интенсивность адгезии клеток линии НМС-1 к адгезионным культурам определяли следующим образом: в лунки 96-луночного планшета к монослою адгезионных клеток добавляли клетки линии НМС-1, предварительно меченые CFSE. Совместная инкубация меченных CFSE суспензионных клеток с монослоем Фб или эндотелиальных клеток продолжалась 30 мин, после чего монослой отмывали от неприкрепившихся клеток и производили учет реакции.

Если изучали влияние лигандов Fc $\gamma$ -рецепторов на адгезивные свойства суспензионных клеток, то клетки стимулировали в течение суток изучаемым препаратом, после чего отмывали и метили CFSE. Если изучали изменение адгезивных свойств фибробластов или клеток EA.hy926 под действием стимуляторов, то вносили индукторы, разведенные в среде без эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), с 1 % БСА за сутки до добавления клеток, меченых CFSE. Учет адгезии производили при помощи спектрофлуориметра при длине волны возбуждения 480, эмиссии — 535 нм. По яркости флуоресценции судили о количестве прикрепившихся клеток, то есть об интенсивности адгезии. Результат выражали в RFU.

При изучении адгезии клеток друг к другу в присутствии индукторов после мечения клеток CFSE их вносили в лунки к адгезионным клеткам в 50 мкл культуральной среды, после чего сразу же добавляли стимуляторы в 50 мкл той же среды.

### **Связывание С-реактивного белка с клетками** **Мечение С-реактивного белка биотином**

Для того чтобы пометить CRP биотином, дважды диализовали коммерческий препарат CRP против ЗФР. После чего к CRP добавляли 1%-ный раствор биотина (sulphosuccinimidyl-6[biotin]hexanoate (Sulpho-NHS-LS-Biotin), Pierce) в dH<sub>2</sub>O таким образом, что молярное отношение количества С-реактивного белка к количеству биотина было 1:20. После тридцатиминутной инкубации при комнатной температуре трижды диализовали меченый С-реактивный белок против ЗФР для удаления из раствора не связанного биотина; последний диализ проходил с добавлением 0,2 % азида натрия (Serva).

### **Связывание С-реактивного белка с тучными клетками линии НМС-1**

Связывание CRP с ТК линии НМС-1 оценивали на проточном цитометре. Для этого ТК собирали, отмывали раствором Хэнкса, содержащим 0,1 % БСА и 0,2 % NaN<sub>3</sub>. Затем к клеткам добавляли меченый биотином CRP в различных концентрациях и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. После этого дважды отмывали от несвязавшегося CRP, добавляли по 0,5 мкл раствора стрептавидина, меченого аллофикоцианином (APC), инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 мин. По окончании инкубации клетки трижды промывали ЗФР, содержащим 10%-ный ЭТС, и определяли интенсивность флуоресценции клеток на проточном цитометре.

Также проводили эксперименты по изучению конкуренции за связывание с клетками биотинилированного и немеченого CRP либо aIgG. В этих случаях к клеткам одновременно добавляли 50 мкг/мл меченого биотином CRP и различные концентрации немеченого CRP или aIgG, затем инкубировали в течение 30 мин, после чего отмывали, добавляли стрептавидин, меченый APC, и производили учет уровня флуоресценции клеток на проточном цитометре. Концентрация меченого биотином CRP была выбрана исходя из того, что в данной концентрации происходит связывание CRP с клетками хорошо отличимое от контроля, но еще без насыщения (рис. 1, а).

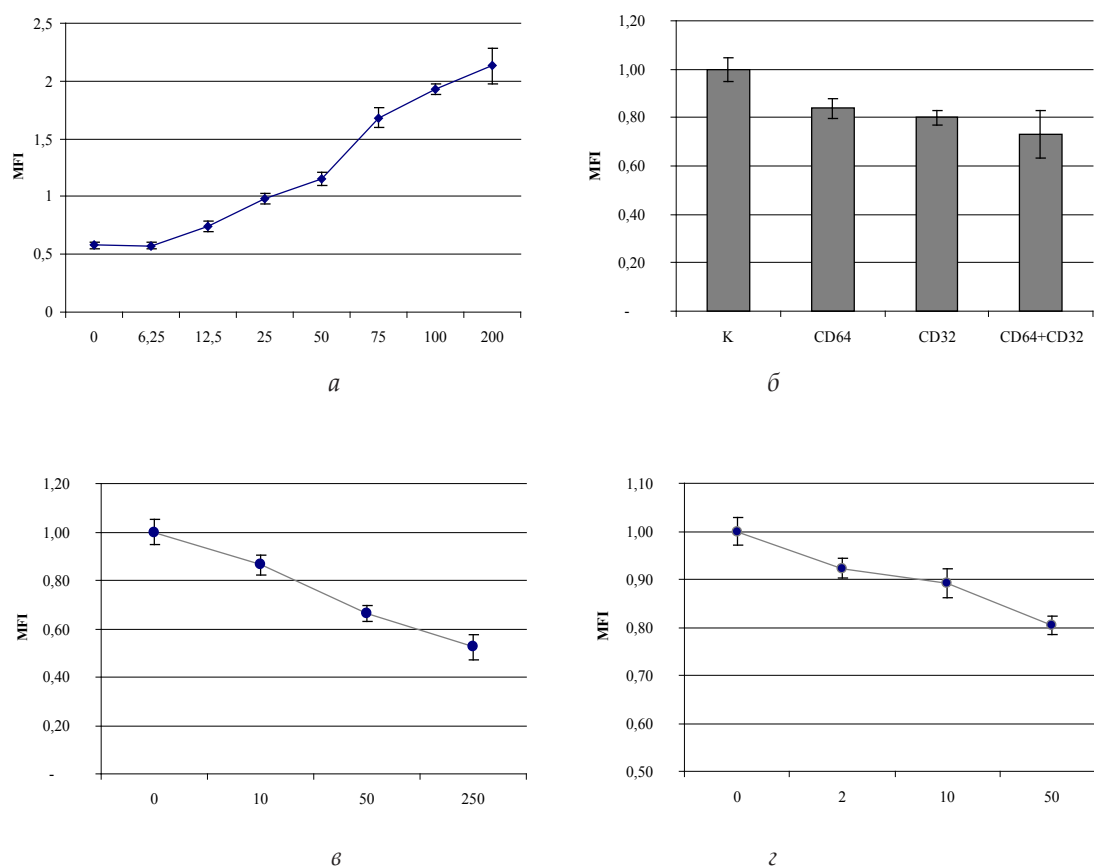


Рис. 1. Связывание С-реактивного белка с клетками линии HMC-1:  
*a* — связывание CRP с клетками HMC-1, по оси абсцисс — концентрация CRP, мкг/мл, по оси ординат — уровень флюоресценции клеток, окрашенных стрептавидином-APC, MFI; *б* — оценка специфичности связывания CRP с тучными клетками HMC-1: вытеснение меченого биотином CRP антителами к FcγR, по оси ординат — MFI; *в* — вытеснение меченого биотином CRP возрастающими концентрациями немеченого CRP, по оси абсцисс — концентрация немеченого CRP, мкг/мл, по оси ординат — MFI; *г* — оценка специфичности связывания CRP с тучными клетками HMC-1: вытеснение меченого биотином CRP возрастающими концентрациями aIgG, по оси абсцисс — концентрация aIgG, мкг/мл, по оси ординат — MFI

Fig. 1. Binding of C-reactive protein to HMC-1 cells:  
*a* — CRP binding to HMC-1 cells; abscissa — CRP concentration, µg/ml; ordinate — fluorescence intensity of cells stained with streptavidin-APC, MFI.  
*b* — evaluation of the specificity of CRP binding to HMC-1 mast cells: displacement of biotin-labeled CRP by antibodies against FcγR; ordinate — MFI. *c* — displacement of biotin-labeled CRP by increasing concentrations of unlabeled CRP; abscissa — concentration of unlabeled CRP, µg/ml; ordinate — MFI.  
*d* — evaluation of the specificity of CRP binding to HMC-1 mast cells: displacement of biotin-labeled CRP by increasing concentrations of aIgG; abscissa — concentration of aIgG, µg/ml; ordinate — MFI

## Трансфекция

Для оценки активации NF-κB-сигнального пути тучные клетки HMC-1 трансфицировали плазмидами pNF-κBlue и pCMVL при помощи реагента «Lipofectamine 2000» (Invitrogen), согласно инструкции производителя. Плазмида pNF-κBlue

представляла собой конструкцию, содержащую ген люциферазы (luc), сцепленный с минимальным синтетическим промотором, содержащим пять цис-элементов для белков NF- $\kappa$ B (Stratagene, США). Плазмида pCMVL содержала ген бета-галактозидазы, находящийся под промотором цитомегаловируса (CMV) человека. Плазмиды были выделены из бактериальных клеток *E. coli* методом щелочного лизиса. Через сутки после трансфекции проводили инкубацию клеток в течение 24 ч с CRP человека (Calbiochem MD Biochemicals), сывороточным Р-компонентом амилоида (SAP) человека (Calbiochem) и агрегированным IgG человека (Имтэк, Москва). После окончания инкубации со стимуляторами клетки трижды отмывали 3ФР, собирали и лизировали в 20 мкл лизирующего буфера («Promega»).

### Статистическая обработка

Статистическую обработку нормально распределенных данных проводили с помощью пакета программ «MS Excel 2010» (Microsoft, США). Анализ характера распределения данных проверяли по критериям Шапиро — Уилка и Колмогорова — Смирнова. Результаты представляли в виде среднего арифметического и его стандартной ошибки ( $M \pm m$ ). Значимость различий между группами оценивали в ходе однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA Уэлча). Для анализа множественных сравнений использовали апостериорный тест Даннета (при сопоставлении с контрольной группой) и тест Тамхейна T2 (для всех попарных сравнений). Достоверными считали различия при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты

### 1. Исследование токсического эффекта различных доз препаратов С-реактивного белка и агрегированного IgG человека на клетки перевиваемой линии НМС-1

В рамках исследования выполнены эксперименты, направленные на оценку потенциальной цитотоксичности С-реактивного белка (CRP) и агрегированных человеческих IgG-антител (aIgG) в диапазоне концентраций 5—50 мкг/мл. В качестве отрицательного контроля применяли бычий сывороточный альбумин в концентрации 100 мкг/мл. Согласно данным, представленным в таблице 1, 24-часовое воздействие исследуемых лигандов Fc $\gamma$ -рецепторов не привело к статистически значимому увеличению апоптотической активности клеток НМС-1. Это свидетельствует об отсутствии прямого токсического действия CRP и aIgG на клеточную жизнеспособность в выбранных концентрациях. Следовательно, наблюдаемые в дальнейших экспериментах ингибирующие эффекты нельзя объяснить неспецифической гибелью клеток посредством некроза или апоптоза.

Таблица 1

#### Результаты исследования токсического эффекта различных доз CRP и aIgG на клетки НМС-1

Table 1

#### Toxic effect of different doses of CRP and aIgG on HMC-1 cells

| Стимулятор               | Клетки, несущие гиподиплоидный набор ДНК, % |
|--------------------------|---------------------------------------------|
| Контроль: БСА, 100 нг/мл | $7,9 \pm 1,5$                               |
| CRP, 5 мкг/мл            | $6,2 \pm 2,1$                               |
| CRP, 10 мкг/мл           | $6,9 \pm 3,5$                               |
| CRP, 50 мкг/мл           | $7,0 \pm 1,2$                               |

Окончание табл. 1

| Стимулятор      | Клетки,<br>несущие гиподиплоидный набор ДНК, % |
|-----------------|------------------------------------------------|
| aIgG, 5 мкг/мл  | $7,7 \pm 1,4$                                  |
| aIgG, 10 мкг/мл | $6,3 \pm 3,6$                                  |
| aIgG, 50 мкг/мл | $8,3 \pm 2,6$                                  |

Примечание: Данные представлены в виде  $M \pm m$ ;  $n = 6$ .

Note: Data are presented as  $M \pm m$ ;  $n = 6$ .

## 2. Экспрессия Fcγ-рецепторов на клетках исследуемых линий

Методом проточной цитофлуориметрии проведен анализ поверхностных маркеров клеток. Было установлено, что клетки линии HMC-1 характеризуются выраженной экспрессией CD32 (FcγRII). Умеренные уровни CD64 (FcγRI) выявлены на их поверхности, в то время как CD16 (FcγRIII) отсутствует (рис. 2).

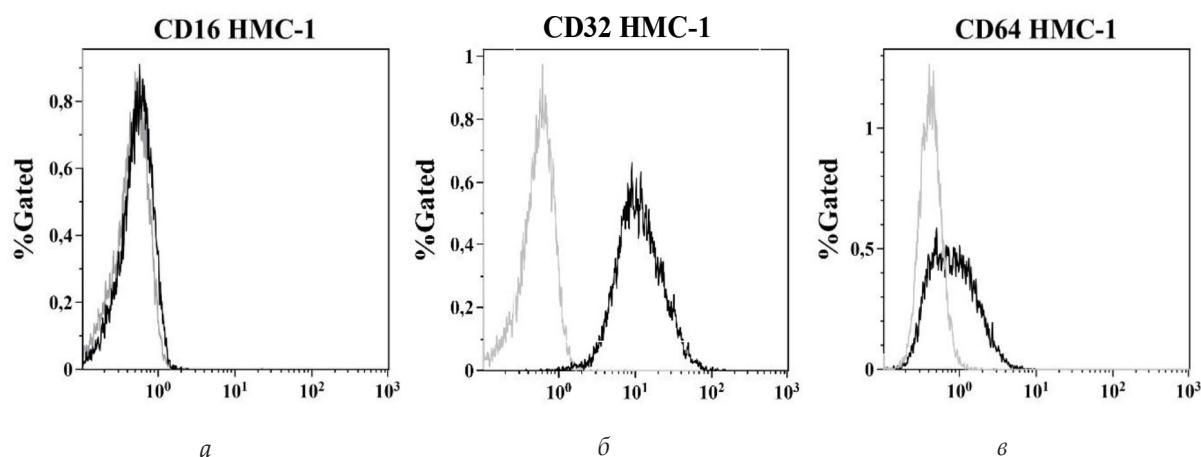


Рис. 2. Экспрессия Fcγ-рецепторов клетками HMC-1:

- a* — связывание клеток HMC-1 с антителами против CD16 (FcγRIII);  
*б* — связывание клеток HMC-1 с антителами против CD32 (FcγRII);  
*в* — связывание клеток HMC-1 с антителами против CD64 (FcγRI)

Примечание: серым цветом обозначен уровень связывания клеток с антителами изотипического контроля, черным — уровень связывания антител против соответствующих Fcγ-рецепторов. По оси абсцисс уровень флуоресценции в MFI; по оси ординат — количество клеток.

Fig. 2. Expression of Fcγ receptors by HMC-1 cells:

- a* — binding of HMC-1 cells to anti-CD16 antibodies (FcγRIII);  
*b* — binding of HMC-1 cells to anti-CD32 antibodies (FcγRII);  
*c* — binding of HMC-1 cells to anti-CD64 antibodies (FcγRI)

Note: gray indicates the level of cell binding to isotype control antibodies; black indicates binding of antibodies against the corresponding Fcγ receptors. The abscissa shows fluorescence intensity (MFI); the ordinate shows cell number.

## 3. Влияние IFNγ на экспрессию Fcγ-рецепторов клетками линии HMC-1

Исследования выявили, что инкубация клеток HMC-1 с интерфероном-гамма (IFNγ) индуцирует повышение уровня экспрессии высокоаффинного рецептора CD64 (FcγRI). Максимальная экспрессия наблюдалась через 24 ч после стимуляции (рис. 3, *a*). Эффект IFNγ был дозозависимым: при 1 нг/мл изменений не зафиксировано, тогда как 10 нг/мл

вызывали увеличение экспрессии CD64 на 20 %, а 100 нг/мл — на 28 %. Дальнейшее повышение дозы цитокина (до 1000 нг/мл) не приводило к усилению ответа, что свидетельствует о достижении плато (рис. 3, б).

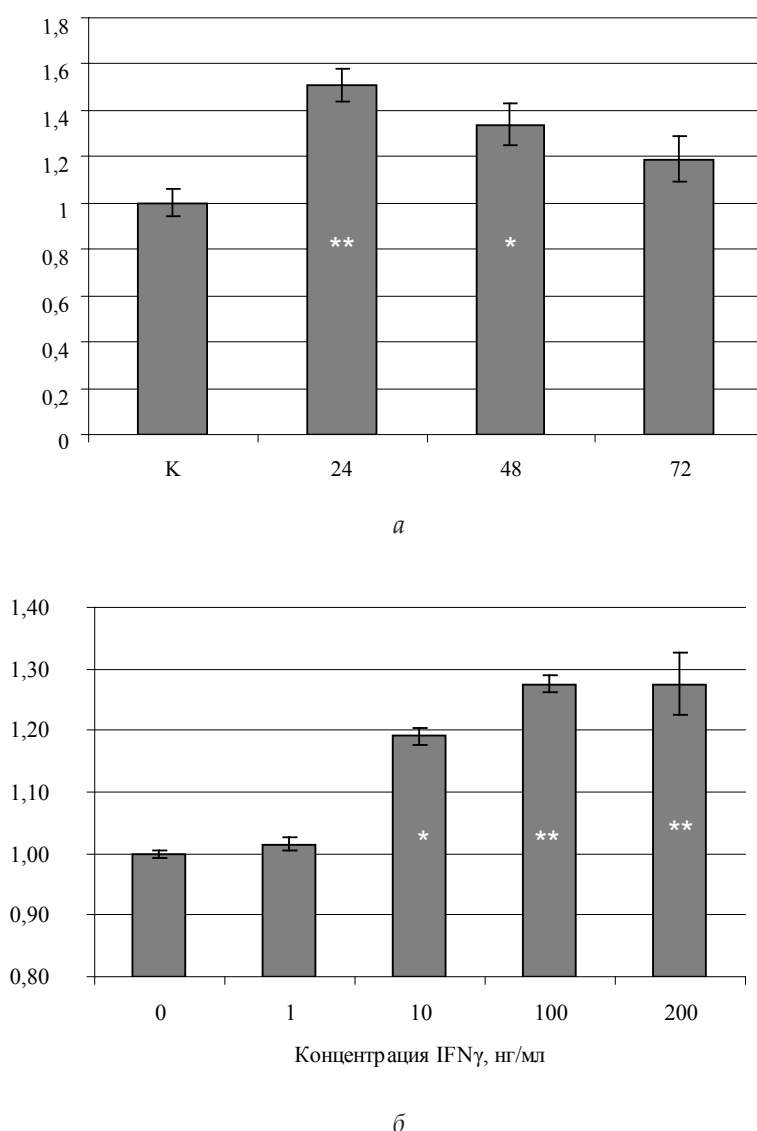


Рис. 3. Экспрессия FcγRI тучными клетками линии НМС-1 под действием IFNγ:  
 а — влияние продолжительности стимуляции. По оси абсцисс — продолжительность инкубации клеток с IFNγ (15 нг/мл), часов. По оси ординат — уровень флуоресценции клеток, окрашенных антителами против CD64, конъюгированными с FITC (MFI);  
 б — зависимость экспрессии FcγRI на клетках линии НМС-1 от концентрации IFNγ. По оси абсцисс — концентрация IFNγ, по оси ординат — уровень флуоресценции клеток, окрашенных антителами против CD64, конъюгированными с FITC (MFI)

Примечание: достоверность различий с контролем: \* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$ , \*\*\* —  $p < 0,001$ .

Fig. 3. FcγRI expression by HMC-1 mast cells in response to IFNγ: *a* — effect of stimulation duration. Abscissa — duration of cell incubation with IFNγ (15 ng/ml), hours; ordinate — fluorescence intensity of cells stained with FITC-conjugated anti-CD64 antibodies (MFI). *b* — dependence of FcγRI expression on IFNγ concentration. Abscissa — IFNγ concentration; ordinate — fluorescence intensity of cells stained with FITC-conjugated anti-CD64 antibodies (MFI)

Note: significance of differences from control: \* —  $p < 0.05$ , \*\* —  $p < 0.01$ , \*\*\* —  $p < 0.001$ .

Воздействие  $\text{IFN}\gamma$  не оказывало значимого влияния на экспрессию низкоаффинных рецепторов CD32 ( $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ ) и CD16 ( $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ ) (рис. 4, а, б).

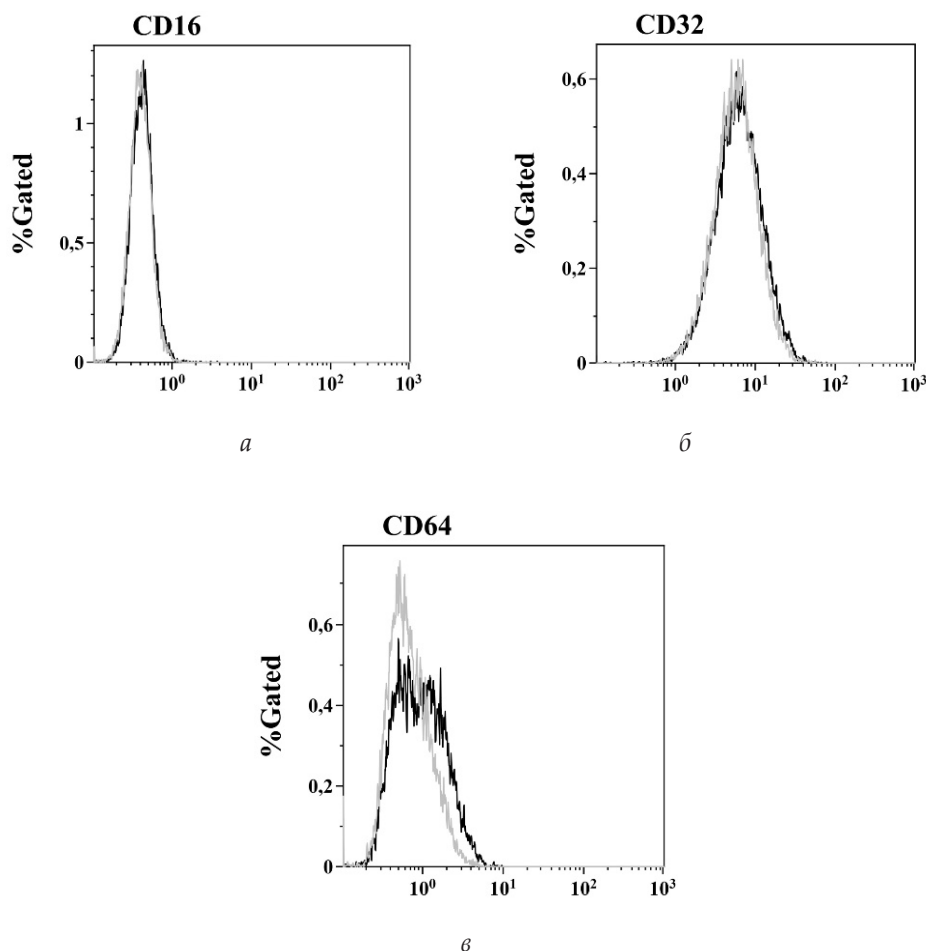


Рис. 4. Экспрессия  $\text{Fc}\gamma$ -рецепторов клетками НМС-1. Влияние  $\text{IFN}\gamma$ :

а — экспрессия на клетках НМС-1 CD16 ( $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ );

б — экспрессия на клетках НМС-1 CD32 ( $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ );

в — экспрессия на клетках НМС-1 CD64 ( $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ ). Серым цветом обозначен уровень связывания антител против соответствующих  $\text{Fc}\gamma$ -рецепторов с интактными клетками, черным — связывания антител с клетками, активированными  $\text{IFN}\gamma$

Примечание: по оси абсцисс уровень флуоресценции (MFI), по оси ординат — количество клеток.

Fig. 4. Expression of  $\text{Fc}\gamma$  receptors by HMC-1 cells. Effect of  $\text{IFN}\gamma$ :

a — expression of CD16 ( $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ ) on HMC-1 cells; b — expression of CD32 ( $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ ) on HMC-1 cells;

c — expression of CD64 ( $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ ) on HMC-1 cells. Binding of antibodies against the corresponding  $\text{Fc}\gamma$  receptors to intact cells is shown in gray; binding to  $\text{IFN}\gamma$ -activated cells is shown in black

Note: the abscissa shows fluorescence intensity (MFI); the ordinate shows cell number.

#### 4. Связывание С-реактивного белка с тучными клетками линии НМС-1

Наши экспериментальные данные продемонстрировали способность С-реактивного белка связываться с тучными клетками линии НМС-1 (рис. 5). Интересно, что данный процесс не требовал присутствия ионов  $\text{Ca}^{2+}$  или  $\text{Mg}^{2+}$  в среде, о чем свидетельствуют результаты, представленные в таблице 2.

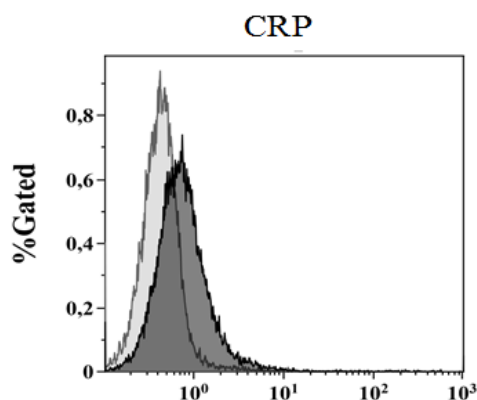


Рис. 5. Связывание С-реактивного белка с клетками линии НМС-1. С-реактивный белок был помечен биотином и добавлен к клеткам в концентрации 100 мкг/мл, после 30-минутной инкубации была произведена отмывка от несвязавшегося белка и добавлен стрептавидин, конъюгированный с аллофикоцианином (APC) (темная гистограмма); светлая гистограмма — к клеткам был добавлен стрептавидин-APC без предварительной инкубации с CRP (контроль)

*Примечание:* по оси абсцисс — уровень флуоресценции (MFI), по оси ординат — число клеток.

Fig. 5. Binding of C-reactive protein to HMC-1 cells.

C-reactive protein was labeled with biotin and added to the cells at a concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; after a 30-minute incubation, unbound protein was washed off and APC-conjugated streptavidin was added (dark histogram); the light histogram shows streptavidin-APC added to cells without prior incubation with CRP (control)

*Note:* the abscissa shows fluorescence intensity (MFI); the ordinate shows cell number.

Таблица 2

**Связывание CRP с тучными клетками НМС-1: независимость от наличия катионов и активации клеток  $\text{IFN}\gamma$**

Table 2

**CRP binding to HMC-1 mast cells: independence from cation availability and  $\text{IFN}\gamma$  cell activation**

| Состав среды                                         | Контроль | После активации $\text{IFN}\gamma$ |
|------------------------------------------------------|----------|------------------------------------|
| DPBS с катионами $\text{Ca}^{2+}$ и $\text{Mg}^{2+}$ | 1,47     | 1,22                               |
| DPBS с 0,5 mM ЭДТА                                   | 1,4      | 1,35                               |

*Примечание:* Приведена интенсивность флуоресценции клеток, связавших CRP. Данные представлены в MFI. DPBS — забуференный фосфатами раствор Дальбекко. Различия с контролем незначительны ( $p > 0,05$ ).

*Note:* Fluorescence intensity of cells that bound CRP is shown. Data are expressed in MFI. DPBS — Dulbecco's phosphate-buffered saline. Differences from the control are not significant ( $p > 0.05$ ).

Анализ показал отсутствие существенного влияния катионного состава среды и стимуляции интерфероном-гамма ( $\text{IFN}\gamma$ ) на интенсивность связывания CRP с клеточной поверхностью (табл. 2). Для детекции взаимодействия использовали конъюгат стрептавидин-APC с последующим цитофлуориметрическим анализом. Пороговая концентрация CRP, при которой регистрировалось специфическое связывание, составила 12 мкг/мл. В диапазоне 12—100 мкг/мл наблюдали линейную зависимость между дозой белка и силой взаимодействия. При превышении 100 мкг/мл процесс достигал плато, а дальнейшее увеличение концентрации не вызывало статистически значимого роста интенсивности флуоресценции (см. рис. 1, а).

Блокирование Fc $\gamma$ -рецепторов антителами оказывало модулирующий эффект. Инкубация с моноклональными антителами к CD64 снижала активность связывания CRP на 16 %, тогда как использование антител к CD32 уменьшало показатели на 20 %. Комбинированная обработка ингибиторами обоих рецепторов приводила к аддитивному эффекту, снижая взаимодействие на 27 % (см. рис. 1, б).

Эксперименты с конкурентным ингибированием подтвердили селективность связывания С-реактивного белка с тучными клетками линии НМС-1. В системе, где меченный биотином CRP (50 мкг/мл) конкурировал с нативной формой белка, введение 10 мкг/мл немодифицированного CRP вызывало уменьшение флуоресцентного сигнала на 14 %. Увеличение концентрации конкурента до 50 мкг/мл усиливало ингибирующий эффект, снижая связывание на 33 %. Максимальное подавление взаимодействия (48 %) наблюдалось при пятикратном молярном избытке немеченого белка относительно меченой формы (см. рис. 1, в).

Дополнительные исследования выявили влияние агрегированного IgG (aIgG) на связывание CRP на поверхности тучных клеток линии НМС-1. Совместная инкубация клеток с aIgG и биотинилированным CRP вызывала дозозависимое уменьшение флуоресценции. При концентрации aIgG 2 мкг/мл подавление связывания составляло 8 %, тогда как 10 мкг/мл агрегированных иммуноглобулинов снижали показатель до 11 %. Максимальный ингибирующий эффект (20 %) регистрировался при 50 мкг/мл aIgG, что свидетельствует о частичном конкурентном механизме взаимодействия (см. рис. 1, г).

## **5. Влияние С-реактивного белка на дегрануляцию тучных клеток линии НМС-1**

Проведенные исследования выявили, что в диапазоне концентраций 0,03—30 мкг/мл С-реактивный белок (CRP) не вызывал статистически значимого высвобождения гистамина из тучных клеток НМС-1 в отсутствие стимуляции. Однако в случае предварительной активации клеток интерфероном-гамма ( $\text{IFN}\gamma$ ) наблюдалась выраженная дозозависимая модуляция дегрануляции.

Так, введение CRP в концентрациях 0,03 и 0,3 мкг/мл сопровождалось увеличением секреции гистамина на 18 и 20 % соответственно относительно контроля. При повышении дозы белка до 3 мкг/мл уровень дегрануляции возрастал на 33 %, а при концентрации CRP 30 мкг/мл секреция гистамина составляла 123 % от контрольных значений (рис. 6).

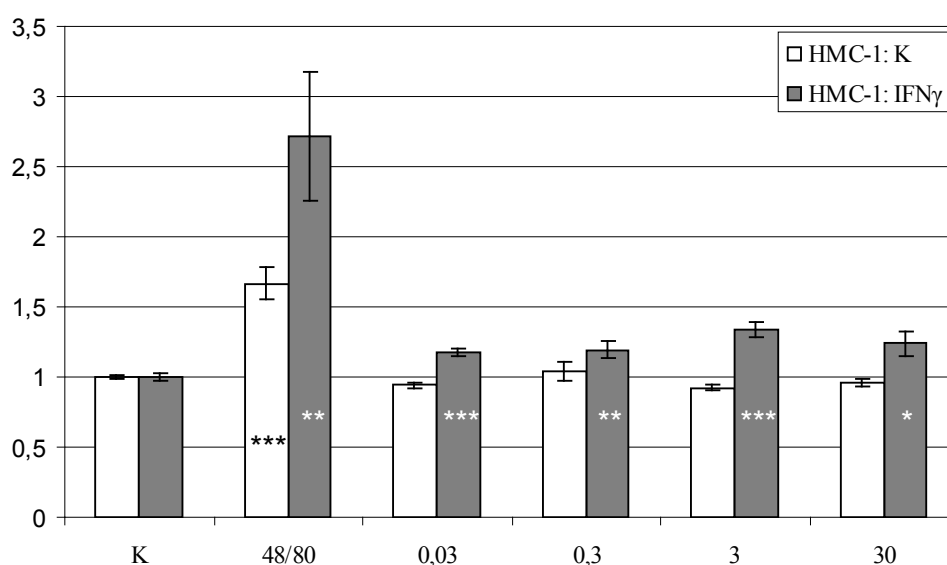


Рис. 6. Влияние CRP на выход гистамина из тучных клеток HMC-1: зависимость от IFN $\gamma$ .

Клетки HMC-1 были инкубированы сутки с 15 нг/мл IFN $\gamma$  (столбцы серого цвета) или без IFN $\gamma$  (белые столбцы), после чего простимулированы CRP в различных концентрациях. По оси абсцисс: К — ЗФР (негативный контроль), 48/80 — соединение 48/80 в концентрации 20 мкг/мл (позитивный контроль), цифры — концентрация CRP, мкг/мл.

По оси ординат — индекс стимуляции (отношение выхода гистамина под действием стимулятора к негативному контролю). Уровень спонтанного выхода гистамина составлял в контроле без обработки IFN $\gamma$   $0,220 \pm 0,01$ , а после обработки IFN $\gamma$  —  $0,195 \pm 0,02$  ( $p < 0,05$ )

Примечание: достоверность различий с контролем: \* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$ , \*\*\* —  $p < 0,001$ .

Fig. 6. Effect of CRP on histamine release from HMC-1 mast cells: dependence on IFN $\gamma$ . HMC-1 cells were incubated for 24 hours with 15 ng/ml IFN $\gamma$  (gray bars) or without IFN $\gamma$  (white bars) and then stimulated with CRP at various concentrations. Abscissa: C — PBS (negative control); 48/80 — compound 48/80 at 20  $\mu$ g/ml (positive control); numbers — CRP concentration,  $\mu$ g/ml. Ordinate — stimulation index (ratio of histamine release induced by the stimulator to the negative control). The level of spontaneous histamine release was  $0.220 \pm 0.01$  in the control without IFN $\gamma$  treatment and  $0.195 \pm 0.02$  after IFN $\gamma$  treatment ( $p < 0.05$ )

Note: significance of differences from control: \* —  $p < 0.05$ , \*\* —  $p < 0.01$ , \*\*\* —  $p < 0.001$ .

## 6. Влияние лигандов Fc $\gamma$ -рецепторов (С-реактивного белка, агрегированного IgG) на адгезивность клеток

### 6.1. Влияние С-реактивного белка и агрегированного IgG на адгезивные свойства тучных клеток линии HMC-1

Экспериментальные данные продемонстрировали, что 24-часовая инкубация тучных клеток линии HMC-1 с С-реактивным белком вызывает статистически значимое усиление их способности к адгезии, зависящее от концентрации CRP. При использовании CRP в дозе 10 мкг/мл адгезия ТК к нестимулированным фибробластам возрастала на 27 % относительно контрольных значений. Увеличение концентрации белка до 50 мкг/мл приводило к росту показателя на 54 %, причем различия между группами были статистически достоверны ( $p < 0,05$ ) (рис. 7).

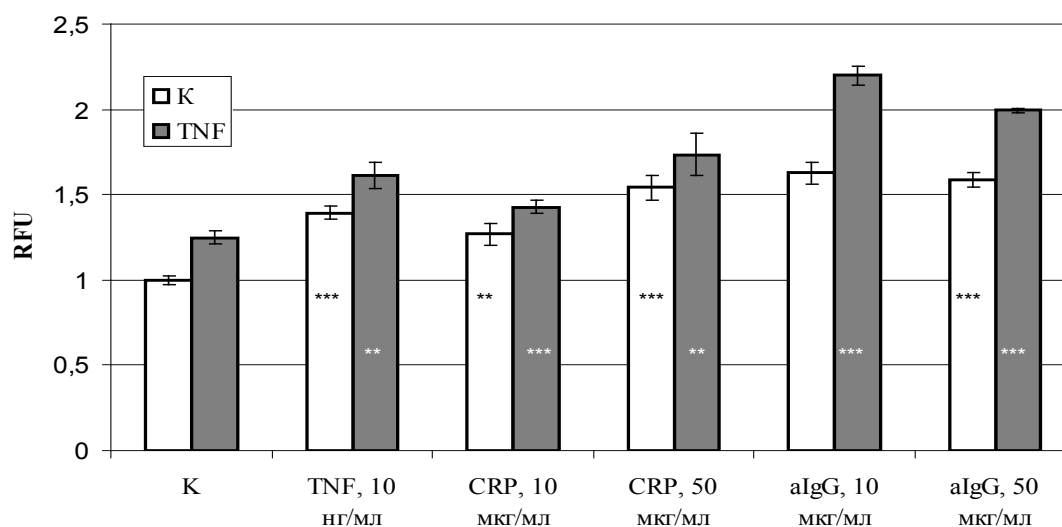


Рис. 7. Адгезия стимулированных тучных клеток линии НМС-1 к интактным или активированным TNF фибробластам

*Примечание:* белые столбцы — адгезия клеток НМС-1 к интактным Фб; серые — адгезия к Фб, активированным TNF (10 нг/мл). По оси абсцисс — активаторы тучных клеток и их концентрация, по оси ординат — индекс стимуляции. Различия с контролем достоверны: \*\* —  $p < 0,01$ ; \*\*\* —  $p < 0,001$ .

Fig. 7. Adhesion of stimulated HMC-1 mast cells to intact or TNF-activated fibroblasts

*Note:* white bars — adhesion of HMC-1 cells to intact fibroblasts; gray bars — adhesion to fibroblasts activated with TNF (10 ng/ml). Abscissa — mast cell activators and their concentrations; ordinate — stimulation index. Differences from control are significant: \*\* —  $p < 0.01$ ; \*\*\* —  $p < 0.001$ .

Стимуляция ТК агрегированным IgG (aIgG) в концентрациях 10 и 50 мкг/мл также индуцировала усиление адгезии к фибробластам (Фб). В обоих случаях прирост адгезивной активности составлял приблизительно 60 % по сравнению с контролем.

Для имитации воспалительного процесса в тканях была применена раздельная стимуляция клеточных культур: фибробласты обрабатывали TNF в концентрации 10 нг/мл; а ТК инкубировали с CRP (10 или 50 мкг/мл), aIgG (аналогичные дозы) или TNF (10 нг/мл). Результаты показали, что CRP и aIgG усиливали адгезию ТК к фибробластам, причем взаимодействие с TNF-активированными Фб происходило значительно интенсивнее, чем с интактными клетками. По отношению к контролю CRP в концентрации 10 мкг/мл повышал показатель на 14 %, а 50 мкг/мл — на 38 %; aIgG в дозах 10 и 50 мкг/мл увеличивал адгезию на 65 и 49 % соответственно.

Сравнение с базовым уровнем (интактные ТК + интактные Фб) продемонстрировало, что стимуляция CRP в дозе 10 мкг/мл усиливала адгезию к TNF-активированным Фб на 42 %, а в дозе 50 мкг/мл — на 73 %. Обработка aIgG (10 и 50 мкг/мл) вызывала увеличение адгезии на 120 и 100 % соответственно. Совместное воздействие TNF на фибробласты и лигандов FcγR на ТК проявляло аддитивный эффект, приводя к дополнительному 20%-ному усилению адгезии по сравнению с интактными Фб.

На основании результатов предыдущих экспериментов проведен анализ влияния CRP и aIgG на экспрессию адгезивных молекул CD11b (интегрин) и CD54 (ICAM-1) на поверхности тучных клеток НМС-1. Результаты продемонстрировали отсутствие значимых изменений в уровне экспрессии данных маркеров при инкубации клеток с CRP (10—50 мкг/мл) или aIgG (аналогичные концентрации) в течение заданного времени (рис. 8, а, б, в, г, д). В отличие от этого стимуляция TNF вызывала статистически значимое увеличение экспрессии CD54 на мембране ТК НМС-1 (рис. 8, е).

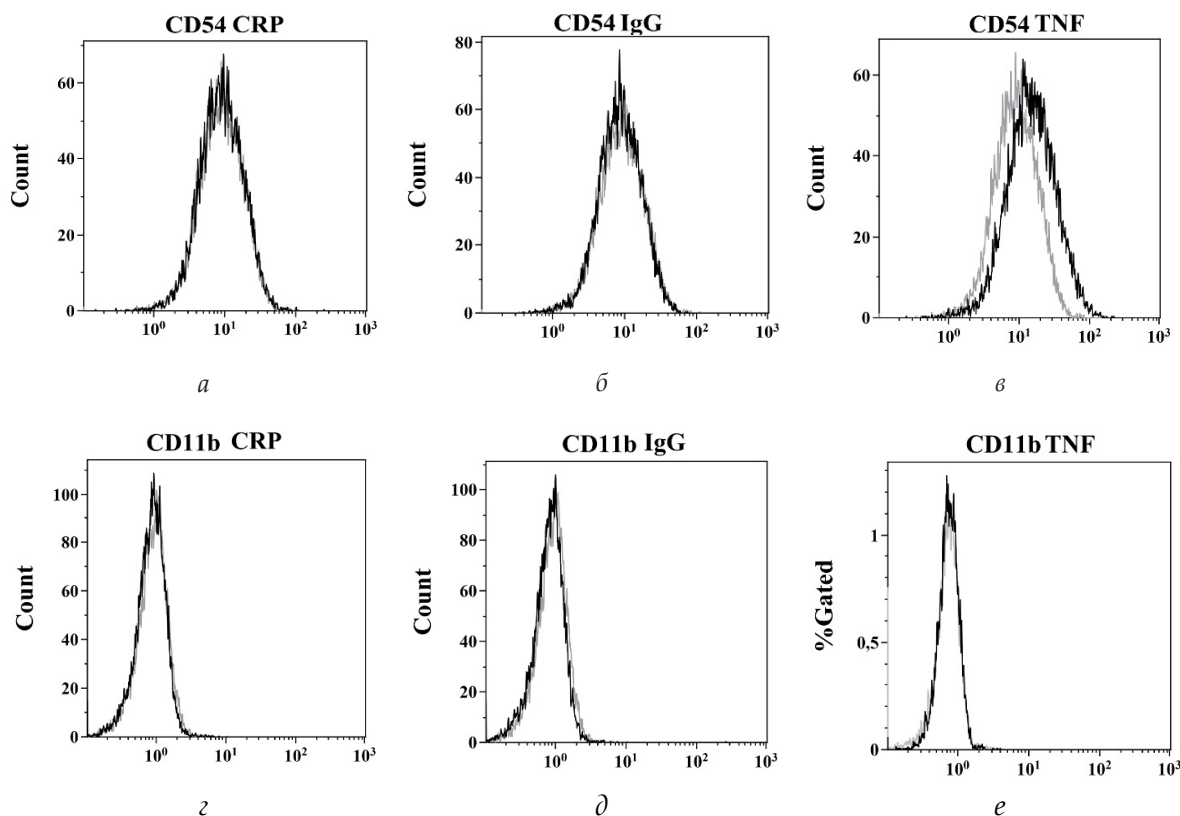


Рис. 8. Экспрессия CD54 и CD11b клетками HMC-1 при стимуляции CRP, aIgG, TNF: а, б, в — экспрессия ICAM-1 клетками HMC-1 под действием CRP (а), aIgG (б), TNF (в); г, д — экспрессия CD11b клетками при стимуляции CRP (г) или aIgG (д)

*Примечание:* серым цветом обозначен уровень связывания антител против ICAM-1 или CD11b интактными клетками, черным — уровень связывания антител со стимулированными клетками. По оси абсцисс — уровень флюоресценции, RFU, по оси ординат — количество клеток.

Fig. 8. Expression of CD54 and CD11b by HMC-1 cells stimulated with CRP, aIgG, and TNF: а, b, c — ICAM-1 expression by HMC-1 cells stimulated with CRP (а), aIgG (b), and TNF (c); d, e — CD11b expression by cells stimulated with CRP (d) or aIgG (e)

*Note:* gray indicates binding of antibodies against ICAM-1 or CD11b to intact cells; black indicates binding of antibodies to stimulated cells. The abscissa shows fluorescence intensity (RFU); the ordinate shows cell count.

Сравнительный анализ гистограмм (рис. 8) подтвердил, что профили экспрессии CD54 в контрольной группе, а также при обработке CRP и aIgG полностью совпадают. В то же время активация клеток TNF приводила к выраженному сдвигу в гистограмме, указывающему на усиление экспрессии данного маркера.

## 6.2. Влияние С-реактивного белка и агрегированного IgG на адгезивность фибробластов для тучных клеток линии HMC-1

Экспериментально установлено, что предварительная обработка фибробластов (Фб) CRP, несмотря на отсутствие у них Fcγ-рецепторов (раздел 3.2), индуцирует дозозависимое увеличение адгезии интактных тучных клеток HMC-1. При концентрации CRP 5 мкг/мл адгезивные показатели оставались сопоставимыми с контролем, однако повышение дозы до 10 и 50 мкг/мл вызывало усиление прикрепления ТК на 11 и 123 % соответственно ( $p < 0,05$ ) (рис. 9). В отличие от CRP инкубация Фб с агрегированным IgG (aIgG) в аналогичных концентрациях (10–50 мкг/мл) не приводила к статистически значимым изменениям адгезии (рис. 10).

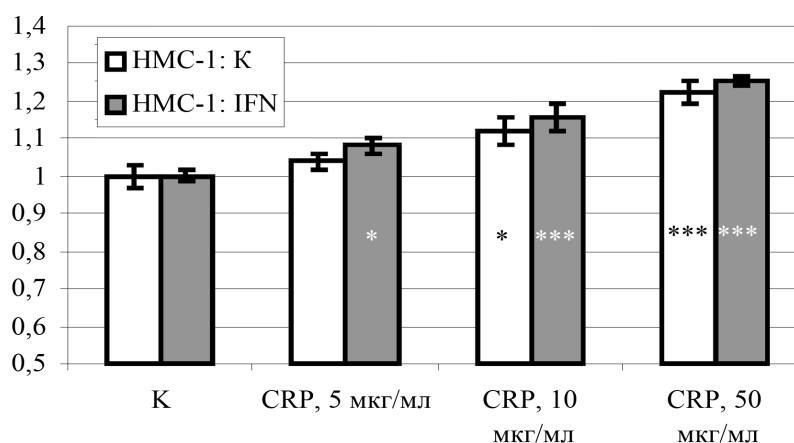


Рис. 9. Адгезия тучных клеток линии НМС-1 к фибробластам, обработанным CRP.  
Роль активации клеток НМС-1 IFN $\gamma$

*Примечание:* по оси абсцисс — концентрация CRP, К — контроль (без обработки CRP). По оси ординат — индекс стимуляции. Белые столбцы — интактные ТК, серые — ТК, стимулированные IFN $\gamma$  в течение 24 ч. Различия с контролем достоверны: \* —  $p < 0,05$ ; \*\*\* —  $p < 0,001$ .

Fig. 9. Adhesion of HMC-1 mast cells to fibroblasts treated with CRP. Role of HMC-1 cell activation by IFN $\gamma$

*Note:* the x-axis shows CRP concentration; K is the control (without CRP treatment). The y-axis shows the stimulation index. White bars — intact MCs; gray bars — MCs stimulated with IFN $\gamma$  for 24 hours. Differences from control are significant: \* —  $p < 0.05$ ; \*\*\* —  $p < 0.001$ .

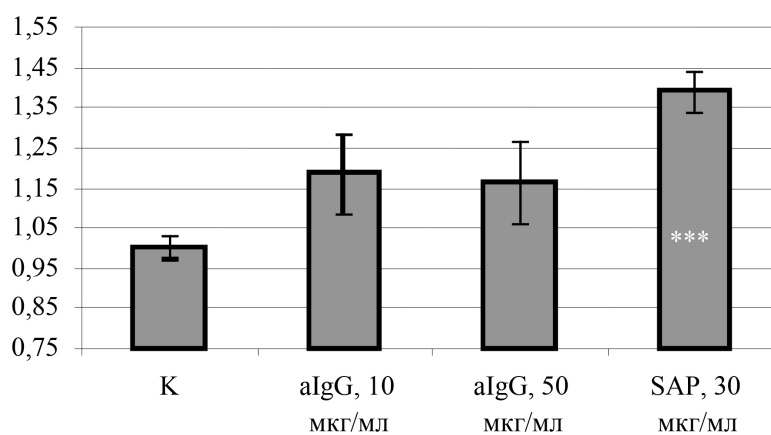


Рис. 10. Адгезия тучных клеток линии НМС-1 к фибробластам, обработанным aIgG или SAP

*Примечание:* по оси ординат — индекс стимуляции; \*\*\* — различия с контролем достоверны,  $p < 0,001$ .

Fig. 10. Adhesion of HMC-1 mast cells to fibroblasts treated with aIgG or SAP

*Note:* the ordinate shows the stimulation index. \*\*\* — differences from control are significant,  $p < 0.001$ .

С учетом данных о повышении экспрессии Fc $\gamma$ RI на ТК НМС-1 под действием IFN $\gamma$  исследовано влияние CRP на адгезию активированных интерфероном клеток.

Стимуляция CRP в дозах 5, 10 и 50 мкг/мл усиливала адгезию IFN $\gamma$ -обработанных ТК на 8, 15 и 25 % соответственно ( $p < 0,05$ ) (рис. 9). При этом IFN $\gamma$  самостоятельно не влиял на адгезию ТК к Фб даже в присутствии CRP.

Результаты показали, что уже при дозе CRP 5 мкг/мл происходит достоверное усиление флюоресценции адгезировавших ТК, активированных интерфероном, на 8 % ( $p < 0,05$ ). При концентрации CRP 10 мкг/мл прирост адгезии составлял уже 15 %, а при концентрации 50 мкг/мл — 25 %. Различия в эффекте CRP в концентрациях 5, 10 и 50 мкг/мл по сравнению с контролем достоверны ( $p < 0,05$ ) (рис. 9).

Как видно из данных, представленных на рисунке 9, CRP способствует усилению адгезии к Фб ТК, предобработанных IFN $\gamma$ . Вместе с тем сам IFN $\gamma$  практически не повышает адгезивность ТК к Фб в присутствии CRP (рис. 9). Достоверно лишь то, что присутствие CRP обеспечивает более высокую адгезию. Как IFN $\gamma$  не влияет на связывание ТК с CRP, так он не влияет и на адгезию ТК к обработанным С-реактивным белком фибробластам. Единственное отличие — в низкой концентрации, различия с контролем в случае IFN $\gamma$  достоверны.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что С-реактивный белок влияет не только на клетки иммунной системы, но и на фибробласты соединительной ткани, повышая их адгезивность для тучных клеток. Механизм влияния CRP на адгезивность фибробластов, скорее всего, иной, чем для тучных клеток, так как фибробласты не экспрессируют Fc-рецепторы, через которые пентраксин обычно действует на клетки. Этот механизм требует отдельного изучения и будет рассмотрен ниже.

Как видно, в отличие от интактных ТК, ТК, стимулированные IFN $\gamma$ , лишь несколько сильнее взаимодействуют с Фб, стимулированными CRP. При стимуляции монослоя Фб aIgG в концентрациях 10 и 50 мкг/мл также происходило достоверное усиление адгезии к ним клеток НМС-1, стимулированных IFN $\gamma$ , на 20 и 10 % соответственно. Различия между разными концентрациями aIgG достоверны ( $p < 0,01$ ) (рис. 11).

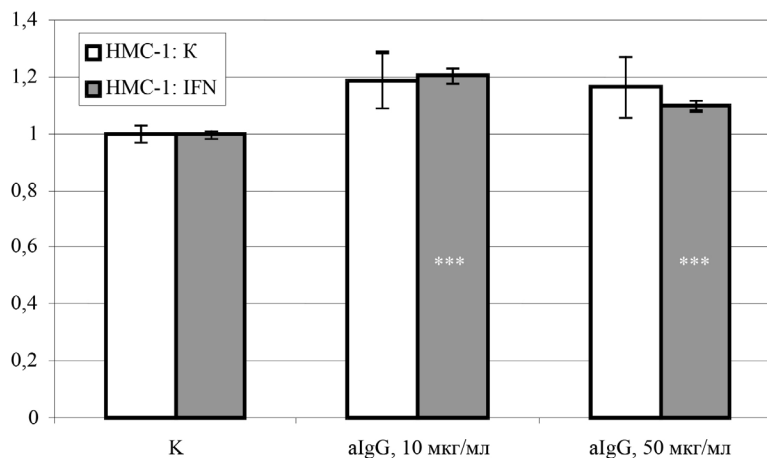


Рис. 11. Влияние aIgG на адгезивные свойства фибробластов

*Примечание.* К фибробластам добавляли aIgG в указанных концентрациях и инкубировали в течение суток. Затем к Фб добавляли интактные (белые столбцы) либо стимулированные 24 ч IFN $\gamma$  (серые столбцы) ТК линии НМС-1. По оси ординат — индекс стимуляции; \*\*\* — различия с контролем достоверны,  $p < 0,001$ . Контроль (К) — адгезия к интактным Фб нестимулированных ТК (белый столбец) или ТК, стимулированных IFN $\gamma$  (серый столбец).

Fig. 11. Effect of aIgG on the adhesive properties of fibroblasts

*Note:* aIgG was added to fibroblasts at the indicated concentrations and incubated for 24 hours. Intact (white bars) or 24-hour IFN $\gamma$ -stimulated (gray bars) HMC-1 cells were then added to the fibroblasts. The ordinate shows the stimulation index; \*\*\* — differences from control are significant,  $p < 0.001$ . Control (C) — adhesion of unstimulated MCs (white bar) or IFN $\gamma$ -stimulated MCs (gray bar) to intact fibroblasts.

Несколько иная картина наблюдалась, если перед добавлением к монослою Фб, стимулированному CRP, ТК линии НМС-1 производили «блокировку» Fcγ-рецепторов с помощью Fc-фрагментов IgG; для этого клетки НМС-1 инкубировали 20 мин на льду в 3ФР, содержащем Fc-фрагменты либо целые молекулы IgG в концентрации 25 мкг/мл. Блокировка Fcγ-рецепторов ТК с помощью Fc-фрагментов IgG (25 мкг/мл, 20 мин, 4 °C) снижала их адгезию к CRP-стимулированным Фб до уровня спонтанного прикрепления к интактным клеткам, тогда как адгезия к TNF-активированным Фб оставалась неизменной (рис. 12, а). Аналогично предобработка IFNγ-стимулированных ТК Fc-фрагментами полностью нивелировала CRP-зависимое усиление адгезии (рис. 12, б).

Такая же блокировка FcγR тучных клеток не оказывала влияния на их адгезию к Фб, стимулированным TNF.

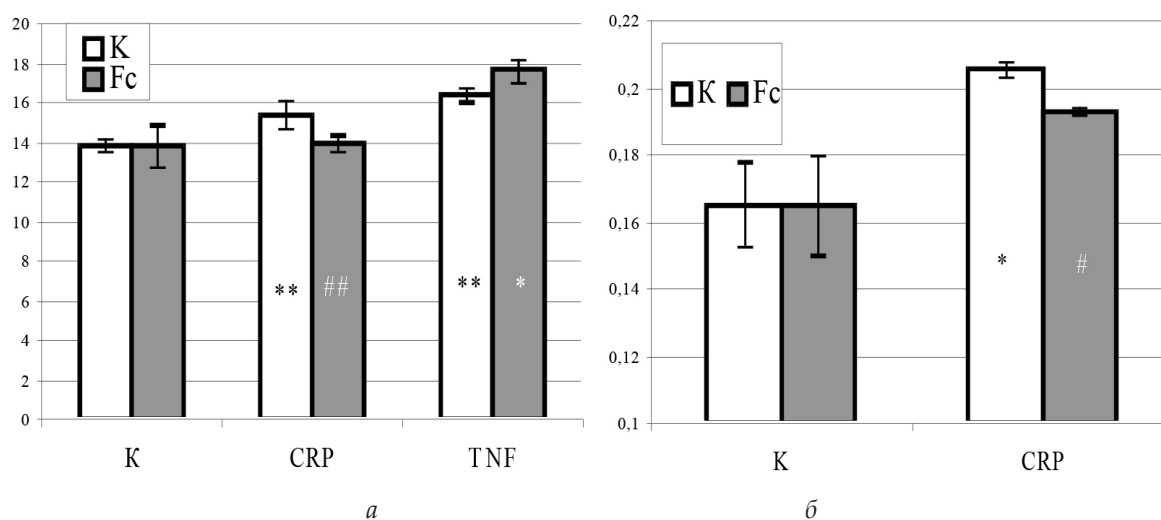


Рис. 12. Адгезия тучных клеток линии НМС-1 к фибробластам, активированным CRP. Роль Fcγ-рецепторов клеток НМС-1

*Примечание.* Фибробласты были активированы CRP в концентрации 50 мкг/мл, после чего к ним были добавлены либо интактные ТК (белые столбцы), либо ТК, инкубировавшиеся с Fc-фрагментами IgG (серые столбцы): а — ТК, не стимулированные IFNγ; б — ТК НМС-1 были активированы IFNγ в течение 24 ч. По оси ординат — RFU. Достоверность различий с контролем: \* —  $p < 0,05$ ; \*\*\* —  $p < 0,001$ ; достоверность различий между интактными ТК и ТК, обработанными Fc-фрагментами IgG: # —  $p < 0,05$ , ## —  $p < 0,01$ .

Fig. 12. Adhesion of HMC-1 mast cells to fibroblasts activated with CRP. Role of Fcγ receptors on HMC-1 cells

*Note:* fibroblasts were activated with CRP at 50 μg/ml, after which either intact MCs (white bars) or MCs pre-incubated with IgG Fc fragments (gray bars) were added: a — MCs not stimulated with IFNγ; b — HMC-1 MCs activated with IFNγ for 24 hours. The ordinate shows RFU. Significance of differences from control: \* —  $p < 0.05$ ; \*\*\* —  $p < 0.001$ ; significance of differences between intact MCs and MCs treated with IgG Fc fragments: # —  $p < 0.05$ , ## —  $p < 0.01$ .

### 6.3. Влияние С-реактивного белка на адгезию тучных клеток линии НМС-1 к фибробластам в его присутствии

В рамках исследования изучали воздействие С-реактивного белка и агрегированного IgG на процесс адгезии тучных клеток линии НМС-1 к фибробластам в их присутствии.

В отличие от стандартного протокола С-реактивным белком не стимулировали исследуемые клеточные популяции заранее, а вводили непосредственно в смесь взаимодействующих клеток на весь период их совместного культивирования.

Экспериментальные данные выявили, что добавление CRP в концентрации 50 мкг/мл в среду кокультивирования приводило к усилению адгезии тучных клеток к фибробластам. Наблюдалась четкая зависимость уровня адгезии от длительности инкубации: в интервале от 20 до 50 мин количество прикрепившихся клеток возрастало. Динамика процесса демонстрировала пик активности в первые 30 мин. Через 20 мин после начала инкубации флуоресценция, характеризующая адгезию, увеличивалась на 25 % относительно контрольных образцов (без CRP). Максимальный эффект регистрировали через 30 мин, когда количество присоединившихся клеток достигало 186 % от контроля, что соответствовало 86%-ному повышению. Однако при дальнейшем увеличении времени кокультивирования различия между опытными и контрольными группами снижались: через 40 мин разница составляла 22 %, через 50 мин — лишь 11 % (рис. 13).

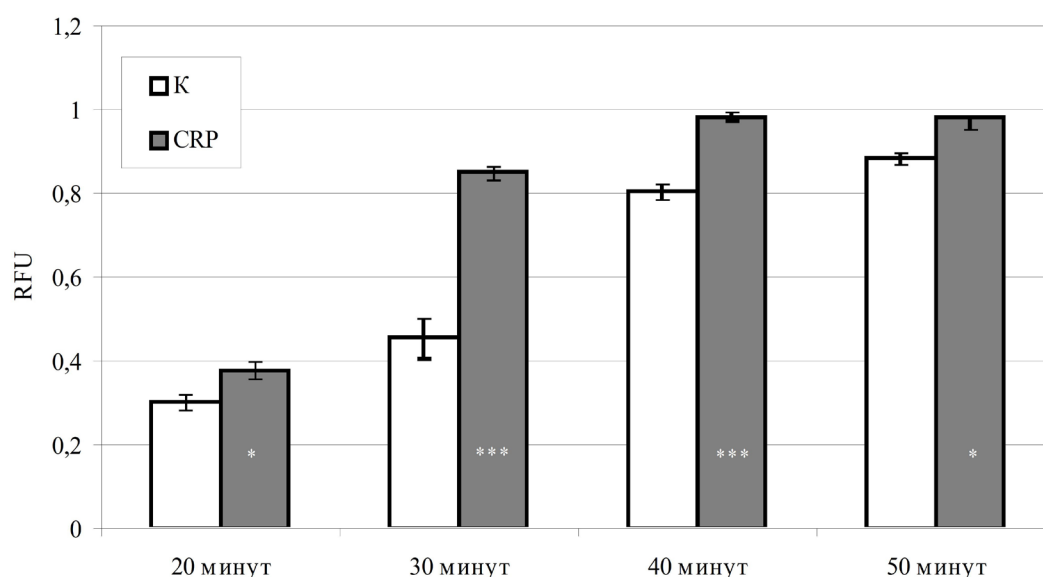


Рис. 13. Адгезия тучных клеток линии НМС-1 к Фб при кокультивировании смеси клеток в присутствии С-реактивного белка. Зависимость от времени

Примечание: белые столбцы — спонтанная адгезия тучных клеток к Фб; серые — адгезия в присутствии CRP, 50 мкг/мл. Достоверность различий с контролем: \* —  $p < 0,05$ , \*\*\* —  $p < 0,001$ .

Fig. 13. Adhesion of HMC-1 mast cells to Fb during co-culture of a cell mixture in the presence of C-reactive protein. Time dependence

Note: white bars — spontaneous adhesion of mast cells to Fb; gray bars — adhesion in the presence of CRP, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Significance of differences from control: \* —  $p < 0.05$ , \*\*\* —  $p < 0.001$ .

#### 6.4. Влияние С-реактивного белка на адгезивность эндотелиальных клеток линии EA.hy926 для тучных клеток линии НМС-1

Эксперименты продемонстрировали, что активация эндотелиальных клеток линии EA.hy926 С-реактивным белком (CRP) вызывала усиление адгезии тучных клеток НМС-1. Эффект CRP коррелировал с дозой: при концентрации 10 мкг/мл адгезивная активность увеличивалась на 50 %, а при 50 мкг/мл достигала 80 % относительно кон-

троля (нестимулированные эндотелиальные клетки). Статистический анализ подтвердил значимость различий между воздействием CRP в указанных концентрациях ( $p < 0,05$ ) (рис. 14).

Аналогичное усиление адгезии фиксировалось при стимуляции эндотелия агрегированным IgG (aIgG). При концентрации 10 мкг/мл aIgG интенсивность флуоресценции, отражающая количество прикрепившихся тучных клеток, возрастала на 60 %, а при 50 мкг/мл — на 43 %. Оба значения достоверно отличались от негативного контроля (адгезия к интактному эндотелию,  $p < 0,05$ ), однако различия между группами, обработанными разными дозами aIgG, не достигали статистической значимости ( $p > 0,05$ ) (рис. 14).

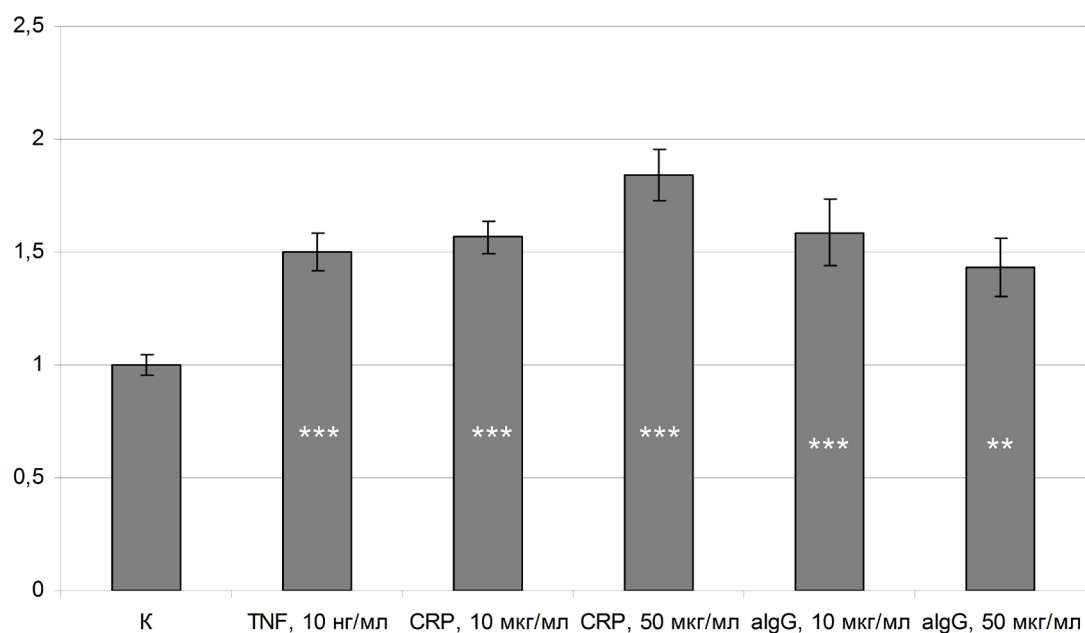


Рис. 14. Влияние С-реактивного белка и агрегированного IgG на адгезивные свойства эндотелия линии EA.hy926 для тучных клеток HMC-1

*Примечание.* По оси ординат — индекс стимуляции. Различия с контролем достоверны: \*\* —  $p < 0,01$ , \*\*\* —  $p < 0,001$ .

Fig. 14. Effect of C-reactive protein and aggregated IgG on the adhesive properties of EA.hy926 endothelium for HMC-1 mast cells

*Note:* the ordinate shows the stimulation index. Differences from control are significant: \*\* —  $p < 0.01$ , \*\*\* —  $p < 0.001$ .

Кроме того, в экспериментальных условиях адгезия тучных клеток HMC-1 к эндотелию, активированному провоспалительным цитокином TNF- $\alpha$  (10 нг/мл), повышалась в 1,5 раза по сравнению с контролем (рис. 14).

## 7. Влияние С-реактивного белка на активацию транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B в тучных клетках линии HMC-1

Клетки HMC-1, трансфицированные плазмидой pNF- $\kappa$ B-luc, реагировали на стимуляцию CRP синтезом люциферазы — люминесценция в клетках, стимулированных CRP, увеличивалась на 40 % по сравнению с контрольными (рис. 15).

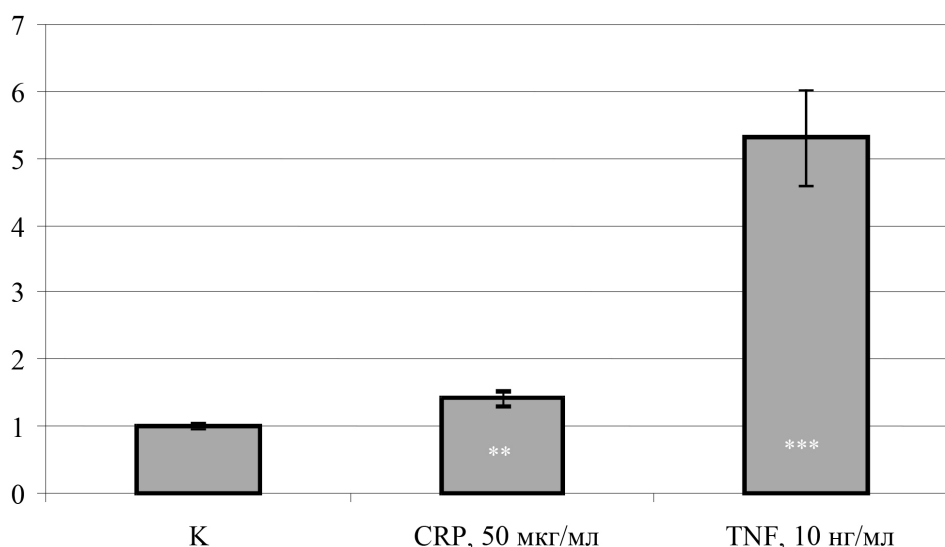


Рис. 15. Влияние С-реактивного белка человека на экспрессию репортерного гена люциферазы, находящегося под промотором NF-κB в клетках НМС-1, трансфицированных конструкцией pNF-κBlue

*Примечание.* По оси ординат — интенсивность люминесценции люциферазы в условных единицах (RLU); \*\* — различия с контролем достоверны,  $p < 0,01$ ; \*\*\* — различия с контролем достоверны,  $p < 0,001$ .

Fig. 15. Effect of human C-reactive protein on expression of the luciferase reporter gene driven by the NF-κB promoter in HMC-1 cells transfected with the pNF-κBlue construct

*Note:* the ordinate shows luciferase luminescence intensity in relative luminescence units (RLU); \*\* — differences from control are significant,  $p < 0.01$ ; \*\*\* — differences from control are significant,  $p < 0.001$ .

## Обсуждение

Результаты исследования подтверждают, что тучные клетки линии НМС-1 экспрессируют низкоаффинные Fcγ-рецепторы CD32 (FcγRII). Согласно литературным данным, интактные человеческие ТК, полученные из CD34<sup>+</sup> клеток крови, также экспрессируют CD32, но содержат минимальное количество мРНК CD64 (FcγRI) и CD16 (FcγRIII) в цитоплазме. При стимуляции интерфероном-γ (IFNγ) наблюдается индукция высокоаффинного FcγRI (CD64), тогда как экспрессия низкоаффинных рецепторов остается неизменной [11]. Наши данные согласуются с этим: интактные ТК линии НМС-1 демонстрируют базальную экспрессию CD64, которая усиливается под действием IFNγ. Максимальная экспрессия FcγRI регистрировалась через 24 ч после стимуляции, после чего ее уровень снижался.

Стоит отметить, что в ряде исследований утверждается, что единственным Fcγ-рецептором на ТК НМС-1 является CD32 [12]. В наших экспериментах мы не имели возможности использовать антитела, которые позволяли бы различать подтипы FcγRII — CD32a, CD32b и CD32c, поэтому мы не можем с уверенностью утверждать, какой из подтипов CD32 экспрессируется на ТК линии НМС-1. Ингибирующий рецептор CD32b, возможно, отсутствует на ТК человека, в отличие от базофилов крови. На ТК мышей, напротив, CD32b экспрессируется, причем его активация генерирует ингибиторный сигнал и ингибирует активацию, вызванную агрегацией FcεRI (высокоаффинного рецептора для IgE) [13]. В наших экспериментах как aIgG, так и CRP в основном

активировали ТК и во всяком случае не оказывали подавляющего действия ни на одну из функций ТК, поэтому мы говорим о том, что aIgG и CRP взаимодействуют с активирующим, а не ингибирующим Fcγ-рецептором.

Эксперименты выявили дозозависимое связывание CRP на поверхности ТК. Интересно, что связывание усиливалось в отсутствие  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ . CRP, будучи кальций-зависимым белком, меняет конформацию при насыщении ионами  $\text{Ca}^{2+}$ , что регулирует его взаимодействие с лигандами. Например, связывание с фосфорилхолином требует  $\text{Ca}^{2+}$ , тогда как взаимодействие с поликатионами/полианионами подавляется [10]. Это позволяет предположить, что CRP связывается с Fcγ-рецепторами через участки, не связанные с фосфорилхолин-специфичными сайтами.

Интересно, что связывание усиливалось в отсутствие  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ . Из литературных данных известно, что CRP, будучи кальций-зависимым белком, меняет конформацию при насыщении ионами  $\text{Ca}^{2+}$ , что регулирует его взаимодействие с лигандами [10]. Показано, что ионы кальция регулируют взаимодействие молекулы CRP с разными лигандами, переключают специфичность пентраксина с одного лиганда на другой. Так, например, для взаимодействия CRP с фосфорилхолин (ФХ)-содержащими лигандами (пневмококковым полисахаридом С и т. п.) насыщение молекулы CRP ионами кальция необходимо, оно ведет к открытию ФХ-специфичных сайтов, вместе с тем открывается площадка для посадки C1q. Поэтому молекула CRP, связавшая ФХ-содержащий лиганд, привлекает C1q и активирует комплемент по классическому пути. В то же время связывание пентраксином лигандов другого типа, таких как поликатионы и полианионы (например, гистонов, полирибонуклеотидов), напротив, тормозится ионами кальция. При насыщении молекулы CRP кальцием взаимодействие с лигандами этого типа блокируется вследствие того, что заряженные пептидные участки CRP, ответственные за контакт с поликатионами и полианионами, перестают экспонироваться на поверхности молекулы. Взаимодействие CRP с поликатионами/полианионами не сопровождается активацией комплемента. Принимая во внимание регулируемую роль ионов кальция в экспонировании ФХ-связывающих и заряженных сайтов CRP, можно заключить, что CRP связывается с Fcγ-рецепторами через участки, не связанные с фосфорилхолин-специфичными сайтами, и что связывание, скорее всего, осуществляется обратной стороной молекулы CRP, на которой расположены кластеры заряженных аминокислотных остатков [10].

Разрешающая способность метода позволяла зафиксировать связывание CRP, меченого биотином, с ТК, начиная с 12,5 мкг/мл (проточная цитометрия, стрептавидин, конъюгированный с APC). При концентрации CRP выше 100 мкг/мл дальнейшего усиления связывания с тучными клетками не происходило, что, скорее всего, обусловлено насыщением рецепторов на клетках, способных взаимодействовать с CRP. В присутствии как не меченого биотином CRP, так как и IgG связывание С-реактивного белка с клетками снижалось, что говорит о специфичности связывания и об общем рецепторе для CRP и aIgG на тучных клетках (см. рис. 6, в, г).

Несмотря на то что IFNγ вызывал усиление экспрессии FcγRI на ТК, он не оказывал влияния на связывание CRP с ТК. Возможно, это можно объяснить тем, что FcγRII представлен на клетках в большем количестве (см. рис. 2) и усиление экспрессии FcγRI проявляется несущественным изменением связывания CRP при измерении с помощью проточной цитометрии.

Показано, что стимуляция FcγRII тучных клеток человека не приводит к выходу гистамина из человеческих ТК. Кроме того, показано, что стимуляция HMC-1 aIgG не приводит к выходу TNF [12].

Таким образом, в норме FcγRII является единственным рецептором к иммуноглобулину G на тучных клетках человека, а значит, стимуляция ТК IgG не приводит к дегрануляции совсем либо вызывает ее в малой степени. Известно, что после стимуляции IFNγ ТК приобретают способность отвечать на IgG [14]. Наши данные не противоречат этому. Так, интактные клетки HMC-1 не отвечали на добавление в среду CRP достоверным выходом гистамина. Но если клетки были активированы сутки IFNγ, то в ответ

на стимуляцию CRP наблюдался выход гистамина. По данным литературы концентрация aIgG, при которой степень дегрануляции ТК максимальна, — 1 мкг/мл [14]. В наших экспериментах наибольший выход гистамина наблюдался при стимуляции CRP в концентрации 3 мкг/мл, то есть при концентрации CRP того же порядка.

ТК способны к дегрануляции не только при агрегации FcεRI, но и при агрегации CD64 (FcγRI). FcγRI-зависимая дегрануляция может быть вызвана не только действием антител к рецептору, но и при добавлении aIgG, а также при предварительной «сенсibilизации» человеческим иммуноглобулином IgG1 с последующим добавлением мышинных антител против человеческого IgG1 [14]. Интересно заметить, что подклассы IgG2 и IgG3 с соответствующими антителами анти-IgG не обладали способностью вызывать дегрануляцию ТК. Особенно интересно, что IgG3 не обладал способностью вызывать дегрануляцию ТК, стимулированных IFNγ, хотя этот подкласс имеет родство к FcγRI, сравнимое с IgG1. Высвобождение гистамина из ТК под действием IgG4/анти-IgG4 имело место, но было на порядок слабее, чем в случае IgG/IgG1 [14].

Из литературы известно о дегрануляции ТК в пораженных участках ткани при наличии отложения иммунных комплексов. Активированные ТК были обнаружены, например, в воспаленной синовиальной оболочке у больных ревматоидным артритом и склеродермией, в депозитах при васкулите IgG [14]. Известно, что для ряда бактериальных и вирусных инфекций характерно повышенное содержание IFNγ в тканях [15]. Становится ясен механизм, посредством которого происходит вовлечение ТК в патогенез таких заболеваний. Например, при псориазе в местах поражения наблюдается повышенное содержание IFNγ и ТК [16]. Кроме того, показано, что на этих клетках экспрессируются FcγRI [17]. Возможно, что таким образом ТК участвуют в поражении тканей, при которых показана патологическая роль ТК, а также повышенное содержание иммунных комплексов и CRP, например при псориазе [16] и ревматоидном артрите [18].

Таким образом, антиген-зависимый ответ ТК возможен не только при Th2-ассоциированном иммунном ответе, когда под действием IL-4 и IL-13 происходит синтез иммуноглобулинов класса IgE, но и при Th1-ответе, при котором секретируется IFNγ, вызывающий повышение экспрессии CD64 на клетках и синтез Ig G.

Как показали наши опыты, CRP и aIgG в концентрациях 10 и 50 мкг/мл оказывали стимулирующее действие на адгезивные свойства тучных клеток. Из литературных данных видно, что для С-реактивного белка характерно проявление провоспалительной активности [10]. Кроме того, показано, что агрегация Fcγ-рецепторов на поверхности мышинных тучных клеток приводит к усилению их адгезии к фибронектину [19].

Известно, что ТК всегда присутствуют в фиброзной ткани и что с ними связано развитие фиброза, однако механизмы, связывающие ТК с фиброзом, изучены недостаточно. Показано, что ТК стимулируют профибротические виды активности фибробластов путем образования контактов с фибробластами, активации их пролиферации и контракции коллагеновой сети [20]. ТК влияют на экспрессию на фибробластах рецепторов гистамина, серотонина, TNF, триптазы, а также на выброс фибробластами хемокинов CCL8, CCL13, CXCL4 и CXCL6 [20].

Как показали наши опыты, при стимуляции фибробластов С-реактивным белком все же происходит некоторое усиление адгезии к ним тучных клеток (см. рис. 9), несмотря на отсутствие на фибробластах рецепторов к CRP (то есть Fcγ-рецепторов). Как известно, растущие в культуре фибробласты продуцируют белки матрикса, создавая вокруг себя белковое микроокружение. У CRP имеются сайты связывания с различными белками матрикса соединительной ткани, в частности с фибронектином и ламинином [9; 10]. На обратной же стороне молекулы CRP находятся сайты связывания с Fcγ-рецепторами [10]. В связи с этим мы предположили, что в случае предынкубации фибробластов с CRP этот пентраксин может способствовать их адгезии с тучными клетками не прямо, то есть не путем непосредственного связывания с фибробластами и их активации, а косвенно — связываясь с компонентами межклеточного матрикса (фибронектином и другими белками). Когда же происходит добавление тучных клеток,

то они, в свою очередь, связываются своими FcγR с CRP, ассоциированным с матриксом, и таким образом происходит усиление адгезии. Это предположение согласуется с тем, что ответственные за контакт с белками матрикса фибронектином и ламинином сайты CRP — это FX-специфичные сайты, расположенные на одной поверхности плоской дискоидной молекулы CRP, а сайты связывания с Fcγ-рецепторами — на другой [10].

Это подтверждается результатом следующего эксперимента. ТК перед добавлением к Фб, инкубированным с CRP в концентрации 50 мкг/мл (или с TNF в концентрации 10 нг/мл) в течение суток, обработали Fc-фрагментами иммуноглобулина класса G, чтобы «блокировать» на них Fcγ R. Адгезия обработанных Fc-фрагментами тучных клеток к фибробластам, активированным CRP, была достоверно ниже по сравнению с адгезией ТК с незаблокированными Fcγ-рецепторами и была на уровне адгезии интактных ТК к необработанным фибробластам, тогда как на степень прикрепления ТК к Фб, активированным TNF, блокировка Fcγ-рецепторов ТК не влияла (см. рис. 12).

Если CRP выступает в адгезии ТК к Фб в качестве якоря, то можно было предположить, что, если инкубацию Фб с ТК проводить в присутствии CRP, то интенсивность адгезии ТК к Фб повысится. И действительно, при совместной инкубации ТК и Фб в присутствии CRP наличие в среде CRP приводило к достоверному увеличению степени адгезии (см. рис. 13).

Таким образом, было подтверждено предположение, что С-реактивный белок не активизирует фибробласты, а, скорее, является якорем для ТК в матриксе соединительной ткани. В литературе было описано, что мембранная форма CRP, экспрессируемая человеческими моноцитами, способна выполнять функцию молекулы клеточной адгезии, участвуя во взаимодействии моноцитов и фибронектина [21]. Известно также, что связывание CRP с фибронектином препятствует связыванию Фб с фибронектином, и это ингибирование  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимо [10]. Зависимость такого ингибирования от ионов  $\text{Ca}^{2+}$  говорит о том, что CRP связывается с фибронектином своим эпитопом, отвечающим за взаимодействие с FX (ингибирование фосфорилхолином связывания CRP с фибронектином продемонстрировано в той же работе), сайт связывания с Fcγ-рецепторами располагается на обратной стороне, но на Фб Fcγ-рецепторы отсутствуют, поэтому происходит ингибция адгезии Фб на фибронектин. В это же время клетки, экспрессирующие на своей поверхности Fcγ-рецепторы, по нашим данным, наоборот, в присутствии CRP активнее адгезируют к белкам внеклеточного матрикса (рис. 16).

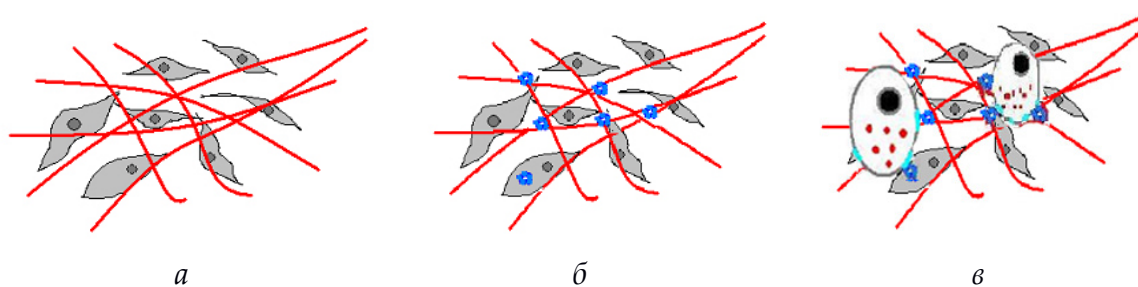


Рис. 16. Стимуляция CRP-адгезии клеток к межклеточному матриксу:

- a* — фибробласты и синтезированный ими внеклеточный матрикс;  
*б* — CRP связался с белками (например, фибронектином и ламинином) межклеточного матрикса стороной, на которой располагаются сайты  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого связывания с лигандами; *в* — клетки, взаимодействуя с CRP при помощи FcγR, заякориваются в тканях

Fig. 16. CRP stimulation of cell adhesion to the extracellular matrix:

- a* — fibroblasts and the extracellular matrix they synthesize; *b* — CRP bound to extracellular matrix proteins (e. g., fibronectin and laminin) via the face bearing the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent ligand-binding sites; *c* — cells interacting with CRP via FcγR anchor themselves in tissue.

В литературе показано, что CRP индуцирует активацию NF-κB в культуре мезангиальных клеток почечных клубочков человека. В концентрациях 12,5–100 мкг/мл CRP дозозависимо повышал способность NF-κB связываться с ДНК в ядре с максимумом через 3 ч после инкубации клеток с CRP *in vitro*. Инкубация мезангиальных клеток с CRP усиливала также NF-κB-зависимый процесс экспрессии мРНК макрофагального хемотактического протеина-1 (MCP-1). Также под влиянием CRP возрастала внутриклеточная концентрация кальция и образование реактивных форм кислорода [22].

В исследованиях, посвященных изучению роли CRP в атерогенезе и развитии сердечно-сосудистых осложнений, показано, что CRP действует на клетки сосудистой стенки как провоспалительный индуктор, активирующий эндотелиальные клетки к приобретению так называемого воспалительного фенотипа и проатерогенных свойств. В частности, установлено, что его провоспалительное действие в отношении эндотелиальных клеток проявляется в усилении экспрессии адгезионных молекул VCAM-1 и CD40, обеспечивающих приток и прикрепление лейкоцитов к стенке сосуда. CRP стимулировал экспрессию мРНК VCAM-1, синтез и экспрессию молекулы VCAM-1, а также экспрессию CD40 и активировал промотор гена VCAM-1, причем эти эффекты CRP происходили при участии протеинкиназы C, митогенактивируемой протеинкиназы p38MAPK, тирозинкиназы и транскрипционного фактора NF-κB. Ингибиторы перечисленных киназ и ингибиторы NF-κB (партенолид, пирролидинтиокарбамат) отменяли индукцию VCAM-1 C-реактивным белком [23].

Показано, что активирующее действие CRP на экспрессию адгезионной молекулы VCAM-1 эндотелиальными клетками аорты *in vitro*, опосредуемое через активацию фактора NF-κB, происходит при участии Fcγ-рецепторов II типа. Это было подтверждено путем ингибиции мРНК CD32 с помощью нескольких сайленс-РНК, направленных против участка мРНК CD32 длиной 21 нуклеотид. Клетки, инкубированные с сайленс-РНК, не экспрессировали CD32 и не отвечали усилением экспрессии VCAM-1 на стимуляцию C-реактивным белком [23].

NF-κB-зависимый путь включается и при активации клеток другими лигандами Fc-рецепторов, в частности их классическим лигандом — иммуноглобулинами класса Ig G. Так, показано, что в дендритных клетках человека, полученных из моноцитов крови, активация Fcγ-рецепторов II типа (FcγRII, CD32) агрегированным (иммобилизованным) IgG индуцирует дифференцировку и синтез цитокинов (IL-10), а также вызывает появление способности индуцировать пролиферацию аллогенных Т-клеток. Эти реакции дендритных клеток на сшивку FcγRII происходят при участии NF-κB-зависимого пути, с перемещением белков NF-κB p65 и c-Rel из цитоплазмы в ядро. Ответ дендритных клеток на IgG отменялся в присутствии блокирующих антител против CD32 [24].

Показано, что стимуляция C-реактивным белком приводит к усилению адгезивных свойств тучных клеток и клеток эндотелия (см. рис. 7, 14, табл. 3). Как видно из наших данных (см. рис. 1, 2) и данных литературы, у C-реактивного белка и aIgG одни и те же рецепторы — FcγR I и II типов [25]. Результаты наших экспериментов также показали стимулирующее влияние aIgG на адгезию клеток. Таким образом, можно сделать заключение, что активация FcγRII приводит к запуску сигнального каскада, результатом которого является активация генов, отвечающих за адгезию клеток друг к другу или к иным субстратам, например к белкам матрикса соединительной ткани. Подобное действие CRP, в частности, было показано на эндотелиальных клетках, выделенных из орты [25]. Кроме того, авторы показали, что при выключении гена CD32 при помощи siRNA происходит снижение адгезивных свойств клеток эндотелия относительно интактных клеток, обработанных CRP. Такого же эффекта авторы достигали при добавлении в среду к эндотелиальным клеткам блокирующих антител против CD32 или против CD64.

Таблица 3

**Влияние С-реактивного белка и агрегированного IgG на адгезию клеток исследуемых линий (степень усиления по сравнению с контролем), %**

Table 3

**Effect of C-reactive protein and aggregated IgG on the adhesion of the studied cell lines (percentage increase relative to control), %**

| Обработаны CRP или aIgG | Не обработаны ничем | CRP | aIgG |
|-------------------------|---------------------|-----|------|
| HMC-1                   | Фибробласты         | 54  | 60   |
| EA.hy926                | HMC-1               | 80  | 43   |

*Примечание:* CRP и aIgG использованы в концентрации 50 мкг/мл. Контроль — уровень адгезии при использовании соответствующей пары необработанных клеток.

*Note:* CRP and aIgG were used at a concentration of 50 µg/ml. Control: adhesion level for the corresponding pair of untreated cells.

Таким образом, наши опыты продемонстрировали, что основными рецепторами для CRP на эндотелиальных клетках EA.hy926 (как и на эндотелиальных клетках, выделенных из аорты или пупочной вены, что известно из литературы), а также на тучных клетках HMC-1 служат рецепторы к иммуноглобулину класса G — низкоаффинные FcγRI.

Кроме того, действуя на FcγR ТК, CRP вызывает цепь внутриклеточных процессов, результатом которых является изменение их адгезивных свойств, не связанное с усилением экспрессии адгезионных молекул CD54 и CD11b, следовательно, механизм усиления адгезивности ТК под действием CRP и aIgG еще требует дальнейшего изучения.

Высокоаффинный рецептор FcγRI также выступает рецептором для CRP на иммунокомпетентных клетках, но в отличие от FcγRII, экспрессируемого практически всеми клетками гемопоэтического происхождения и эндотелием, представлен только на моноцитах и макрофагах, а после стимуляции IFNγ тучные клетки так же начинают его экспрессировать. При этом стимуляция ТК линии HMC-1 IFNγ приводит к экспрессии CD64, активация которого CRP приводит к дегрануляции ТК.

**Финансирование.** Данная работа выполнена при финансовой поддержке плановой темы НИР ФГБНУ «ИЭМ» FGWG-2025-0004 (рег. № 1022041101001-1).

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи. Все авторы утвердили окончательную версию рукописи и принимают на себя ответственность за все аспекты работы, подразумевающую надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью или добросовестностью любой части работы.

#### Вклад авторов:

**А. С. Трулев** — разработка концепции и дизайн научной работы, сбор данных;

**Н. А. Кутукова** — сбор данных и статистический анализ;

**И. В. Кудрявцев** — сбор данных и критический пересмотр рукописи.

**Funding.** This study was supported by the State-assigned Research Project of the Institute of Experimental Medicine, FGWG-2025-0004 (reg. № 1022041101001-1).

**Conflict of Interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article. All authors approved the final version of the manuscript and take responsibility for all aspects of the work, including ensuring that any questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

**Authors' contribution:**

**Trulioff A. S.** — conceptualization and study design, data collection;

**Kutukova N. A.** — data collection and statistical analysis;

**Kudriavtsev I. V.** — data collection, reviewing and editing.

**Список литературы**

1. Crivellato E., Ribatti D. The mast cell: an evolutionary perspective. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2010, 85(2), 347–360, DOI: 10.1111/j.1469-185x.2009.00105.x.
2. Rivellesse F., Rossi F. W., Galdiero M. R., Pitzalis C., de Paulis A. Mast Cells in Early Rheumatoid Arthritis. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20(8), 2040, DOI: 10.3390/ijms20082040.
3. Ribatti D., Tamma R., Annese T. Mast cells and angiogenesis in multiple sclerosis. *Inflamm. Res.* 2020, 69(11), 1103–1110, DOI: 10.1007/s00011-020-01394-2.
4. Conti P., Caraffa A., Mastrangelo F., Tettamanti L., Ronconi G., Frydas I., et al. Critical role of inflammatory mast cell in fibrosis: Potential therapeutic effect of IL-37. *Cell Prolif.* 2018, 51(5), e12475, DOI: 10.1111/cpr.12475.
5. Weber A., Knop J., Maurer M. Pattern analysis of human cutaneous mast cell populations by total body surface mapping. *British Journal of Dermatology.* 2003, 148(2), 224–228, DOI: 10.1046/j.1365-2133.2003.05090.x.
6. Huttenlocher A., Sandborg R. R., Horwitz A. F. Adhesion in cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1995, 7(5), 697–706, DOI: 10.1016/0955-0674(95)80112-x.
7. Dileepan K. N., Raveendran V. V., Sharma R., Abraham H., Barua R., Singh V., et al. Mast cell-mediated immune regulation in health and disease. *Front. Med.* 2023, 10, 1213320, DOI: 10.3389/fmed.2023.1213320.
8. Ma Y. J., Parente R., Zhong H., Sun Y., Garlanda C., Doni A. Complement-pentraxins synergy: Navigating the immune battlefield and beyond. *Biomed. Pharmacother.* 2023, 169, 115878, DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115878.
9. Singh B., Goyal A., Patel B. C. C-Reactive Protein: Clinical Relevance and Interpretation. In: *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing; 2025.
10. Назаров П. Г. Реактанты острой фазы воспаления. Наука, 2001, ISBN 5-02-026122-X.
11. Okayama Y., Kirshenbaum A. S., Metcalfe D. D. Expression of a functional high-affinity IgG receptor, Fc gamma RI, on human mast cells: up-regulation by IFN-gamma. *The Journal of Immunology.* 2000, 164(8), 4332–4339, DOI: 10.4049/jimmunol.164.8.4332.
12. Wedi B., Lewrick H., Butterfield J. H., Kapp A. Human HMC-1 mast cells exclusively express the Fc gamma RII subtype of IgG receptor. *Arch. Dermatol. Res.* 1996, 289(1), 21–27, DOI: 10.1007/s004030050147.
13. Kanagaratham C., Derakhshan T., El Ansari Y. S., Furiness K. N., Hollers E., Keldsen M., et al., IgG:FcγRIIb signals block effector programs of IgE:FcεRI-activated mast cells but spare survival pathways. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2023, 152(2), 453–468, DOI: 10.1016/j.jaci.2023.03.027.
14. Woolhiser M. R., Okayama Y., Gilfillan A. M., Metcalfe D. D. IgG-dependent activation of human mast cells following up-regulation of Fc gamma RI by IFN-gamma. *Eur. J. Immunol.* 2001, 31(11), 3298–3307, DOI: 10.1002/1521-4141(200111)31:11 < 3298::aid-immu3298 > 3.0.co;2-u.
15. Jouanguy E., Doffinger R., Dupuis S., Pallier A., Altare F., Casanova J. L. IL-12 and IFN-gamma in host defense against mycobacteria and salmonella in mice and men. *Curr. Opin. Immunol.* 1999, 11(3), 346–351, DOI: 10.1016/s0952-7915(99)80055-7.
16. Sieminska I., Pieniawska M., Grzywa T. M. The Immunology of Psoriasis-Current Concepts in Pathogenesis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2024, 66(2), 164–191, DOI: 10.1007/s12016-024-08991-7.
17. Tkaczyk C., Okayama Y., Woolhiser M. R., Hagaman D. D., Gilfillan A. M., Metcalfe D. D. Activation of human mast cells through the high affinity IgG receptor. *Mol. Immunol.* 2002, 38(16–18), 1289–1293, DOI: 10.1016/s0161-5890(02)00077-9.

18. Pope J. E., Choy E. H. C-reactive protein and implications in rheumatoid arthritis and associated comorbidities. *Semin. Arthritis Rheum.* 2021, 51(1), 219–229, DOI: 10.1016/j.semarthrit.2020.11.005.
19. Pastwińska J., Walczak-Drzewiecka A., Łukasiak M., Ratajewski M., Dastyk J. Hypoxia regulates human mast cell adhesion to fibronectin via the PI3K/AKT signaling pathway. *Cell Adh. Migr.* 2020, 14(1), 106–117, DOI: 10.1080/19336918.2020.1764690.
20. Foley T. T., Siggers G. C., Moyer K. E., Ehrlich H. P. Rat mast cells enhance fibroblast proliferation and fibroblast-populated collagen lattice contraction through gap junctional intercellular communications. *Plast. Reconstr. Surg.* 2011, 127(4), 1478–1486, DOI: 10.1097/PRS.0b013e318208d0bb.
21. Kolb-Bachofen V., Puchta-Teudt N., Egenhofer C. Expression of membrane-associated C-reactive protein by human monocytes: indications for a selectin-like activity participating in adhesion. *Glycoconj. J.* 1995, 12(2), 122–127, DOI: 10.1007/BF00731355.
22. Chang J. W., Kim C. S., Kim S. B., Park S. K., Park J. S., Lee S. K. C-reactive protein induces NF- $\kappa$ B activation through intracellular calcium and ROS in human mesangial cells. *Nephron Exp. Nephrol.* 2005, 101(4), e165–172, DOI: 10.1159/000087940.
23. Liang Y.-J., Shyu K.-G., Wang B.-W., Lai L.-P. C-reactive protein activates the nuclear factor- $\kappa$ B pathway and induces vascular cell adhesion molecule-1 expression through CD32 in human umbilical vein endothelial cells and aortic endothelial cells. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2006, 40(3), 412–420, DOI: 10.1016/j.jmcc.2005.12.008.
24. Banki Z., Kacani L., Mullauer B., Wilflingseder D., Obermoser G., Niederegger H., et al. Cross-linking of CD32 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells via NF- $\kappa$ B signaling pathway. *J. Immunol.* 2003, 170(8), 3963–3970, DOI: 10.4049/jimmunol.170.8.3963.
25. Bharadwaj D., Stein M. P., Volzer M., Mold C., Clos T. W. D. The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is fcgamma receptor II. *J. Exp. Med.* 1999, 190(4), 585–590, DOI: 10.1084/jem.190.4.585.

## Об авторах

**Андрей Сергеевич Трулев**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела вирусологии и иммунологии имени академика А. А. Смородинцева, Институт экспериментальной медицины, Россия.

ORCID: 0000-0002-7495-446X

E-mail: trulioff@gmail.com

**Надежда Александровна Кутукова**, научный сотрудник отдела вирусологии и иммунологии имени академика А. А. Смородинцева, Институт экспериментальной медицины, Россия.

ORCID: 0000-0002-6765-6819

E-mail: i\_n\_a\_777@mail.ru

**Игорь Владимирович Кудрявцев**, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией, отдел вирусологии и иммунологии имени академика А. А. Смородинцева, Институт экспериментальной медицины, Россия.

ORCID: 0000-0001-7204-7850

E-mail: igorek1981@yandex.ru

## The authors

**Andrey S. Trulioff**, PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Virology and Immunology named after Academician A. A. Smorodintsev, Institute of Experimental Medicine, Russia.

ORCID: 0000-0002-7495-446X

E-mail: trulioff@gmail.com

**Nadezhda A. Kutukova**, Researcher, Department of Virology and Immunology named after Academician A. A. Smorodintsev, Institute of Experimental Medicine, Russia.

ORCID: 0000-0002-6765-6819

E-mail: i\_n\_a\_777@mail.ru

**Igor V. Kudriavtsev**, PhD (Biology), Head of Laboratory, Department of Virology and Immunology named after Academician A. A. Smorodintsev, Institute of Experimental Medicine, Russia.

ORCID: 0000-0001-7204-7850

E-mail: igorek1981@yandex.ru

Оригинальная исследовательская статья

## ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ ПРИ ГЛИКОГЕНОВОЙ БОЛЕЗНИ ТИПА Ib (КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ)

О. В. Курбатова<sup>1\*</sup>, М. В. Коняшин<sup>1</sup>, А. О. Анушенко<sup>1</sup>,  
Д. Г. Купцова<sup>1</sup>, С. В. Петричук<sup>1</sup>, Г. Б. Мовсисян<sup>1</sup>,  
Т. В. Радыгина<sup>1</sup>, С. С. Акулова<sup>1</sup>, Е. Л. Семикина<sup>1, 2</sup>,  
А. В. Винокурова<sup>1</sup>, А. С. Потапов<sup>1, 2</sup>, А. П. Фисенко<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Национальный медицинский  
исследовательский центр здоровья детей,  
119296, Россия, Москва

<sup>2</sup> Первый Московский государственный медицинский  
университет имени И. М. Сеченова  
(Сеченовский университет),  
119991, Россия, Москва

\*Автор-корреспондент: putintseva@mail.ru

### Для цитирования:

Курбатова О. В., Коняшин М. В.,  
Анушенко А. О.,  
Купцова Д. Г., Петричук С. В.,  
Мовсисян Г. Б., Радыгина Т. В.,  
Акулова С. С., Семикина Е. Л.,  
Винокурова А. В., Потапов А. С.,  
Фисенко А. П. Иммунологические  
нарушения при гликогеновой бо-  
лезни типа Ib (клинический случай).  
*Современные направления в биомеди-  
цине*. 2026;2(1):46—59.  
<https://doi.org/10.5922/ATB-2026-2-1-3>

Поступила  
03.02.2026 г.  
Прошла рецензирование  
11.03.2026 г.  
Принята к печати  
13.03.2026 г.  
Опубликована  
09.09.2026 г.

© Курбатова О. В., Коняшин М. В.,  
Анушенко А. О., Купцова Д. Г.,  
Петричук С. В., Мовсисян Г. Б.,  
Радыгина Т. В., Акулова С. С.,  
Семикина Е. Л., Винокурова А. В.,  
Потапов А. С., Фисенко А. П., 2026  
© Оформление, БФУ им. И. Канта,  
2026

**Резюме:** Гликогеновая болезнь типа Ib относится к редким наследственным заболеваниям углеводного обмена и характеризуется сочетанием тяжелых метаболических и иммунологических нарушений. В статье представлен клинический случай ребенка с гликогеновой болезнью типа Ib, осложненной хронической нейтропенией, рецидивирующими инфекционно-воспалительными поражениями кожи и признаками иммунной дисрегуляции. Проведена комплексная оценка клинических, лабораторных, инструментальных и иммунологических показателей, включая функциональную активность нейтрофилов, иммунофенотипирование лимфоцитов, анализ митохондриальной активности и исследование сигнального пути NF-κB.

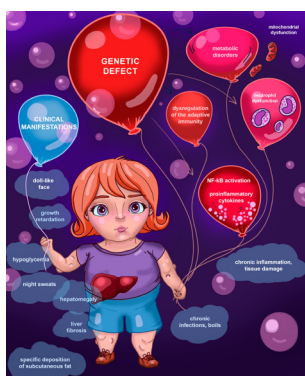
Полученные данные демонстрируют системный характер иммунных нарушений при гликогеновой болезни типа Ib и подчеркивают клиническую значимость расширенного иммунологического мониторинга у данной категории пациентов.

**Ключевые слова:** гликогеновая болезнь типа Ib, клинический случай, нейтропения, иммунный статус, сукцинатдегидрогеназа, NF-κB, дети

Original research article

## IMMUNOLOGICAL DISORDERS IN GLYCOGEN STORAGE DISEASE TYPE Ib: A CASE REPORT

O. V. Kurbatova<sup>1\*</sup>, M. V. Konyashin<sup>1</sup>, A. O. Anoushenko<sup>1</sup>,  
D. G. Kuptsova<sup>1</sup>, S. V. Petrichuk<sup>1</sup>, G. B. Movsisyan<sup>1</sup>,  
T. V. Radygina<sup>1</sup>, S. S. Akulova<sup>1</sup>, E. L. Semikina<sup>1, 2</sup>,  
A. V. Vinokurova<sup>1</sup>, A. S. Potapov<sup>1, 2</sup>, A. P. Fisenko<sup>1</sup>



<sup>1</sup> National Medical Research Centre for Children's Health,  
Moscow, Russian Federation,  
119296, Moscow, Russia

<sup>2</sup> I. Sechenov First Moscow State Medical University  
(Sechenov University), Moscow, Russian Federation,  
119991, Moscow, Russia

\* Correspondence: putintseva@mail.ru

### To cite this article:

Kurbatova O. V., Konyashin M. V.,  
Anoushenko A. O.,  
Kuptsova D. G., Petrichuk S. V.,  
Movsisyan G. B., Radygina T. V.,  
Akulova S. S., Semikina E. L.,  
Vinokurova A. V., Potapov A. S.,  
Fisenko A. P. Immunological Disorders  
in Glycogen Storage Disease Type Ib:  
A Case Report. *Advanced Targets in  
Biomedicine*. 2026;2(1):46–59.  
<https://doi.org/10.5922/ATB-2026-2-1-3>

### Received

03.02.2026

### Revised

11.03.2026

### Accepted

13.03.2026

### Published

09.09.2026

© Kurbatova O. V., Konyashin M. V.,  
Anoushenko A. O., Kuptsova D. G.,  
Petrichuk S. V., Movsisyan G. B.,  
Radygina T. V., Akulova S. S.,  
Semikina E. L., Vinokurova A. V.,  
Potapov A. S., Fisenko A. P.  
© Design, IKBFU, 2026

**Abstract:** Glycogen storage disease type Ib is a rare inherited metabolic disorder characterized by a combination of severe metabolic abnormalities and immune dysfunction. This article presents a clinical case of a pediatric patient with glycogen storage disease type Ib, complicated by chronic neutropenia, recurrent infectious and inflammatory skin lesions, and signs of immune dysregulation. A comprehensive clinical, laboratory, instrumental, and immunological assessment was performed, including evaluation of neutrophil functional activity, lymphocyte immunophenotyping, mitochondrial activity analysis, and assessment of the NF-κB signaling pathway. The findings demonstrate the systemic nature of immune alterations in GSD Ib and highlight the clinical relevance of extended immunological monitoring in affected patients.

**Keywords:** glycogen storage disease type Ib, clinical case, neutropenia, immune status, succinate dehydrogenase, NF-κB, children

## Введение

Врожденные нарушения обмена веществ представляют собой гетерогенную группу наследственных заболеваний, которые могут манифестировать в различные возрастные периоды и характеризуются широкой вариабельностью клинических проявлений, часто маскирующихся под более распространенные патологические состояния. В связи с этим данные заболевания нередко диагностируются с задержкой, что повышает риск развития тяжелых метаболических и органных осложнений. В клинической практике принципиально важно учитывать возможность наследственных метаболических дефектов при проведении дифференциальной диагностики у детей с сочетанным поражением печени, нарушениями роста и рецидивирующими инфекциями [1].

Гликогеновая болезнь (ГБ) относится к группе наследственных заболеваний углеводного обмена, обусловленных дефектами ферментов или транспортных белков, участвующих в метаболизме гликогена. Гликогеновая болезнь типа Ib является редкой аутосомно-рецессивной формой заболевания, связанной с недостаточностью микросомального транспортного белка транслоказы глюкозо-6-фосфатазы (T1), что приводит к избыточному накоплению гликогена нормальной структуры преимущественно в печени, почках и слизистой оболочке кишечника [1; 2].

Мутации гена SLC17A4, локализованного в области 11q23.3, лежат в основе молекулярного патогенеза ГБ типа Ib и определяют не только метаболические, но и иммунологические нарушения, характерные для данного заболевания. Распространенность ГБ типа Ib составляет около 1:20 000 новорожденных, что относит его к категории орфанных заболеваний [3].

Классическими клиническими проявлениями ГБ типа Ib являются гипогликемия и гепатомегалия, однако по мере прогрессирования заболевания формируется мультисистемное поражение, включающее дислипидемию, поражение почечных канальцев, остеопению, задержку физического развития и выраженные инфекционно-воспалительные осложнения [4].

Особое место в клинической картине ГБ типа Ib занимают иммунологические нарушения. Специфическим признаком данной формы заболевания является нейтропения, сопровождающаяся снижением функциональной активности нейтрофилов, включая нарушение хемотаксиса и респираторного взрыва [5]. Современные данные свидетельствуют о том, что иммунная дисфункция при ГБ типа Ib не ограничивается врожденным иммунитетом, а затрагивает также адаптивные звенья, что способствует формированию хронического воспаления и аутоиммунных проявлений [5–12].

Показано наличие признаков митохондриальной дисфункции, степень выраженности которых зависит от типа гликогеноза у детей, причем активность ферментов лимфоцитов коррелирует с основными параметрами оценки тяжести состояния пациентов [13].

Метаболические абберации лежат в основе многих хронических заболеваний и могут усугублять течение патологий, что связано со сбоем нормальных биохимических процессов в организме [13–15]. Известно, что ядерный фактор каппа В (NF-κB) участвует в координации врожденного и адаптивного иммунитета, воспалительных реакций и других процессов, при этом показано, что наличие митохондриальной дисфункции может существенно влиять на активность NF-κB [14]. При нарушении работы митохондрий происходит активация апоптотических путей, накопление активных форм кислорода, нарушение энергетического обмена, изменение баланса про- и противовоспалительных цитокинов [16]. Эти изменения могут приводить к усиленной активации NF-κB, поддержанию хронического воспаления, нарушению иммунного ответа [16–18].

В связи с редкостью заболевания и ограниченным числом наблюдений представление детальных клинических случаев с углубленной иммунологической характеристикой имеет большое значение для расширения представлений о патогенезе ГБ типа Ib и оптимизации подходов к ведению пациентов.

## Клинический случай

Статья, написана в рамках диссертационного исследования, получено одобрение локальным независимым этическим комитетом (ЛНЭК) — протокол № 5 от 01.06.2023, что подтверждает соблюдение этических норм (Хельсинкская декларация) при работе с пациентами или биологическим материалом.

Ребенок Д., имеющий возраст на момент текущей госпитализации 5 лет 9 месяцев, наблюдается с диагнозом гликогеновая болезнь типа 1b, печеночная форма. Вторичный миелодиспластический синдром (хроническая нейтропения, нормохромная анемия смешанного генеза легкой степени тяжести). Белково-энергетическая недостаточность умеренной степени. Рецидивирующее гнойно-воспалительное поражение кожи (фурункулез). Фиброз печени F1 по шкале METAVIR. Диагноз гликогеновой болезни типа 1b верифицирован молекулярно-генетически: у пациента выявлена мутация в гене SLC37A4 (с.1015G>T; p.Gly339Cys), приводящая к аминокислотной замене глицина на цистеин в позиции 339 белка G6PT и ассоциированная с нарушением транспорта глюкозо-6-фосфата.

Жалобы при поступлении включали увеличение объема живота, наличие распространенных фурункулов, беспокойство ребенка, задержку моторного, речевого и психического развития.

Анамнез заболевания отягощен частыми инфекционно-воспалительными эпизодами. В период до госпитализации у ребенка отмечались множественные рецидивы фурункулеза (до 7 эпизодов в течении жизни), острый бронхит, правосторонняя пневмония, ветряная оспа, шигеллез *Shigella flexneri* 2a (гастроэнтероколитический вариант, тяжелая форма), эпизоды одышки в покое и судорожный синдром на фоне гипогликемии.

При поступлении состояние средней степени тяжести. Кожные покровы с признаками распространенного гнойно-воспалительного поражения. По данным лабораторного обследования в общем анализе крови выявлены анемия (Hb 99 г/л), эритропения ( $3,4 \cdot 10^{12}/л$ ), относительный ретикулоцитоз, тромбоцитоз ( $601 \cdot 10^9/л$ ), выраженная нейтропения ( $0,67 \cdot 10^9/л$ ), ускорение СОЭ до 59 мм/ч. Остальные показатели клеточного состава крови находились в пределах возрастного референсного интервала.

В биохимическом анализе крови отмечались признаки цитолиза (АЛТ 45 Ед/л, АСТ 35 Ед/л) при нормальных маркерах холестаза, повышение общего белка до 83 г/л, дефицит железа (4,9 мкмоль/л) на фоне повышенного ферритина (168 нг/мл), гипергаммаглобулинемия (IgG 15,7 г/л, IgM 1,8 г/л, IgA 2,8 г/л), повышение уровня С-реактивного белка до 62 мг/л, снижение креатинина до 10 мкмоль/л и мочевины до 1,7 ммоль/л, гипогликемия (3,4 ммоль/л).

Печень заметно увеличена, выступает из-под края реберной дуги по передней подмышечной линии +9 см, по средино-ключичной линии на +9 см. По данным ультразвукового исследования органов брюшной полости выявлены признаки выраженной гепатомегалии, диффузных паренхиматозных изменений печени, спленомегалии и вторичных изменений поджелудочной железы. Фиброэластография печени показала эластичность от 4,4 до 10,0 кПа (IQR 3,9; S-rate 100 %), что соответствует слабому фиброзу печени (F1 по шкале METAVIR). Оценка костного возраста по данным рентгенографии кистей выявила отставание от календарного возраста на 6—8 месяцев.

## Иммунологическая характеристика

Оценка функциональной активности нейтрофилов проводилась методом проточной цитометрии с использованием набора FagoFlowEx® Kit («ЭКСБИО Прага, а. с.», Чешская Республика). У пациента выявлено выраженное снижение индекса фагоцитарной активности до 27,3 по сравнению с условно здоровым донором (57,8), что свидетельствует о значимом нарушении врожденного иммунного ответа (рис. 1).

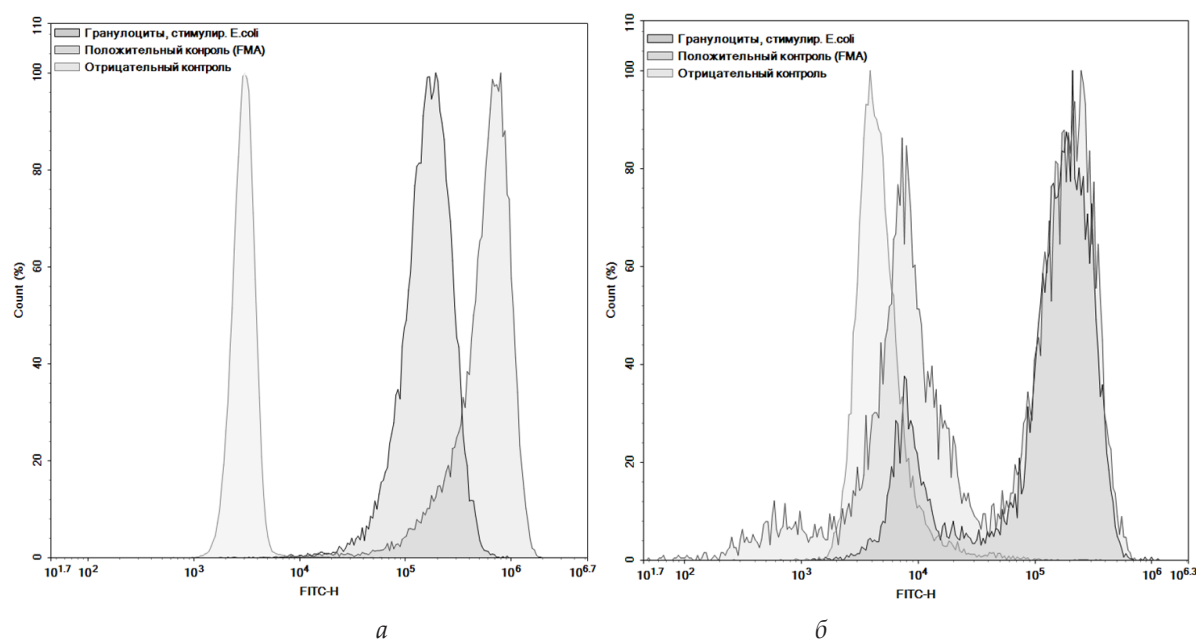


Рис. 1. Показатели фагоцитарной активности у условно здорового донора, индекс стимуляции = 57,8 (а) и у пациента Д. с ГБ типа 1b, индекс стимуляции = 27,3 (б)

Fig. 1. Indicators of phagocytic activity in a conditionally healthy donor (a) and in patient D. with GB1b (b)

Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови проводили на точном цитофлуориметре CYTOMICS FC500 (Beckman Coulter, США) с использованием моноклональных антител, меченных флуорохромами: CD3-PC-5, CD4-FITC, CD127-PE, CD161-PE, CD25 PE-Cy7, CD45-PerCP, CD45-PC7 (Beckman Coulter, США). Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови выявило повышение абсолютного количества Т-лимфоцитов, Т-цитотоксических лимфоцитов и NK-клеток при снижении относительного содержания Т-хелперов и В-лимфоцитов, что привело к снижению соотношения  $CD4^+/CD8^+$  до 0,62 (табл. 1). Отмечалось значимое увеличение доли активированных Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней ( $CD25^+$ ) и поздней активации ( $HLA-DR^+$ , табл. 1). Содержание Т-хелперов 17-го типа превышало верхнюю границу возрастных референсных значений в 1,7 раза (табл. 1).

Таблица 1

**Показатели иммунофенотипирования лимфоцитов  
периферической крови пациента Д.**

Table 1

**Indicators of immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes of the patient D.**

| Субпопуляция        | Фенотип            | Показатель | Референсные значения |
|---------------------|--------------------|------------|----------------------|
| Т-лимфоциты, кл/мкл | $CD3^+CD19^-$      | 6080       | 1610—4230            |
| Т-лимфоциты, %      | $CD3^+CD19^-$      | 70,73      | 62—80 %              |
| Т-хелперы, кл/мкл   | $CD3^+CD4^+CD45^+$ | 1916       | 900—2860             |
| Т-хелперы, %        | $CD3^+CD4^+CD45^+$ | 22,29      | 35—51 %              |

Окончание табл. 1

| Субпопуляция                                    | Фенотип                                                                 | Показатель | Референсные значения |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|------------|----------------------|
| Т-цитотоксические лимфоциты, кл/мкл             | CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup>                     | 3099       | 630—1910             |
| Т-цитотоксические лимфоциты, %                  | CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup>                     | 36,05      | 22—38 %              |
| TNK-клетки                                      | CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup>    | 397        |                      |
| TNK-клетки, %                                   | CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup>    | 4,62       | 0—10 %               |
| Индекс CD4 <sup>+</sup> /CD8                    |                                                                         | 0,62       | 1,0—2,1              |
| NK-клетки, кл/мкл                               | CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup>  | 1368       | 276–896              |
| NK-клетки, %                                    |                                                                         | 15,92      | 7,5—19,5 %           |
| В-лимфоциты, кл/мкл                             | CD19 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup>                                      | 1148       | 700—1300             |
| В-лимфоциты, %                                  | CD19 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup>                                      | 13,35      | 21—28 %              |
| Активированные Т-лимфоциты, кл/мкл              | CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup>                  | 2043       |                      |
| Активированные Т-лимфоциты, %                   | CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup>                  | 23,77      | 3—14 %               |
| Активированные Т-хелперы, кл/мкл                | CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> | 538        | 68—104               |
| Активированные Т-хелперы, % от CD4 <sup>+</sup> | CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> | 28,1       | 4,4—7,8 %            |
| Регуляторные Т-лимфоциты, кл/мкл                | CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> CD45 <sup>+</sup> | 195        | 108—156              |
| Регуляторные Т-лимфоциты, % от CD4 <sup>+</sup> | CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> CD45 <sup>+</sup> | 10,2       | 6,7—11,3 %           |
| Т-хелперы 17, кл/мкл                            | CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> CD161 <sup>+</sup>  | 439        | 144—168              |
| Т-хелперы 17, % от CD4 <sup>+</sup>             | CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> CD161 <sup>+</sup>  | 22,9       | 9,9—13,4 %           |

Активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в основных и малых популяциях лимфоцитов определяли иммуноцитохимическим методом на проточном цитометре CYTOMICS FC500 [19]. Метод основан на увеличении гранулярности клеток (показатель бокового светорассеяния — SSC) после проведения цитохимической реакции для выявления активности фермента в пермеабелизированных и окрашенных моноклональными антителами клетках. Активность сукцинатдегидрогеназы в Т-лимфоцитах находилась в пределах референсных значений (185,8; референсные значения —  $190,6 \pm 3,4$  [181—203]), в В-лимфоцитах была снижена (144,8 при референсном интервале [156—171]), тогда как в NK-клетках отмечалось повышение митохондриальной активности (199,2 при референсном интервале [136—166]), что отражает метаболическую гетерогенность лимфоцитарных популяций.

Оценку количества клеток с транслокацией NF-κB проводили методом проточной цитометрии с визуализацией (Amnis ImageStreamX Mk II, Millipore, США) с применением набора Amnis NF-κB Translocation Kit (Luminex, США). Визуализацию и запись клеток выполняли при 40-кратном увеличении и низкой скорости потока. Анализировали изображения отдельных клеток в хорошем фокусе. Для двойных позитивных клеток — NF-κB<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup> определяли процент клеток с транслокацией NF-κB в популяциях лимфоцитов (% активированных клеток). Оценку активности NF-κB проводили в два этапа: исследовали нативный образец крови и образец с добавлением 4β-форбол-12-миристат-13-ацетата (ФМА) (рабочий раствор концентрацией 0,5 мкг/мл) (Sigma-Aldrich, США). Исследование транслокации NF-κB продемонстрировало повышение доли активированных Т-лимфоцитов и NK-клеток в нативных образцах крови по сравнению с референсными значениями, а также сохраненную способность клеток к дополнительной активации при стимуляции ФМА (рис. 2).

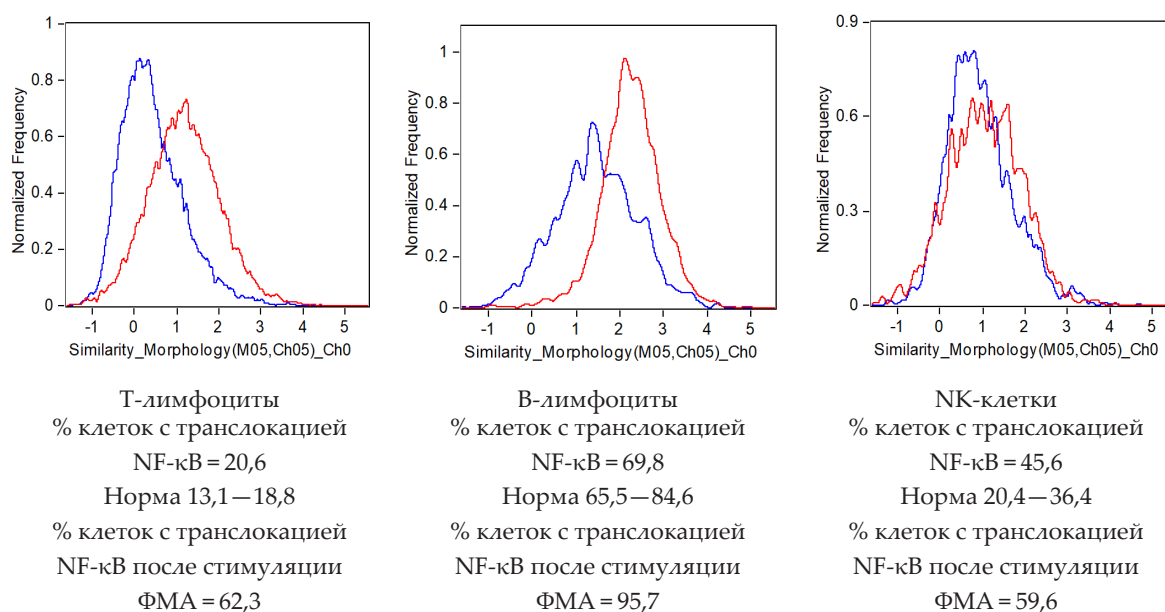


Рис. 2. Доля субпопуляций лимфоцитов с транслокацией NF-κB в ядро до и после стимуляции ФМА

Fig. 2. The proportion of lymphocyte subpopulations with NF-κB translocation into the nucleus before and after FMT stimulation

Специфическое лечение ГБ до настоящего времени не разработано. Основным видом патогенетической терапии является режим питания и диета, направленные на предупреждение и борьбу с гипогликемией, метаболическим ацидозом, кетозом, гиперлипидемией, коррекцию нарушений функционального состояния гепатобилиарной системы и ЖКТ. При условии адекватной диетотерапии возможно минимизировать метаболические нарушения, связанные с течением болезни, а также снизить риск развития отсроченных осложнений. Соотношение основных пищевых веществ в питании больных с различными типами гликогеноза отлично от такового у здоровых детей из-за повышения содержания углеводов и белка и снижения доли животного жира.

На фоне проводимого лечения отмечается отчетливая положительная динамика в виде улучшения состояния кожных покровов, регрессирования пустул в крестцовой области, уменьшения количества фурункулов, в динамике постепенная нормализация воспалительных маркеров (СРБ  $62^{-} > 104^{-} > 44^{-} > 6$  мг/л, СОЭ  $59^{-} > 41^{-} > 5$  мм/ч), повышение уровня гемоглобина (Hb  $99^{-} > 106$  г/л), однако сохраняются лейкопения, нейтропения, в связи с чем проведено несколько введений стимулятора гемопоэза (филграсти-ма) из расчета 5 мг/кг/сут.

## Обсуждение

Представленный клинический случай демонстрирует типичное сочетание метаболических и иммунологических нарушений, характерных для гликогеновой болезни типа Ib с выраженным преобладанием инфекционно-воспалительных проявлений. Наличие тяжелой хронической нейтропении в сочетании с функциональной неполноценностью нейтрофилов определяет высокий риск бактериальных осложнений и рецидивирующих гнойно-воспалительных поражений кожи. Представленный клинический случай демонстрирует, что гликогеновая болезнь типа Ib представляет собой не только метаболическое, но и иммуновоспалительное заболевание с мультиуровневой

дисрегуляцией врожденного и адаптивного иммунитета. Несмотря на традиционное представление о ключевой роли нейтропении, современные данные указывают на более сложные механизмы иммунных нарушений при данной патологии [5; 7].

Выявленные нарушения фагоцитарной активности нейтрофилов согласуются с современными представлениями о патогенезе нейтрофильной дисфункции при ГБ типа Ib, связанной с накоплением 1,5-ангидроглюцит-6-фосфата и нарушением энергетического обмена гранулоцитов [5; 6]. Известно, что при ГБ типа Ib дефект транспортера глюкозо-6-фосфата (G6PT), кодируемого геном SLC37A4, приводит к накоплению 1,5-ангидроглюцит-6-фосфата в нейтрофилах, что вызывает нарушение энергетического метаболизма, усиление апоптоза и снижение функциональной активности клеток [5]. Это объясняет развитие нейтропении и снижение фагоцитарной активности, выявленные у пациента Д. При этом даже на фоне терапии G-CSF возможно сохранение функциональной неполноценности нейтрофилов, включая снижение продукции антимикробных пептидов и нарушение формирования внеклеточных ловушек [6].

Особый интерес представляют изменения в адаптивном иммунном ответе, включая дисбаланс субпопуляций Т-лимфоцитов, повышение доли Th17-клеток и активацию НК-клеток. Подобные изменения могут способствовать формированию хронического воспаления и участвовать в прогрессировании поражения печени [7; 9; 12]. Вместе с тем иммунные нарушения при ГБ типа Ib не ограничиваются врожденным иммунитетом. В представленном наблюдении выявлен выраженный дисбаланс Т-клеточных субпопуляций, включая снижение относительного содержания CD4<sup>+</sup> Т-хелперов и увеличение цитотоксических Т-лимфоцитов, что привело к снижению индекса CD4<sup>+</sup>/CD8. Аналогичные изменения описаны у детей с печеночными формами гликогеновой болезни и рассматриваются как отражение хронической иммунной активации [9; 11; 12]. Особого внимания заслуживает повышение уровня Th17-клеток. Известно, что Th17-ответ играет ключевую роль в поддержании хронического воспаления и ассоциирован с поражением слизистых оболочек, включая развитие воспалительных заболеваний кишечника, характерных для ГБ типа Ib [7; 9]. Выявленный Th17-сдвиг в данном случае может отражать один из ключевых механизмов формирования хронического воспалительного процесса.

Важным наблюдением является изменение метаболической активности лимфоцитов. Нарушения активности сукцинатдегидрогеназы в различных субпопуляциях клеток подтверждают участие метаболических механизмов в регуляции иммунного ответа. Данные результаты согласуются с современными представлениями об иммуно-метаболической регуляции, согласно которым функциональное состояние иммунных клеток тесно связано с их энергетическим обменом [8; 13].

Активация сигнального пути NF-κB у пациента может рассматриваться как ключевое патогенетическое звено, объединяющее метаболические нарушения и иммунную дисрегуляцию. Известно, что NF-κB играет центральную роль в регуляции воспалительного ответа, апоптоза и клеточного метаболизма, а его гиперактивация приводит к усилению синтеза провоспалительных цитокинов и поддержанию хронического воспаления [14; 15].

Дополнительно, в соответствии с данными международных баз редких заболеваний, ГБ типа Ib рассматривается как мультисистемное заболевание с сочетанием метаболических и иммунных нарушений, включая нейтропению, дисфункцию нейтрофилов и склонность к воспалительным заболеваниям кишечника. Согласно базе данных Orphanet, иммунные нарушения являются неотъемлемым компонентом заболевания и во многом определяют клиническое течение и прогноз у пациентов с ГБ типа Ib [20].

## Заключение

Таким образом, представленный клинический случай подтверждает, что при гликогеновой болезни типа Ib формируется сложный патогенетический каскад, включающий метаболические нарушения, дефекты врожденного иммунитета и активацию

адаптивного иммунного ответа. Полученные данные согласуются с современными литературными данными, свидетельствующими о системной иммунной дисрегуляции при данном заболевании.

**Финансирование.** Это исследование не получало внешнего финансирования.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи. Все авторы утвердили окончательную версию рукописи и принимают на себя ответственность за все аспекты работы, подразумевающую надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью или добросовестностью любой части работы.

**Вклад авторов:**

**О. В. Курбатова** — идея статьи, написание, редактирование статьи;

**М. В. Коняшин** — обработка биологического материала пациента, проведение лабораторных исследований;

**А. О. Анушенко** — клиническое описание пациента, лечащий врач;

**Д. Г. Купцова** — обработка биологического материала пациента, проведение лабораторных исследований;

**С. В. Петричук** — обработка биологического материала пациента, проведение лабораторных исследований, редактирование статьи;

**Г. Б. Мовсисян** — клиническое описание пациента, редактирование статьи;

**Т. В. Радыгина** — обработка биологического материала пациента, проведение лабораторных исследований;

**С. С. Акулова** — обработка биологического материала пациента, проведение лабораторных исследований;

**Е. Л. Семикина** — обработка биологического материала пациента, проведение лабораторных исследований;

**А. В. Винокурова** — клиническое описание пациента, редактирование статьи;

**А. С. Потапов** — клиническое описание пациента, редактирование статьи;

**А. П. Фисенко** — редактирование статьи.

**Funding.** This study received no external funding.

**Conflict of Interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article. All authors approved the final version of the manuscript and take responsibility for all aspects of the work, including ensuring that any questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

**Authors' contribution:**

**O. V. Kurbatova** — the idea of the article, writing the article, editing the article;

**M. V. Konyashin** — processing of the patient's biological material, conducting laboratory tests;

**A. O. Anushenko** — clinical description of the patient, attending physician;

**D. G. Kuptsova** — processing of the patient's biological material, conducting laboratory tests;

**S. V. Petrichuk** — processing of the patient's biological material, conducting laboratory tests, editing the article;

**G. B. Movsisyan** — clinical description of the patient, editing of the article;

**T. V. Radygina** — processing of the patient's biological material, conducting laboratory tests;

**S. S. Akulova** — processing of the patient's biological material, conducting laboratory tests;

**E. L. Semikina** — processing of the patient's biological material, conducting laboratory tests;

**A. V. Vinokurova** — clinical description of the patient, editing of the article;

**A. S. Potapov** — clinical description of the patient, editing of the article;

**A. P. Fisenko** — editing the article.

## Список литературы

1. Vergano S. A. S. Inborn Errors of Metabolism: Becoming Ready for Rare. *Pediatr. Rev.* 2022, 43(7), 371—383, DOI: 10.1542/pir.2022-005088.
2. Аверкина Н. А., Багаева М. Э., Баранов А. А., Вашакмадзе Н. Д., Вишнева Е. А., Гундобина О. С., и др. Современные клинические рекомендации по ведению пациентов с гликогеновой болезнью. *Педиатрическая фармакология.* 2024, 21(3), 263—288, DOI: 10.15690/pf.v21i3.2765.
3. Wright T. L. F., Umaña L. A., Ramirez C. M. Update on glycogen storage disease: primary hepatic involvement. *Curr. Opin. Pediatr.* 2022, 34(5), 496—502, DOI: 10.1097/MOP.0000000000001158.
4. Massese M., Tagliaferri F., Dionisi-Vici C., Maiorana A. Glycogen storage diseases with liver involvement: a literature review of GSD type 0, IV, VI, IX and XI. *Orphanet. J. Rare Dis.* 2022, 17(1), 241, DOI: 10.1186/s13023-022-02387-6.
5. Grünert S. C., Gautschi M., Baker J., Boyer M., Burlina A., Casswall T., et al. Empagliflozin for treating neutropenia and neutrophil dysfunction in 21 infants with glycogen storage disease 1b. *Mol. Genet. Metab.* 2024, 142(2), 108486, DOI: 10.1016/j.ymgme.2024.108486.
6. Kaczor M., Malicki S., Folkert J., Dobosz E., Bryzek D., Chruscicka-Smaga B., et al. Neutrophil functions in patients with neutropenia due to glycogen storage disease type 1b treated with empagliflozin. *Blood Adv.* 2024, 8(11), 2790—2802, DOI: 10.1182/bloodadvances.2023012403.
7. Gehlhaar A., Shouval D., Santiago E. G., Ling G., McCourt B., Werner L., et al. Immune dysregulation in Glycogen Storage Disease 1b — a CyTOF approach. *Res. Sq. [Preprint].* 2023, 23, rs.3.rs-2598829, DOI: 10.21203/rs.3.rs-2598829/v1.
8. Курбатова О. В., Сурков А. Н., Самохина И. В., Закиров Р. Ш., Никитин А. В., Фрейдлин Е. В., и др. Возрастная динамика показателей иммунного статуса и активности сукцинатдегидрогеназы в популяциях лимфоцитов у детей с печеночными формами гликогеновой болезни. *Медицинский алфавит.* 2017, 1(6), 42—49.
9. Курбатова О. В., Петричук С. В., Мовсисян Г. Б., Купцова Д. Г., Радыгина Т. В., Анушенко А. О., и др. Роль малых популяций лимфоцитов при формировании фиброза печени у детей с гликогеновой болезнью. *Российский иммунологический журнал.* 2023, 26(3), 337—344, DOI: 10.46235/1028-7221-10013-ROM.
10. Gehlhaar A., Shouval D. S., Santiago E. G., Ling G., McCourt B., Werner L., et al. Immune dysregulation in glycogen storage disease 1b extends beyond neutropenia. *Hum. Immunol.* 2025, 86(3), 111268, DOI: 10.1016/j.humimm.2025.111268.
11. Курбатова О. В., Сурков А. Н., Закиров Р. Ш., Полякова С. И., Мирошкина Л. В., Самохина И. В., и др. Гуморальный иммунитет у детей с печеночными формами гликогеновой болезни. *Российский иммунологический журнал.* 2015, 9(2-1(18)), 273—275.
12. Курбатова О. В., Мирошкина Л. В., Сурков А. Н., Полякова С. И., Измайлова Т. Д., Семенова Г. Ф., и др. Особенности Т-клеточного звена иммунитета у детей с гликогеновой болезнью. *Российский иммунологический журнал.* 2014, 8(3(17)), 331—334.
13. Курбатова О. В., Измайлова Т. Д., Сурков А. Н., Намазова-Баранова Л. С., Полякова С. И., Мирошкина Л. В., и др. Митохондриальная дисфункция у детей с печеночными формами гликогеновой болезни. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2014, 69(7-8), 78—84, DOI: 10.15690/vramn.v69i7-8.1112.
14. Курбатова О. В., Радыгина Т. В., Купцова Д. Г., Петричук С. В., Мовсисян Г. Б., Потопов А. С., и др. Координация сигнального пути NF-κB и метаболизма лимфоцитов у детей с аутоиммунными заболеваниями. *Российский иммунологический журнал.* 2023, 26(4), 491—500, DOI: 10.46235/1028-7221-13800-COT.
15. Angajala A., Lim S., Phillips J. B., Kim J. H., Yates C., You Z., et al. Diverse Roles of Mitochondria in Immune Responses: Novel Insights Into Immuno-Metabolism. *Front. Immunol.* 2018, 9, 1605, DOI: 10.3389/fimmu.2018.01605.

16. Радыгина Т. В., Курбатова О. В., Купцова Д. Г., Петричук С. В., Фисенко А. П., Мовсисян Г. Б., и др. Метаболизм лимфоцитов и уровень циркулирующих цитокинов у детей с аутоиммунными заболеваниями. Медицинская иммунология. 2024, 26(5), 1017–1024, DOI: 10.15789/1563-0625-LMA-16773.

17. Курбатова О., Закиров Р., Сурков А., Никитин А., Самохина И., Фрейдлин А., и др. Уровень сывороточных цитокинов при различных стадиях фиброза печени у детей с печеночными формами гликогеновой болезни. Клиническая лабораторная диагностика. 2016, 61(9), 537.

18. Курбатова О. В., Петричук С. В., Купцова Д. Г., Радыгина Т. В., Козлова Д. И., Хижа В. В., и др. Уровень циркулирующих цитокинов у детей с хроническими заболеваниями печени при разных стадиях фиброза. Российский иммунологический журнал. 2025, 28(1), 135–144, DOI: 10.46235/1028-7221-16978-LOC.

19. Петричук С. В., Измайлова Т. Д., Радыгина Т. В. Способ измерения митохондриальной активности лимфоцитов. Патент на изобретение RU 2302635 C1, 10.07.2007. Заявка № 2005141145/15 от 28.12.2005.

20. Orphanet. Glycogen storage disease type Ib (ORPHA:364). Available at: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?Lng=EN&Expert=364](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=EN&Expert=364) (accessed 2024).

## Об авторах

**Ольга Владимировна Курбатова**, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Россия.

ORCID: 0000-0002-9213-5281

E-mail: putintseva@mail.ru

**Матвей Валерьевич Коняшин**, врач клинической лабораторной диагностики лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Россия.

ORCID: 0009-0004-3206-8090

E-mail: matele99@mail.ru

**Антон Олегович Анушенко**, врач-гастроэнтеролог, гастроэнтерологическое отделение ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, Россия.

ORCID: 0000-0002-1549-2728

E-mail: anoushenko@gmail.com

**Дарья Геннадьевна Купцова**, кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник, врач-клинической лабораторной диагностики лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Россия.

ORCID: 0000-0001-7771-3314

E-mail: darinka\_83@mail.ru

**Светлана Валентиновна Петричук**, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Россия.

ORCID: 0000-0003-0896-6996

E-mail: Cito@list.ru

**Гоар Борисовна Мовсисян**, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории редких наследственных болезней, врачгастроэнтеролог гастроэнтерологического отделения ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Россия.

ORCID: 0000-0003-2881-4703

E-mail: gongurik@mail.ru

**Татьяна Вячеславовна Радыгина**, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Россия.

ORCID: 0000-0003-4704-6885

E-mail: tvradigina@mail.ru

**Светлана Сергеевна Акулова**, кандидат медицинских наук, заведующая центральной клинико-диагностической лабораторией ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Россия.

ORCID: 0000-0001-5986-475X

E-mail: akulova.ss@nczd.ru

**Елена Леонидовна Семикина**, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии, ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Россия.

ORCID: 0000-0001-8923-4652

E-mail: semikina@nczd.ru

**Анна Валерьевна Винокурова**, кандидат медицинских наук, врач-гастроэнтеролог гастроэнтерологического отделения ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» МЗ РФ, Россия.

ORCID: 0000-0002-3977-0657

E-mail: Vinokurova.av@nczd.ru

**Александр Сергеевич Потапов**, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории научных основ детской гастроэнтерологии и гепатологии, заведующий гастроэнтерологическим отделением ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» МЗ РФ, Россия.

ORCID: 0000-0003-4905-2373

E-mail: potapov@nczd.ru

**Андрей Петрович Фисенко**, доктор медицинских наук, профессор, директор ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, Россия.

ORCID: 0000-0001-8586-7946

E-mail: fisenko@nczd.ru

## The authors

**Olga V. Kurbatova**, PhD (Medicine), Head of the Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Centre for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation, Russia.

ORCID: 0000-0002-9213-5281

E-mail: putintseva@mail.ru

**Matvey V. Konyashin**, Physician, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Centre for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation, Russia.

ORCID: 0009-0004-3206-8090

E-mail: matele99@mail.ru

**Anton O. Anushenko**, Gastroenterologist, Department of Gastroenterology, National Medical Research Centre for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation, Russia.

ORCID: 0000-0002-1549-2728

E-mail: anoushenko@gmail.com

**Daria G. Kuptsova**, PhD (Medicine), Junior Research Fellow, Physician, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Centre for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation, Russia.

ORCID: 0000-0001-7771-3314

E-mail: darinka\_83@mail.ru

**Svetlana V. Petrichuk**, Dr. habil. (Biology), Professor, Chief Research Fellow, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Centre for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation, Russia.

ORCID: 0000-0003-0896-6996

E-mail: Cito@list.ru

**Goar B. Movsisyan**, PhD (Medicine), Leading Research Fellow, Laboratory of Rare Hereditary Diseases; Gastroenterologist, Department of Gastroenterology, National Medical Research Centre for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation, Russia.

ORCID: 0000-0003-2881-4703

E-mail: gongurik@mail.ru

**Tatyana V. Radygina**, PhD (Medicine), Senior Research Fellow, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Centre for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation, Russia.

ORCID: 0000-0003-4704-6885

E-mail: tvradigina@mail.ru

**Svetlana S. Akulova**, PhD (Medicine), Head of the Central Clinical Diagnostic Laboratory, National Medical Research Centre for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation, Russia.

ORCID: 0000-0001-5986-475X

E-mail: akulova.ss@nczd.ru

**Elena L. Semikina**, Dr. habil. (Medicine), Principal Research Fellow, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Centre for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation, Russia.

ORCID: 0000-0001-8923-4652

E-mail: semikina@nczd.ru

**Anna V. Vinokurova**, PhD (Medicine), Gastroenterologist, Department of Gastroenterology, National Medical Research Centre for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation, Russia.

ORCID: 0000-0002-3977-0657

E-mail: Vinokurova.av@nczd.ru

**Alexander S. Potapov**, Dr. habil. (Medicine), Professor, Principal Research Fellow, Laboratory of Scientific Foundations of Pediatric Gastroenterology and Hepatology; Head of the Department of Gastroenterology, National Medical Research Centre for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation, Russia.

ORCID: 0000-0003-4905-2373

E-mail: potapov@nczd.ru

**Andrey P. Fisenko**, Dr. habil. (Medicine), Professor, Director, National Medical Research Centre for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation, Russia.

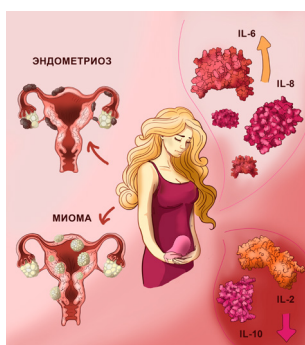
ORCID: 0000-0001-8586-7946

E-mail: fisenko@nczd.ru

Оригинальная исследовательская статья

## ЦИТОКИНОВАЯ ДИСРЕГУЛЯЦИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ ЭНДОМЕТРИОЗА, МИОМЫ МАТКИ И ИХ СОЧЕТАННОЙ ФОРМЫ

Д. А. Мусаходжаева<sup>1\*</sup>, З. Ш. Азизова<sup>1</sup>, Л. М. Исанбаева<sup>2</sup>,  
Л. Э. Ишмуратова<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Институт иммунологии и геномики человека АН РУз,  
100170, Узбекистан, Ташкент

<sup>2</sup> Центр развития профессиональной квалификации  
медицинских работников,  
100007, Узбекистан, Ташкент

\* Автор-корреспондент: [dilym@mail.ru](mailto:dilym@mail.ru)

### Для цитирования:

Мусаходжаева Д. А.,  
Азизова З. Ш., Исанбаева Л. М.,  
Ишмуратова Л. Э. Цитокиновая дисрегуляция в патогенезе эндометриоза, миомы матки и их сочетанной формы. *Современные направления в биомедицине*. 2026;2(1):60—68.  
<https://doi.org/10.5922/ATB-2026-2-1-4>

Поступила  
11.02.2026 г.  
Прошла рецензирование  
20.03.2026 г.  
Принята к печати  
23.03.2026 г.  
Опубликована  
09.09.2026 г.

© Мусаходжаева Д. А.,  
Азизова З. Ш., Исанбаева Л. М.,  
Ишмуратова Л. Э., 2026  
© Оформление, БФУ им. И. Канта,  
2026

**Резюме:** Эндометриоз и миома матки относятся к гормонозависимым заболеваниям, патогенез которых тесно связан с хроническим воспалением и нарушением иммунной регуляции.

**Цель** — определить характер изменений сыровоточного цитокинового профиля у женщин с эндометриозом, интрамуральной миомой матки и их сочетанной формой.

**Материалы и методы.** В исследование включены 88 женщин репродуктивного возраста, распределенные на четыре группы. Сыровоточные уровни IL-2, IL-6, IL-8 и IL-10 определяли методом иммуноферментного анализа.

**Результаты.** Установлено, что при эндометриозе и миоме матки наблюдается дисбаланс цитокинов, характеризующийся снижением IL-2 и повышением провоспалительных медиаторов. Наиболее выраженные изменения выявлены при сочетанной патологии, где отмечено максимальное повышение IL-6 и IL-8 на фоне значительного снижения IL-2 и IL-10.

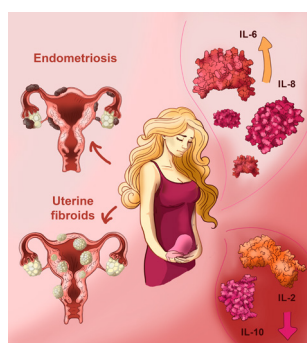
**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о ведущей роли иммуновоспалительной дисрегуляции в патогенезе данных заболеваний и подчеркивают клинко-патогенетическую значимость оценки цитокинового профиля.

**Ключевые слова:** цитокины, коморбидность, ангиогенез, дисрегуляция, эндометриоз, миома матки

Original research article

## CYTOKINE DYSREGULATION IN THE PATHOGENESIS OF ENDOMETRIOSIS, UTERINE FIBROIDS AND THEIR COMBINED FORMS

D. A. Musakhodjaeva<sup>1\*</sup>, Z. Sh. Azizova<sup>1</sup>, L. M. Isanbaeva<sup>2</sup>,  
L. E. Ishmuratova<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Institute of Human Immunology and Genomics of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, 100170, Tashkent, Uzbekistan

<sup>2</sup> Centre for the Development of Professional Qualifications of Medical Workers of the Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan, 100007, Tashkent, Uzbekistan

\* Correspondence: dilym@mail.ru

### To cite this article:

Musakhodjaeva D. A., Azizova Z. Sh., Isanbaeva L. M., Ishmuratova L. E. Cytokine dysregulation in the pathogenesis of endometriosis, uterine fibroids and their combined forms. *Advanced targets in Biomedicine*. 2026;2(1):60–68. <https://doi.org/10.5922/ATB-2026-2-1-4>

### Received

11.02.2026

### Revised

20.03.2026

### Accepted

23.03.2026

### Published

09.09.2026

© Musakhodjaeva D. A., Azizova Z. Sh., Isanbaeva L. M., Ishmuratova L. E., 2026  
© Design, IKBFU, 2026

**Abstract:** Endometriosis and uterine fibroids are hormone-dependent gynecological disorders whose pathogenesis is closely associated with chronic inflammation and impaired immune regulation.

**Aim** — to determine the pattern of changes in the serum cytokine profile in women with endometriosis, intramural uterine fibroids, and their combination.

**Materials and methods.** The study included 88 women of reproductive age divided into four groups. Serum levels of IL-2, IL-6, IL-8, and IL-10 were measured using enzyme-linked immunosorbent assay.

**Results.** A cytokine imbalance was identified in patients with endometriosis and uterine fibroids, characterized by decreased IL-2 levels and increased pro-inflammatory mediators. The most pronounced alterations were observed in the combined pathology, with maximal elevations of IL-6 and IL-8 accompanied by a marked reduction in IL-2 and IL-10.

**Conclusion.** The findings indicate a leading role of immunoinflammatory dysregulation in the pathogenesis of these conditions and highlight the clinical and pathogenetic relevance of assessing the serum cytokine profile.

**Keywords:** cytokines, comorbidity, angiogenesis, dysregulation, endometriosis, uterine fibroids

## Введение

Эндометриоз и миома матки относятся к наиболее распространенным гормонозависимым заболеваниям, сопровождающимся хронической тазовой болью, нарушениями менструальной функции и снижением фертильности. По данным ВОЗ, эндометриоз встречается примерно у 10 % женщин репродуктивного возраста, а диагностическая задержка способствует хронизации воспаления и формированию репродуктивных потерь [1]. Клинические рекомендации рассматривают эндометриоз как системное воспалительное состояние с вовлечением иммунных и сосудисто-ремоделирующих механизмов, что обосновывает поиск сывороточных биомаркеров [2].

Миома матки, несмотря на доброкачественный характер, часто приводит к аномальным маточным кровотечениям, анемии и неблагоприятным репродуктивным исходам. Показано, что рост и симптомность узлов поддерживаются не только гормональными влияниями, но и иммуновоспалительной средой с участием цитокинов, хемокинов и факторов ремоделирования внеклеточного матрикса [2; 3].

Клинически значима сочетанная форма эндометриоза и миомы матки, для которой описана эпидемиологическая ассоциация и возможная общность патогенетических механизмов: хронического воспаления, ангиогенеза и тканевого ремоделирования [4; 5]. Коморбидность чаще сопровождается более выраженными симптомами и репродуктивными нарушениями, что усиливает потребность в биомаркерах, отражающих активность воспалительного каскада и позволяющих осуществлять стратификацию пациенток.

В патогенезе как эндометриоза, так и миомы матки ключевую роль играет цитокиновая регуляция, определяющая баланс провоспалительных и противовоспалительных сигналов, клеточную миграцию, ангиогенез и фиброзирование. В крупных работах по циркулирующим воспалительным биомаркерам при эндометриозе показано, что измеряемые в крови цитокины и хемокины ассоциируются с клиническими характеристиками заболевания и фенотипом поражения, однако результаты неоднородны и зависят от дизайна, критериев включения и структуры выборок [6]. Метааналитические данные также поддерживают повышение отдельных сывороточных интерлейкинов при эндометриозе, но подчеркивают необходимость унифицированных протоколов и сопоставимых клинических групп [7]. Параллельно для миомы матки демонстрируется участие цитокинов в формировании воспалительно-ангиогенной среды и нарушении рецептивности эндометрия, что делает системную оценку цитокинового профиля патогенетически обоснованной [3].

Таким образом, исследование сывороточного цитокинового профиля при эндометриозе, миоме матки и их сочетанной форме сохраняет высокую актуальность. Оно позволяет более точно соотнести выраженность иммуновоспалительной дисрегуляции с клиническими фенотипами заболевания, выделить показатели, которые могут быть использованы для стратификации пациенток по активности процесса и риску неблагоприятных репродуктивных исходов, а также обосновать выбор направлений персонализированной противовоспалительной и антиангиогенной коррекции в составе комплексного ведения гормонозависимой гинекологической патологии.

## Цель исследования

Определить характер и направленность изменений сывороточных уровней интерлейкинов у женщин с эндометриозом, интрамуральной миомой матки и сочетанной патологией по сравнению с контролем.

## Материалы и методы

В исследование были включены 88 женщин репродуктивного возраста от 20 до 38 лет, распределенные на четыре группы: 20 пациенток с эндометриозом, 18 пациенток с интрамуральной миомой матки, 22 женщины с сочетанной формой па-

тологии (эндометриоз в сочетании с миомой матки), а также контрольная группа, состоящая из 28 женщин без гинекологических заболеваний, сопоставимых по возрасту.

У пациенток с эндометриозом заболевание соответствовало I–II степени тяжести согласно классификации rAFS/ASRM [2], что было подтверждено клинко-инструментальными методами. В группу женщин с миомой матки включались пациентки с интрамуральной формой миомы, которая была наиболее распространенным морфологическим вариантом. В группе сочетанной патологии диагностировалось одновременное наличие эндометриоза I–II степени и интрамуральной миомы.

Материал для исследования был собран на базе клиники «Premium Medline» (г. Карши, Кашкадарьинская область, Узбекистан), где пациентки проходили комплексное клинко-инструментальное обследование с последующим лабораторным исследованием. Исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом (№ 48 от 10.2025 г); до включения в исследование у всех участниц получено письменное информированное согласие.

Диагноз эндометриоза устанавливался по клиническим проявлениям (хроническая тазовая боль, дисменорея, диспареуния, менструальные нарушения), данным гинекологического осмотра, трансвагинального УЗИ, а в отдельных случаях — лапароскопии с гистологическим подтверждением. Диагноз миомы матки основывался на клинике (аномальные маточные кровотечения, симптомы сдавления), результатах осмотра и УЗИ органов малого таза с определением количества, локализации и размеров узлов. Сочетанная форма диагностировалась при одновременном выявлении признаков эндометриоза и миомы.

В исследование включались женщины репродуктивного возраста с установленным диагнозом эндометриоза, миомы или их сочетанной формы при отсутствии гормональной терапии и применения иммуностропных препаратов за 3 месяца до включения; обязательным условием было письменное информированное согласие.

Критериями исключения служили беременность и лактация, злокачественные новообразования, острые воспалительные процессы органов малого таза, тяжелые хронические аутоиммунные и эндокринные заболевания в стадии декомпенсации (сахарный диабет, аутоиммунный тиреоидит), а также прием гормональных контрацептивов или иммуномодуляторов менее чем за 3 месяца до исследования.

Иммунологические исследования проводились в лаборатории Иммунологии репродукции Института иммунологии и геномики человека АН РУз.

Образцы крови брались после установления первичного диагноза. Кровь собиралась утром натощак, сыворотка отделялась центрифугированием и замораживалась при  $-20^{\circ}\text{C}$  до анализа.

Определение сывороточного уровня про- (IL-2, IL-6, IL-8) и противовоспалительных (IL-10) цитокинов проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-систем АО «ВЕКТОР-БЕСТ» (Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Количественную оценку результатов проводили методом построения калибровочной кривой, отражающей зависимость оптической плотности от концентрации для стандартного антигена, что позволяло сравнивать исследуемые образцы.

Статистическую обработку данных выполняли в программе Statistica 6.0. Распределение количественных показателей в каждой группе проверяли критерием Шапиро — Уилка. При нормальном распределении результаты представляли как  $\text{Mean} \pm \text{SD}$ . Сравнение показателей проводили между четырьмя независимыми группами методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующими множественными попарными сравнениями по тесту Тьюки; при необходимости применяли поправку Бонферрони для контроля ошибки множественных сравнений. Во всех случаях использовали двусторонние критерии, статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Проведенное исследование позволило проанализировать особенности сывороточного цитокинового профиля у женщин с эндометриозом, миомой матки и их сочетанной формой по сравнению с контрольной группой. Полученные данные отражают характер дисрегуляции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, что дает возможность оценить их роль в патогенезе указанных заболеваний.

Результаты сывороточного содержания изученных медиаторов иммунного ответа представлены в таблице.

### Уровень сывороточных про- и противовоспалительных цитокинов в группах обследованных женщин (Mean $\pm$ SD)

#### Serum levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in the groups of examined women (Mean $\pm$ SD)

| Показатель,<br>пг/мл | Контроль<br>(n = 28) | 1 группа<br>(n = 20) | 2 группа<br>(n = 18) | 3 группа<br>(n = 22) |
|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| IL-2                 | 12,12 $\pm$ 0,45     | 6,94 $\pm$ 0,49*     | 8,96 $\pm$ 0,32*     | 4,93 $\pm$ 0,27*     |
| IL-6                 | 7,45 $\pm$ 0,51      | 19,05 $\pm$ 1,10*    | 11,77 $\pm$ 0,47*    | 21,31 $\pm$ 1,17*    |
| IL-8                 | 20,46 $\pm$ 0,86     | 44,39 $\pm$ 2,26*    | 24,94 $\pm$ 1,78*    | 52,67 $\pm$ 1,93*    |
| IL-10                | 5,83 $\pm$ 0,36      | 4,13 $\pm$ 0,29*     | 5,14 $\pm$ 0,28^     | 2,45 $\pm$ 0,19*     |

Примечание: \* — различия достоверны по сравнению с контрольной группой; ^ — разница статистически недостоверна.

Note: \* — differences are significant compared to the control group; ^ — the difference is statistically insignificant.

Интерлейкин-2 (IL-2) является ключевым цитокином, продуцируемым Т-хелперами, который регулирует пролиферацию Т-клеток, поддерживает активность НК-клеток и играет важную роль в развитии адаптивного иммунного ответа [8; 9].

В 1-й группе женщин с эндометриозом уровень IL-2 был достоверно снижен по сравнению с контрольной группой и составил 6,94  $\pm$  0,49 пг/мл против 12,12  $\pm$  0,45 пг/мл в контроле ( $p < 0,001$ ), что указывает на выраженное угнетение Т-клеточной регуляции. Во 2-й группе пациенток с миомой матки также отмечалось статистически значимое снижение концентрации IL-2 до 8,96  $\pm$  0,32 пг/мл по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ ), однако степень снижения была менее выраженной, чем при эндометриозе. В 3-й группе при сочетании эндометриоза и миомы матки выявлены минимальные значения IL-2 — 4,93  $\pm$  0,27 пг/мл, что достоверно ниже контрольного уровня ( $p < 0,001$ ) и отражает наиболее выраженное нарушение Т-клеточного звена иммунного ответа.

Интерлейкин-6 (IL-6) относится к провоспалительным цитокинам и является одним из ключевых медиаторов системного воспаления; он участвует в индукции острой фазы воспалительного ответа, активации В-лимфоцитов и формировании патологического ангиогенеза [10; 11].

В 1-й группе уровень IL-6 был существенно повышен по сравнению с контрольной группой и составил 19,05  $\pm$  1,10 пг/мл против 7,45  $\pm$  0,51 пг/мл ( $p < 0,001$ ), что свидетельствует об активации системного провоспалительного ответа при эндометриозе. Во 2-й группе женщин с миомой матки концентрация IL-6 также была достоверно выше контрольных значений и достигала 11,77  $\pm$  0,47 пг/мл ( $p < 0,001$ ), однако повышение носило менее выраженный характер по сравнению с 1-й группой. В 3-й группе при сочетанной патологии уровень IL-6 достигал максимальных значений — 21,31  $\pm$  1,17 пг/мл, что достоверно превышало показатели контрольной группы ( $p < 0,001$ ) и отражало усиление хронического воспаления при коморбидном течении заболевания.

Интерлейкин-8 (IL-8) является хемоаттрактантом нейтрофилов, активно участвует в ангиогенезе и тканевом ремоделировании, а также считается важным фактором патогенеза эндометриоза и миомы [12].

В 1-й группе женщин с эндометриозом концентрация IL-8 была достоверно повышена по сравнению с контролем и составила  $44,39 \pm 2,26$  пг/мл против  $20,46 \pm 0,86$  пг/мл ( $p < 0,001$ ), что указывает на активацию хемотаксических и ангиогенных механизмов. Во 2-й группе при миоме матки уровень IL-8 также превышал контрольные значения и достигал  $24,94 \pm 1,78$  пг/мл ( $p < 0,001$ ), однако степень повышения была умеренной по сравнению с эндометриозом. В 3-й группе отмечено наиболее выраженное увеличение IL-8 до  $52,67 \pm 1,93$  пг/мл, что достоверно выше контрольного уровня ( $p < 0,001$ ) и отражает усиление ангиогенеза и воспалительного рекрутирования при сочетанной патологии.

Интерлейкин-10 (IL-10) является ключевым противовоспалительным цитокином, регулирующим продукцию провоспалительных медиаторов и предотвращающим избыточную активацию иммунной системы [13; 14].

В 1-й группе концентрация противовоспалительного цитокина IL-10 была достоверно снижена по сравнению с контрольной группой и составила  $4,13 \pm 0,29$  пг/мл против  $5,83 \pm 0,36$  пг/мл ( $p < 0,001$ ), что указывает на ослабление противовоспалительных механизмов. Во 2-й группе женщин с миомой матки уровень IL-10 составил  $5,14 \pm 0,28$  пг/мл и не отличался от контрольных значений статистически значимо, что свидетельствует об относительной сохранности противовоспалительной регуляции. В 3-й группе при сочетании эндометриоза и миомы матки выявлено выраженное снижение IL-10 до  $2,45 \pm 0,19$  пг/мл по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ ), отражающее глубокое истощение противовоспалительно-регуляторного звена иммунного ответа.

Таким образом, анализ сывороточного цитокинового профиля выявил разнонаправленные изменения, где отмечено снижение IL-2 и IL-10 при одновременном росте IL-6 и IL-8, особенно выраженные при сочетанной форме эндометриоза и миомы. Вероятно, такое соотношение отражает глубокий дисбаланс между провоспалительными и противовоспалительными звеньями иммунного ответа. Можно предположить, что именно эта цитокиновая дисрегуляция способствует прогрессированию заболевания, хронизации воспалительного процесса, усилению ангиогенеза и формированию более тяжелого клинического течения сочетанной гинекологической патологии.

## Заключение

Проведенное исследование позволило выявить характерные особенности сывороточного цитокинового профиля у женщин с эндометриозом, миомой матки и их сочетанной формой. У женщин с эндометриозом, интрамуральной миомой матки и их сочетанием выявлены различия сывороточного цитокинового профиля по сравнению с контролем. Для всех клинических групп характерны снижение IL-2 и повышение IL-6 и IL-8, при этом снижение IL-10 отмечалось при эндометриозе и сочетанной патологии, тогда как при изолированной миоме его уровень существенно не отличался от контроля. Наиболее выраженный дисбаланс зарегистрирован при сочетании эндометриоза и миомы, что отражает максимальную провоспалительную активацию при относительном дефиците противовоспалительной регуляции. Полученные данные подтверждают значимость системной цитокиновой дисрегуляции в патогенезе указанных заболеваний и обосновывают использование оценки цитокинового профиля для стратификации пациенток и дальнейших исследований прогностических маркеров.

## Выводы

1. Установлено, что при эндометриозе характерно снижение IL-2 и IL-10 при одновременном повышении IL-6 и IL-8 по сравнению с контролем (для всех указанных различий  $p < 0,001$ ).

2. Выявлено, что интрамуральная миома матки сопровождается снижением IL-2 и повышением IL-6 и IL-8 относительно контроля ( $p < 0,001$ ), тогда как уровень IL-10 статистически значимо не отличается от контроля ( $p > 0,05$ ).

3. Определено, что при сочетанной форме наблюдается максимальная выраженность цитокинового дисбаланса, где наиболее низкие значения установлены в уровнях IL-2 и IL-10 на фоне наиболее высоких концентраций IL-6 и IL-8 по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ ).

4. Следовательно, совокупный профиль изменений при всех формах патологии указывает на преобладание провоспалительной активации (рост IL-6 и IL-8) на фоне дефицита регуляторно-Т-клеточного звена и противовоспалительной активности (снижение IL-2 и/или IL-10), при этом коморбидное течение ассоциировано с наибольшей степенью дисрегуляции.

**Финансирование.** Это исследование не получало внешнего финансирования.

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи. Все соавторы одобрили окончательную версию рукописи и принимают ответственность за все аспекты работы, включая корректное изучение и урегулирование вопросов, относящихся к точности и добросовестности представленных данных.

#### **Вклад авторов:**

**Д. А. Мусаходжаева** — разработка концепции и дизайна научной работы, составление текста рукописи и критический пересмотр рукописи;

**З. Ш. Азизова** — проведение исследования, статистический анализ;

**Л. М. Исанбаева** — анализ и интерпретация данных, статистический анализ;

**Л. Э. Ишмуратова** — сбор данных, проведение обследования, статистический анализ.

**Funding.** This study received no external funding.

**Conflict of Interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article. All authors approved the final version of the manuscript and take responsibility for all aspects of the work, including ensuring that any questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

#### **Authors' contribution:**

**D. A. Musakhodzhaeva** — development of the concept and design of the research paper, drafting the manuscript, and critical revision of the manuscript;

**Z. Sh. Azizova** — study implementation, statistical analysis;

**L. M. Isanbaeva** — data analysis and interpretation, statistical analysis;

**L. E. Ishmuratova** — data collection, survey implementation, statistical analysis.

## **Список литературы**

1. World Health Organization Endometriosis [Электронный ресурс], 2025, URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/endometriosis> (дата обращения: 20.01.2026).

2. Becker C. M., Bokor A., Heikinheimo O., Horne A., Jansen F., Kiesel L., et al. ESHRE guideline: endometriosis. Human Reproduction Open, 2022, 2, hoac009, DOI: 10.1093/hropen/hoac009.

3. Ishikawa H., Goto Y., Hirooka C., Katayama E., Baba N., Kaneko M., et al. Role of inflammation and immune response in the pathogenesis of uterine fibroids: Including their negative impact on reproductive outcomes. Journal of Reproductive Immunology. 2024. 165, 104317, DOI: 10.1016/j.jri.2024.104317.

4. Uimari, O., Nazri H., Tapmeier T. Endometriosis and uterine fibroids (leiomyomata): Comorbidity, Risks and Implications. Frontiers in Reproductive Health. 2021, 3, 750018, DOI: 10.3389/frph.2021.750018.

5. Fiore A., Casalechi M., Sichenze L., Ferraro C., Magnia B., Bellinghieri R., et al. Co-occurrence of endometriosis and uterine fibroids: A systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine*. 2025. 89, 103510, DOI: 10.1016/j.eclinm.2025.103510.
6. Terry K. L., Shafir A., Laliberte A., Vitonis A. F., Garbutt K., DePari M., et al. Circulating inflammatory biomarkers and endometriosis lesion characteristics in the WisE consortium. *NPJ Women's Health*. 2025, 3(1), 62, DOI: 10.1038/s44294-025-00110-x.
7. Werdel R., Mabie A., Evans T. L., Coté R. D., Schlundt A., Doehrman P., et al. Serum levels of interleukins in endometriosis patients: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Minimally Invasive Gynecology*. 2024, 31(5), 387–396.e11, DOI: 10.1016/j.jmig.2024.02.011.
8. Boyman O., Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature Reviews Immunology*. 2012, 12(3), 180–190, DOI: 10.1038/nri3156.
9. Spolski R., Li P., Leonard W. J. Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy. *Nature Reviews Immunology*. 2018, 18(10), 648–659, DOI: 10.1038/s41577-018-0046-y.
10. Hunter C. A., Jones S. A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature Immunology*. 2015, 16(5), 448–457, DOI: 10.1038/ni.3153.
11. Tanaka T., Narazaki M., Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2014, 6(10), a016295, DOI: 10.1101/cshperspect. a016295.
12. Коненков В. И., Шевченко А. В., Прокофьев В. Ф., Королева Е. Г., Тимофеева Ю. С., Айдагулова С. В., и др. Системные факторы регуляции ангиогенеза при множественной миоме матки. *Медицинская иммунология*. 2025, 27(1), 57–68, DOI: 10.15789/1563-0625-SFR-2978.
13. Couper K. N., Blount D. G., Riley E. M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *Journal of Immunology*. 2008, 180(9), 5771–5777, DOI: 10.4049/jimmunol.180.9.5771.
14. Iyer S. S., Cheng G. Role of interleukin-10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Critical Reviews in Immunology*. 2012, 32(1), 23–63, DOI: 10.1615/critrevimmunol. v32.i1.30.

## Об авторах

**Дилорам Абдуллаевна Мусаходжаева**, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией Иммунология репродукции Института иммунологии и геномики человека АН РУз, Узбекистан.

ORCID: 0000-0001-7330-752X

E-mail: dilym@mail.ru

**Зухра Шухратовна Азизова**, PhD (доктор философии по биологическим наукам), старший научный сотрудник лаборатории Иммунология репродукции Института иммунологии и геномики человека АН РУз, Узбекистан.

ORCID: 0009-0009-8723-3002

E-mail: zukhraazizova1981@gmail.com, zuhra\_0203@list.ru

**Ландыш Мухамедовна Исанбаева**, доктор медицинских наук (DSc), доцент кафедры акушерства и гинекологии и перинатологии Центра развития профессиональной квалификации медицинских работников МЗ РУз, Узбекистан.

ORCID: 0009-0004-1375-2882

E-mail: badyu@mail.ru

**Лобар Эргашевна Ишмуратова**, свободный соискатель Института иммунологии и геномики человека АН РУз, Узбекистан.

ORCID: 0009-0006-1083-9960

E-mail: lobar.ishmuratova@bk.ru

## The authors

**Diloram A. Musakhodjaeva**, Dr. habil. (Biology), Professor, Head of the Laboratory of Immunology of Reproduction, the Institute of Human Immunology and Genomics, the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Uzbekistan.

ORCID: 0000-0001-7330-752X

E-mail: dilym@mail.ru

**Zukhra S. Azizova**, Dr. habil. (Biology), Senior Research Fellow, the Laboratory of Immunology of Reproduction, the Institute of Human Immunology and Genomics, the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Uzbekistan.

ORCID: 0009-0009-8723-3002

E-mail: zukhraazizova1981@gmail.com, zuhra\_0203@list.ru

**Landysh M. Isanbaeva**, Dr. habil. (Medicine), Associate Professor, the Department of Obstetrics and Gynecology and Perinatology, the Centre for the Development of Professional Qualifications of Medical Workers of the Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan, Uzbekistan.

ORCID: 0009-0004-1375-2882

E-mail: badyu@mail.ru

**Lobar E. Ishmuratova**, Researcher, the Institute of Human Immunology and Genomics of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Uzbekistan.

ORCID: 0009-0006-1083-9960

E-mail: lobar.ishmuratova@bk.ru

Обзор

СОВРЕМЕННЫЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ  
К ПОИСКУ БИОМАРКЕРОВ ЭФФЕКТИВНОСТИ  
И БЕЗОПАСНОСТИ ИММУНОТЕРАПИИ В ОНКОЛОГИИ

И. В. Кравцов, А. С. Сюткина, Т. Л. Нехаева\*

НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова,  
197758, Россия, Санкт-Петербург

\* Автор-корреспондент: nehaevat151274@mail.ru

**Резюме:** Иммуноterapia является мощной клинической стратегией лечения злокачественных новообразований. Количество одобренных иммуноонкологических препаратов неуклонно растет, а множество новых методов лечения находятся на стадии клинических и доклинических испытаний. Несмотря на успехи, ключевой проблемой для широкого внедрения иммунотерапии остается сложность контролируемой активации иммунной системы. Существующие подходы могут вызывать серьезные побочные эффекты, включая аутоиммунные реакции и неспецифическое воспаление. В связи с этим понимание механизмов, позволяющих увеличить долю пациентов, позитивно отвечающих на терапию, является решающим фактором как для повышения эффективности лечения, так и для контроля нежелательных явлений.

Цель настоящего обзора — анализ и обобщение данных о прогностической и предиктивной значимости биомаркеров, ассоциированных с эффективностью и безопасностью иммунотерапии солидных злокачественных новообразований. В работе рассмотрены молекулярно-генетические изменения (включая циркулирующую опухолевую ДНК), раково-тестикулярные антигены, антигены главного комплекса гистосовместимости, белок PD-1 и его лиганды, а также третичные лимфоидные структуры. Отдельное внимание уделено показателям системного и локального иммунного ответа. Показано, что клеточный состав микроокружения опухоли и периферической крови тесно связан с прогнозом заболевания, а уровни цитокинов и растворимых иммунных факторов могут предсказывать эффективность иммунотерапии и вероятность развития побочных эффектов. В статье также рассмотрены реакция гиперчувствительности замедленного типа и современные методы обнаружения биомаркеров, используемые для оценки специфического противоопухолевого иммунного ответа.

Авторы отмечают, что наиболее перспективным направлением является одновременный анализ нескольких видов биомаркеров с применением современных вычислительных методов. Это позволит повысить эффективность и безопасность иммунотерапии и приблизит переход к персонализированному лечению пациентов.

**Ключевые слова:** иммунотерапия, солидные злокачественные новообразования, биомаркеры злокачественных новообразований, HLA-антигены, цитокиновый профиль, раково-тестикулярные антигены, иммунный ответ

## Для цитирования:

Кравцов И. В., Сюткина А. С.,  
Нехаева Т. Л. Современные имму-  
нологические подходы к поиску  
биомаркеров эффективности и  
безопасности иммунотерапии в  
онкологии. *Современные направления  
в биомедицине*. 2026;2(1):69—88.  
<https://doi.org/10.5922/ATB-2026-2-1-5>

Поступила  
26.05.2026 г.  
Прошла рецензирование  
01.07.2026 г.  
Принята к печати  
03.07.2026 г.  
Опубликована  
09.09.2026 г.

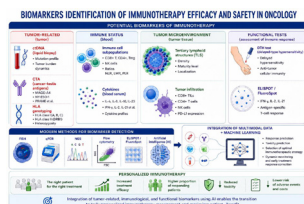
© Кравцов И. В., Сюткина А. С.,  
Нехаева Т. Л., 2026  
© Оформление, БФУ им. И. Канта,  
2026



Review

## MODERN IMMUNOLOGICAL APPROACHES TO THE SEARCH FOR BIOMARKERS PREDICTING EFFICACY AND SAFETY OF CANCER IMMUNOTHERAPY

V. Kravtsov, A. S. Syutkina, T. L. Nekhaeva\*



N. N. Petrov'National Medical Cancer Research Center, 197758,  
Saint-Petersburg, Russia

\* Correspondence: nehaevat151274@mail.ru

### To cite this article:

Kravtsov I. V., Syutkina A. S.,  
Nekhaeva T. L. Modern  
Immunological Approaches to the  
Search for Biomarkers Predicting  
Efficacy and Safety of Cancer  
Immunotherapy. *Advanced targets in  
Biomedicine*. 2026;2(1):69—88.  
<https://doi.org/10.5922/ATB-2026-2-1-5>

### Received

26.05.2026

### Revised

01.07.2026

### Accepted

03.07.2026

### Published

09.09.2026

© Kravtsov I. V., Syutkina A. S.,  
Nekhaeva T. L., 2026  
© Design, IKBFU, 2026

Immunotherapy is a powerful clinical strategy for the treatment of malignant tumours. The number of approved immuno-oncology drugs is growing, and many new therapeutic approaches are currently at the stages of clinical and preclinical trials. Despite these advances, a key challenge for the widespread use of immunotherapy remains the difficulty of controlled activation of the immune system. Existing approaches may cause serious side effects, including autoimmune reactions and nonspecific inflammation. In this regard, understanding the mechanisms that can increase the proportion of patients who respond to the therapy is a crucial factor both for improving treatment efficacy and for controlling its side effects.

The aim of this research is to examine and summarize data on the prognostic and predictive significance of biomarkers associated with the efficacy and safety of immunotherapy in malignant tumours. The study examines molecular genetic alterations (including circulating tumour DNA), cancer-testis antigens, the PD-1 protein and its ligands, as well as tertiary lymphoid structures. Special attention is given to biomarkers of systemic and local responses. It has been shown that the cellular composition of the tumour microenvironment and peripheral blood is associated with disease prognosis, while levels of cytokines and soluble immune factors may predict the effectiveness of immunotherapy and the likelihood of side effects. The article also discusses delayed-type hypersensitivity reactions and modern methods for detecting biomarkers, which are used to evaluate the specific anti-tumor immune response.

The authors conclude that the most promising direction is the simultaneous analysis of multiple types of biomarkers using modern computational methods. This approach may improve the effectiveness and safety of immunotherapy and facilitate a transition to personalized treatment.

**Keywords:** immunotherapy, solid malignant tumours, cancer biomarkers, HLA antigens, cytokine profile, cancer-testis antigens, immune response

## Введение

Иммунотерапия зарекомендовала себя как одно из ключевых клинических направлений в лечении онкологических заболеваний. Растущее число одобренных иммуноонкологических препаратов и расширение данных о проведенных доклинических и клинических исследованиях подтверждают высокий потенциал данного подхода. Известно, что иммунная система способна распознавать опухоль и генерировать как локальный, так и системный иммунный ответ, направленный на подавление опухолевого роста [1]. Состояние иммунной системы пациента и способность лечения модулировать эффекторное и супрессорное звенья иммунитета во многом определяют прогноз заболевания и успех различных видов противоопухолевой терапии — таргетной, химиотерапии и иммунотерапии [2]. Однако широкое внедрение иммунотерапевтических стратегий сдерживается сложностью контролируемой модуляции иммунного ответа: активация иммунной системы сопряжена с риском серьезных нежелательных явлений, таких как аутоиммунные реакции и системное воспаление. В связи с этим понимание механизмов, позволяющих увеличить долю ответивших на терапию пациентов, является решающим фактором как для повышения эффективности лечения, так и для контроля его токсичности. Одним из подходов к решению этой проблемы выступает активный поиск иммунологических предиктивных и прогностических биомаркеров различных типов опухолей. В работе продемонстрирована прогностическая значимость определенных популяций иммунокомпетентных клеток в опухолевом микроокружении. При этом значение как стабильных, так и динамических иммунологических параметров у пациентов, получающих клеточную иммунотерапию, изучено в значительно меньшей степени [1–3].

Настоящий обзор посвящен анализу современных иммунологических подходов к поиску биомаркеров, ассоциированных с эффективностью и безопасностью иммунотерапии злокачественных новообразований (ЗНО). Рассмотрены биомаркеры, связанные с опухолью, системные и локальные иммунные параметры (клеточный состав, цитокиновый профиль), а также современные методы обнаружения биомаркеров и функциональные тесты, используемые для оценки специфического противоопухолевого ответа. На рисунке представлена схема основных типов биомаркеров эффективности и безопасности иммунотерапии в онкологии. Поиск проведен в базах PubMed, Scopus, Web of Science и eLibrary.ru (2015–2025) по ключевым словам: immunotherapy, solid malignant tumors, biomarkers, PD-1/PD-L1, HLA, cytokine profile, cancer-testis antigens, tumor microenvironment, tertiary lymphoid structures. Включены оригинальные исследования, систематические обзоры и клинические работы на русском или английском языке. Исключены единичные клинические случаи, тезисы и исследования на животных.

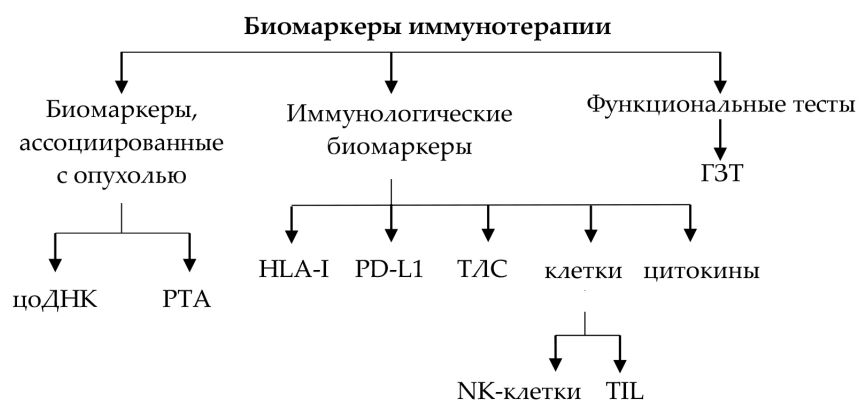


Рис. Схема основных типов биомаркеров эффективности и безопасности иммунотерапии в онкологии

Fig. 1. Schematic overview of the main types of biomarkers associated with the efficacy and safety of immunotherapy in oncology

## 1. Биомаркеры, ассоциированные с опухолью

### 1.1. Молекулярно-генетические маркеры: циркулирующая опухолевая ДНК

Циркулирующая опухолевая ДНК (цоДНК) представляет собой небольшие фрагменты нуклеиновой кислоты (~160 п. н.) и обнаруживается в клетках опухолевой ткани у больных онкологическими заболеваниями. Она составляет лишь небольшую часть (0,1—10 %) свободно циркулирующей в крови нуклеиновой кислоты и образуется в результате гибели опухолевых клеток [4; 5]. Данная ДНК используется в качестве неинвазивного онкоиммунологического биомаркера [6]. Этот биомаркер отражает молекулярный профиль опухоли, поскольку характеризуется генетическими и эпигенетическими изменениями, которые присутствуют только в опухолевых клетках, и может быть обнаружен в таких жидкостях организма, как кровь, моча, кал, слюна, мокрота, конденсат выдыхаемого воздуха [7; 8]. Фрагментам цоДНК присущ малый период полужизни, что позволяет использовать их для мониторинга динамики болезни в реальном времени [9], а применение цифровой ПЦР и NGS дает возможность выявлять редкие мутации, что позволяет использовать цоДНК в качестве биомаркера для раннего обнаружения опухоли [10].

Данный показатель представляет собой важный маркер в ходе оценки эффективности иммунотерапии. Так, изменение его уровня связано с ответом опухоли на лечение и может использоваться в качестве биомаркера, определяющего клинический исход [11]. Снижение концентрации этих фрагментов в ходе терапии связано с увеличением общей выживаемости (ОВ), в то время как повышение концентрации — с прогрессированием заболевания [12]. Это было подтверждено в нескольких исследованиях. Так, было показано, что высокое содержание цоДНК понижает такие показатели, как ОВ и выживаемость без прогрессирования (ВБП) у пациентов с меланомой, проходящих иммунотерапию [7]. В случае изучения немелкоклеточного рака легкого метаанализ 52 исследований продемонстрировал, что обнаружение этого биомаркера связано со снижением безрецидивной выживаемости, где такой показатель, как отношение рисков (ОР), составлял 2,23 [8]. После лечения онкологических больных значение ОР доходило до 4,17, что было связано с ухудшением ОВ [8]. В то же время анализ 53 исследований с участием более 3700 пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой показал риск прогрессирования опухоли при высоком содержании цоДНК, где значение ОР достигало 2,5 [13]. Еще в одном исследовании было обнаружено, что анализ этой нуклеиновой кислоты в крови может выявлять прогрессирование опухоли на 140 дней раньше, чем другие подходы, в частности радиологические методы визуализации ЗНО [14].

Таким образом, цоДНК представляет собой клинически значимый биомаркер с высокой прогностической ценностью.

### 1.2. Раково-тестикулярные антигены

В основе адаптивного противоопухолевого иммунного ответа лежит презентация опухолеассоциированных антигенов — специфических пептидов, образующихся при злокачественной трансформации клеток. Раково-тестикулярные антигены (РТА) представляют собой большое семейство белков, которые экспрессируются не только в яичке и плаценте, но и aberrантно активируются в различных опухолях [15; 16]. Гены, относящиеся к одному подсемейству РТА, как правило, локализуются кластерно в соседних участках хромосом и кодируют белки со сходной доменной организацией и структурными характеристиками.

Прогностическое значение РТА варьируется в зависимости от типа опухоли. Согласно данным недавнего метаанализа, повышенный уровень экспрессии MAGE-A4, NY-ESO-1 и LAGE-1 при раке желудка связан с плохим прогнозом (ОР 1,5—2,5) [17]. Высокая экспрессия NY-ESO-1 ассоциирована со снижением общей выживаемости

(OR = 2,15; 95 % ДИ 1,42—3,27;  $p = 0,0003$ ) [18]. Одновременная экспрессия нескольких РТА также коррелирует со снижением ВБП: OR = 1,89 (95 % ДИ 1,28—2,79;  $p = 0,001$ ) [18]. Данные обзорных исследований подтверждают, что прогностическое значение РТА зависит от гистологического типа сарком, что объясняется различной частотой экспрессии этих антигенов при разных новообразованиях [19].

В опухолевых тканях представители одного подсемейства РТА нередко коэкспрессируются и участвуют в реализации сходных клеточных функций. В частности, белки семейства антигенов меланомы (MAGE) содержат высококонсервативный домен гомологии MAGE (MHD), который играет значимую роль в клеточном ответе на стрессовые воздействия, а также вовлечен в процессы опухолевой прогрессии. Широкая экспрессия MAGE при различных типах злокачественных новообразований послужила основой для разработки терапевтических вакцин, часть из которых уже находится на стадии клинических испытаний для лечения меланомы, рака легкого и других онкологических заболеваний [20]. Углубленное изучение структурно-функциональных характеристик подсемейств РТА представляет собой перспективное направление для идентификации высокоспецифичных мишеней иммунотерапии.

Клиническая значимость РТА как мишеней подтверждается успехами иммунотерапии. В августе 2024 г. FDA впервые одобрило TCR-T-препарат afamitresgene autoleucel, направленный против MAGE-A4, для HLA-A\*02-положительных пациентов с синовиальной саркомой. В исследовании SPEARHEAD-1 объективный ответ достиг 39—43 %, а медиана длительности ответа превысила 11 месяцев [21]. Метаанализ 73 клинических исследований РТА-вакцин ( $n = 1435$ ) подтвердил скромную, но статистически значимую пользу: общий показатель объективного ответа составил 13 %, показатель контроля заболевания — 39 %. В рандомизированных исследованиях отмечено улучшение общей выживаемости (OR = 0,80) без значимого влияния на безрецидивную выживаемость [22]. Эти данные подчеркивают, что высокий уровень экспрессии РТА не только прогностически важен, но и открывает путь к созданию высокоэффективных персонализированных вакцин.

Таким образом, можно ожидать, что высокий уровень экспрессии РТА в опухоли ассоциирован с более выраженным иммунным ответом на эти антигены и, как следствие, с большей эффективностью нацеленных на них методов терапии. Поэтому определение экспрессии РТА у онкологических пациентов целесообразно для выбора оптимальной стратегии лечения.

## 2. Антигены главного комплекса гистосовместимости (HLA)

Особую роль в диагностике онкологических заболеваний играют антигены главного комплекса гистосовместимости (HLA). Локус HLA (человеческий лейкоцитарный антиген) представляет собой высокополиморфный кластер генов, расположенный на коротком плече 6-й хромосомы (6p21.3). HLA подразделяется на три класса — I, II и III, каждый из которых выполняет свои функции в иммунной системе.

Поскольку основные вариации сосредоточены в экзонах, кодирующих пептидсвязывающую бороздку и участок взаимодействия с Т-клеточным рецептором (ТКР), различия в структуре молекул HLA определяют их разную избирательность в связывании пептидов [23]. Таким образом, вариации в генах HLA обеспечивают презентацию чрезвычайно разнообразной группы пептидов как CD4<sup>+</sup>, так и CD8<sup>+</sup> Т-клеткам. Генетический полиморфизм молекул HLA играет ключевую роль в презентации опухолевых антигенов и формировании противоопухолевого иммунного ответа.

В зависимости от аллельного варианта HLA в процессе иммунного ответа презентуются различные пептидные фрагменты (эпитопы), при этом их количество и аффинность связывания с HLA и ТКР неодинаковы, что ведет к разной иммунной реактивности [24; 25]. Изучение взаимосвязи генетического варианта HLA и мутационного ландшафта опухолей позволяет предположить влияние аллельного типа HLA на им-

муноредактирование опухоли, в связи с чем определение генетических вариантов HLA I класса рассматривается как важный инструмент для оценки иммуногенности опухоли и прогнозирования эффективности иммунотерапии [26; 27].

Кроме того, при анализе локусов HLA класса I (A/B/C) у пациентов с саркомами мягких тканей выявлена связь определенных аллелей с ОБ и ВБП. Наличие аллелей HLA-A02, B18 и C\*07 у пациентов с саркомами мягких тканей ассоциировано со снижением ОБ и ВБП. Аллели HLA-A\*02, B40 и C03 также связаны со снижением ОБ у пациентов с меланомой и снижением ВБП у пациентов с саркомой мягких тканей [28]. Таким образом, вариабельность молекул HLA, благодаря их центральной роли в иммунном ответе, может служить прогностическим и предиктивным маркером при иммунотерапии опухолей.

Недавние результаты метаанализов показали, что уровень экспрессии HLA, а также его генетический полиморфизм и гетерозиготность имеют важное значение для выживаемости пациентов и эффективности иммунотерапии. Так, результаты метаанализа продемонстрировали значимость отдельных аллелей. Обнаружение HLA-A\*03 было связано с худшей выживаемостью при терапии ингибиторами контрольных точек (immune checkpoint inhibitors, ICI): значение ОР для ОБ и ВБП составляло 1,3—1,5, однако при отсутствии иммунотерапии аналогичной ассоциации не выявлено [29; 31].

Таким образом, продемонстрировано, что HLA может использоваться в качестве как прогностического, так и предиктивного биомаркера в онкоиммунологии.

### 3. Белок PD-1 и его лиганды (PD-L1/PD-L2)

PD-1 представляет собой трансмембранный белок, экспрессирующийся на поверхности Т-лимфоцитов, В-клеток и NK-клеток, тогда как его лиганды (PD-L1 и PD-L2) обнаруживаются на опухолевых и иммунных клетках. Взаимодействие PD-1 со своими лигандами лежит в основе уклонения опухоли от иммунного ответа [30]. Блокада данного сигнального пути лежит в основе иммунотерапии, направленной на ингибирование контрольных точек иммунного ответа, и позволяет увеличить общую выживаемость онкологических пациентов [31]. Так, использование ингибиторов сигнального пути PD-1/PD-L1 позволило увеличить ОБ пациентов с немелкоклеточным раком легкого, меланомой и раком почки [32]. В настоящее время PD-1/PD-L1 используется также в качестве биомаркера для прогнозирования эффективности иммунотерапии. Высокий уровень экспрессии PD-L1 связан с повышенной чувствительностью опухоли к иммунотерапии ICI [33]. Например, при высокой экспрессии PD-L1 частота объективного ответа может достигать 45 %, тогда как при низкой экспрессии она составляет менее 15 % [34]. Однако даже при высоком уровне экспрессии PD-L1 повышенная эффективность иммунотерапии наблюдается не всегда [35].

Таким образом, сигнальный путь PD-1/PD-L1 играет ключевую роль в механизмах уклонения опухоли от иммунного надзора. Его блокада с помощью ICI является эффективной стратегией иммунотерапии, улучшающей ОБ при ряде ЗНО. Хотя уровень экспрессии лиганда PD-L1 служит важным прогностическим биомаркером ответа на терапию, его предсказательная ценность ограничена, поскольку высокая экспрессия не всегда гарантирует клиническую эффективность.

### 4. Третичные лимфоидные структуры

Третичные лимфоидные структуры (ТЛС) представляют собой лимфоидные агрегаты, которые обнаруживаются в микроокружении солидных опухолей в условиях хронического воспаления. В настоящее время ТЛС рассматриваются в качестве перспективных биомаркеров в онкоиммунологии. Идентификация ТЛС отражает функ-

циональное состояние адаптивного иммунного ответа на уровне микроокружения опухоли. Обнаружение данных структур в ткани опухоли, как правило, связано с благоприятным прогнозом и улучшенным ответом на иммунотерапию [36].

Однако многочисленные исследования показали, что прогностическое значение ТЛС в значительной степени зависит от их зрелости, плотности и пространственного расположения. Степень зрелости ТЛС определяет их функциональную активность. Так, Т- и В-клетки, входящие в состав незрелых ТЛС, часто не способны обеспечивать полноценный иммунный ответ, тогда как зрелые ТЛС с герминативными центрами представляют собой место пролиферации и дифференцировки В-клеток, продукции высокоавидных антител и активации Т-клеточного ответа [37]. В крупном ретроспективном полногеномном анализе ЗНО наличие зрелых ТЛС было связано с улучшенной выживаемостью и ответом на иммунотерапию вне зависимости от экспрессии PD-L1 или плотности CD8+ Т-клеток [38].

ТЛС можно использовать в качестве биомаркера ответа на иммунотерапию, особенно на фоне применения ICI [39]. Во Франции в 2022 г. было проведено многоцентровое исследование PEMBROSARC (фаза II), в ходе которого была осуществлена проспективная валидация ТЛС как предиктивного биомаркера [40]. У пациентов с ТЛС-положительными опухолями наблюдались значительно более высокие показатели объективного ответа, ВБП и ОВ. Например, ВБП у таких пациентов составила 40 % по сравнению с 4,9 % в группе пациентов, отобранных без учета ТЛС-статуса [40].

На сегодняшний день использование ТЛС в качестве биомаркера в рутинной клинической практике связано с рядом трудностей, одна из которых — отсутствие стандартизированных подходов к их оценке [41]. Тем не менее недавно были предложены первые унифицированные подходы. Так, окрашивание гематоксилином-эозином и обнаружение герминативных центров в сочетании с иммуногистохимическим выявлением CD20+ В-клеточных зон и CD23+ фолликулярных дендритных клеток дает возможность идентифицировать зрелые ТЛС в различных типах опухолей [36]. Активно разрабатываются алгоритмы глубокого обучения для автоматизированной оценки ТЛС [42; 43]. Однако не все ТЛС функционально эквивалентны: существуют и иммуносупрессивные варианты. Например, у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой наблюдались нарушения метаболизма, блокирующие дифференцировку В-клеток и созревание ТЛС. В данном случае обнаружение ТЛС было связано с прогрессией опухоли [44]. Кроме того, есть опухоли, в которых ТЛС встречаются редко. Так, лишь приблизительно у 15 % пациентов с глиобластомой обнаруживаются ТЛС, часто локализованные вблизи мозговых оболочек или желудочков [38]. Это ограничивает использование ТЛС в качестве биомаркера при определенных нозологических формах ЗНО.

## 5. Биомаркеры системного и локального иммунного ответа

### 5.1. Анализ субпопуляционного состава иммунных клеток в опухоли и периферической крови

Результаты недавно выполненных метаанализов демонстрируют связь высокой плотности ТЛ, особенно CD8+ клеток, с улучшением ОВ и ВБП [45]. Метаанализы по изучению иммунорегуляторных клеток показали противоположные результаты. Так, обнаружение Treg (FoxP3+) было связано с неблагоприятным прогнозом (ОР 1,45—1,92) и подавлением цитотоксического иммунного ответа.

Циркулирующие иммунные клетки также обладают прогностической значимостью. Результаты метаанализа продемонстрировали, что повышенные уровни НК-клеток могут быть связаны с улучшением прогноза: значение ОР для ОВ составило 0,34 [46].

Для оценки противоопухолевого иммунитета традиционно используется определение количественного содержания и субпопуляционного состава клеток иммунной системы как в опухолевом микроокружении, так и в периферической крови. Присутствие эффекторных клеток в опухолевом очаге, их локализация и отсутствие иммуносу-

прессорных популяций связаны с реализацией эффективного иммунного ответа [47]. Т-хелперы представляют собой гетерогенную группу клеток и могут как стимулировать, так и подавлять активность иммунной системы. Известно, что Th2-клетки участвуют в активации M2-макрофагов, способствующих росту опухоли [48].

Другая группа исследователей показала, что иммунологическая оценка опухолевого микроокружения отражает его функциональное состояние и позволяет идентифицировать подгруппы пациентов с различной чувствительностью к иммунотерапии. Интеграция иммунных и клинико-патологических параметров обеспечивает значимое улучшение прогностической точности, что подчеркивает необходимость внедрения иммунных биомаркеров в клиническую практику [49]. Кроме того, данные метаанализа подтверждают корреляцию наличия CD3+ и CD8+ Т-клеток в опухоли с улучшением выживаемости [50].

Изучение субпопуляционного состава периферической крови также дает важную информацию. Так, отношение количества нейтрофилов к лимфоцитам (NLR) служит прогностическим фактором при различных солидных опухолях [51]. Аналогичное значение показано для соотношения лимфоцитов и моноцитов [52; 53]. Субпопуляционный состав лимфоцитов у онкологических пациентов отличается от такового у здоровых лиц. В масштабной оценке иммунных статусов 558 пациентов (3040 измерений), проведенной в НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова, лишь в 0,1 % наблюдений показатели были в пределах нормы: в 51,7 % отмечалось снижение относительного количества лимфоцитов, часто наблюдалось уменьшение содержания CD3+, CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, увеличение количества CD4+CD8+ клеток и доли Treg [54]. Важной практической задачей остается определение границ значимости изменений этих параметров.

Таким образом, анализ клеточного состава иммунной системы в опухоли и периферической крови позволяет оценить локальный и системный противоопухолевый ответ и в комбинации с другими методами формирует комплексную картину, необходимую для прогнозирования эффективности терапии.

## 5.2. Цитокиновый профиль и растворимые факторы

Цитокиновый профиль опухолевого микроокружения имеет большое значение в регуляции взаимодействия опухолевых клеток с компонентами иммунной системы, оказывая влияние на развитие опухоли, метастазирование и эффективность терапии [55]. Оценка специфического противоопухолевого иммунного ответа предполагает определение поляризации иммунного микроокружения в направлении противоопухолевого фенотипа, что связано с определенным профилем секреции цитокинов. IL-2 выполняет двойственную функцию: с одной стороны, он активирует пролиферацию Т-лимфоцитов и NK-клеток, усиливая противоопухолевый иммунитет; с другой — в высоких концентрациях IL-2 может способствовать прогрессии опухоли [55].

IL-6 участвует в активации сигнального пути JAK/STAT3 и пролиферации опухолевых клеток, а также подавляет иммунный ответ, способствуя развитию ЗНО. IL-8 играет важную роль в ангиогенезе, инвазии и метастазировании. Повышенное содержание этих цитокинов связано с неблагоприятным прогнозом [55; 56]. Также показано, что IL-10 способствует уклонению опухоли от иммунной системы, подавляя противоопухолевый иммунный ответ. Однако выявлено, что в некоторых случаях данный цитокин может подавлять развитие сосудов, питающих опухоль и способствующих ее развитию [55].

В исследованиях у пациентов с меланомой, получавших комбинацию ниволумаба и ипилимумаба, установлено, что высокий уровень IL-23 связан с устойчивым клиническим ответом на терапию (ОР = 3,47; 95 % ДИ 1,22—9,85;  $p = 0,019$ ) [57], в то время как высокий уровень IL-10 ассоциирован с его отсутствием (ОР = 0,27; 95 % ДИ 0,10—0,74;  $p = 0,011$ ) [57]. Высокий исходный уровень IL-8 ( $\geq 23$  pg/mL) коррелирует с меньшей эффективностью ИС [58]. Более того, повышенное содержание IL-6 и IL-8 связано с развитием нежелательных явлений [59]. Другое крупное семейство цитокинов — хемо-

кины — способствует привлечению CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в микроокружение опухоли. Повышенное содержание этих молекул связано с формированием так называемых «горячих» опухолей, которые характеризуются высокой иммунной инфильтрацией и благоприятным клиническим прогнозом [60].

Таким образом, определение профиля цитокинов и других сигнальных молекул дает важную информацию о состоянии иммунной системы пациента с ЗНО, процессах взаимодействия опухоли с микроокружением и позволяет прогнозировать ответ на иммунотерапию, а также оценивать ее эффективность.

## 6. Реакция гиперчувствительности замедленного типа

Реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) широко используется для оценки эффективности активации клеточного иммунного ответа при иммунотерапии, особенно вакцинотерапии. Тест заключается во внутрикожном введении небольших количеств опухолевого антигена. В ответ антиген-презентирующие клетки кожи секретируют цитокины, привлекающие CD4<sup>+</sup> Т-клетки памяти, которые активируют макрофаги и цитотоксические лимфоциты. Возникающая эритема и/или уплотнение оцениваются через 24–72 ч. Дополнительно возможно проведение биопсии кожи с иммуногистохимическим окрашиванием для выявления антиген-специфичных Т-лимфоцитов [61].

Благодаря доступности и простоте выполнения метод накопил обширную базу клинических данных. Корреляция положительной реакции ГЗТ с улучшением общей выживаемости показана при вакцинотерапии глиомы [62] и рака поджелудочной железы [63], рака почки [64] и меланомы [65].

В исследовании Т. Л. Нехаевой и соавт. (2024) была проведена оценка прогностического значения реакции ГЗТ у 277 пациентов с меланомой ( $n = 143$ ) и саркомами мягких тканей ( $n = 134$ ), получавших аутологичную дендритно-клеточную вакцину (ДКВ). Конверсия реакции ГЗТ (увеличение размера папулы более чем на 10 мм на фоне терапии) была признана независимым прогностическим фактором. В многофакторной регрессионной модели Кокса наличие конверсии ГЗТ снижало риск смерти на 46 % (95 % ДИ 21–64 %;  $p = 0,02$ ) и риск прогрессирования на 39 % (95 % ДИ 20–55 %;  $p = 0,001$ ). Полученные данные свидетельствуют о возможности использования реакции ГЗТ для оценки эффективности иммунотерапии, в частности вакцинотерапии ДКВ [65].

В рандомизированном исследовании с участием 42 пациентов, в котором сравнили иммунологическую эффективность аутологичных ДКВ и вакцин на основе опухолевых клеток, положительная реакция ГЗТ была связана с более длительной выживаемостью: медиана составила 43,4 месяца по сравнению с 20,5 месяца (95 % ДИ от 18,6 до > 60 против 9,3–32,3 месяца) и снижением риска смерти на 70 % (ОР = 0,304;  $p = 0,0053$ ; 95 % ДИ 0,131–0,702). Наиболее распространенными нежелательными явлениями были местные реакции в месте инъекции от легкой до умеренной степени тяжести и гриппоподобные симптомы, однако при применении аутологичных вакцин на основе опухолевых клеток нежелательные явления 2-й степени тяжести возникали чаще [66].

В 2023 г. при терапии ДКВ против WT1 (Wilms Tumor 1) у пациентов с глиомой положительная реакция ГЗТ динамически коррелировала с улучшением иммунного профиля (снижение отношения нейтрофилов к лимфоцитам, NLR) и напрямую отражала состояние противоопухолевого иммунитета, что делает тест перспективным неинвазивным индикатором. Это подтверждает потенциал ГЗТ не только как скринингового, но и как динамического биомаркера для мониторинга клеточной иммунотерапии. Согласно данным обзора, опубликованного в 2023 г., применение WT1-направленных ДКВ сопровождается индукцией WT1-специфического иммунного ответа, при этом положительная реакция ГЗТ у пациентов коррелирует с клинической эффективностью [67]. Однако в других работах такой корреляции выявлено не было.

Противоречивость результатов может быть связана с различиями иммуномодулирующих сигналов в микроокружении опухоли и периферических тканях. К недостаткам метода относятся отсутствие стандартизированной дозы антигена и порога положительного ответа, что ведет к вариабельности результатов. Кроме того, положительный ответ может быть неспецифическим (например, на компоненты вакцины), а у части пациентов без внешних проявлений ГЗТ в биоптатах наблюдается Т-клеточная инфильтрация [68]. В связи с низкой специфичностью реакция ГЗТ может рассматриваться лишь как метод предварительного скрининга, результаты которого требуют подтверждения более точными иммунологическими тестами.

С учетом разнородности рассмотренных биомаркеров — от молекулярно-генетических (цодНК, РТА) до клеточных (ТІЛ, ТІС) и гуморальных (цитокины, HLA) — нами была составлена сравнительная характеристика их прогностической значимости, а также чувствительности/специфичности. Данные систематизированы в таблице.

Сравнительная характеристика биомаркеров эффективности и безопасности иммунотерапии в онкологии

Comparative analysis of biomarkers of the efficacy and safety of immunotherapy in oncology

| Биомаркер                       | Тип                                                              | Прогностическая значимость                                                                                                                | Чувствительность / специфичность                                   | Основные ограничения                         | Ключевые исследования                                                                  |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| цодНК                           | Биомаркер, ассоциированный с опухолью (молекулярно-генетический) | Высокий уровень связан со снижением ОВ и ВБП. Снижение уровня во время терапии коррелирует с ответом на лечение                           | Высокая аналитическая чувствительность при использовании ПЦР и NGS | Требуются стандартизированные методы анализа | Chen et al., 2025 [8]; Schroeder et al., 2024 [12]; Forghani et al., 2025 [13]         |
| РТА (MAGE-A4, NY-ESO-1, LAGE-1) | Биомаркер, ассоциированный с опухолью                            | Высокая экспрессия связана с неблагоприятным клиническим течением заболевания и худшими показателями выживаемости                         | Средняя. Зависит от типа опухоли и уровня экспрессии               | Зависимость от типа опухоли                  | Wang et al., 2019 [18]; D’Angelo et al., 2024 [22]                                     |
| HLA-I                           | Иммунологический маркер                                          | Отдельные аллели (например, HLA-A*03) ассоциированы с худшей выживаемостью при ІСІ; гетерозиготность может повышать эффективность терапии | Умеренная                                                          | Вариабельность                               | Naranbhai et al., 2022 [29]; Correale et al., 2020 [26]; Tanegashima et al., 2024 [27] |
| PD-L1                           | Иммунологический биомаркер                                       | Высокая экспрессия связана с большей вероятностью ответа на ингибиторы контрольных точек                                                  | Ограниченная                                                       | Низкая специфичность                         | Zhang et al., 2025 [33]; Oisakede et al., 2025 [34]                                    |

Окончание табл.

| Биомаркер | Тип                                                     | Прогностическая значимость                                                                | Чувствительность / специфичность                               | Основные ограничения                 | Ключевые исследования                                   |
|-----------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| ТЛС       | Иммунологический биомаркер                              | Очень высокая. Наличие зрелых ТЛС связано с улучшением ОВ, ВБП и ответа на ICI            | Высокая в случае ряда опухолей                                 | Нет единых критериев оценки зрелости | Italiano et al., 2022 [40]; Liu et al., 2025 [38]       |
| CD8+ TIL  | Иммунный инфильтрационный маркер микроокружения опухоли | Высокая. Высокая плотность связана с улучшением ОВ и ВБП                                  | Высокая чувствительность в случае выявления «горячих» опухолей | Зависимость от методики подсчета     | Gooden M.J.M. et al., 2011 [50]                         |
| NK-клетки | Иммунологический биомаркер                              | Высокая. Высокое содержание связано с лучшей ОВ                                           | Умеренная                                                      | Зависимость от методики подсчета     | Nersesian et al., 2021 [46]                             |
| IL-6      | Цитокиновый биомаркер                                   | Средняя. Повышенный уровень связан с прогрессированием опухоли и токсичностью ICI         | Умеренная                                                      | Высокая изменчивость                 | Wang et al., 2021 [56]                                  |
| IL-8      | Цитокиновый биомаркер                                   | Средняя. Высокий уровень связан с низкой эффективностью ICI и неблагоприятным прогнозом   | Высокая                                                        | Высокая изменчивость                 | Wang et al., 2021 [56]                                  |
| IL-10     | Цитокиновый биомаркер                                   | Средняя. Низкий уровень ассоциирован с лучшим ответом на иммунотерапию                    | Умеренная                                                      | Высокая изменчивость                 | Wang et al., 2021 [56]; Chen et al., 2025               |
| IL-23     | Цитокиновый биомаркер                                   | Средняя. Высокий уровень ассоциирован с устойчивым клиническим ответом на иммунотерапию   | Умеренная                                                      | Высокая изменчивость                 | Wang et al., 2021 [56]                                  |
| ГЗТ       | Функциональный иммунологический тест                    | Низкая. Положительная реакция связана с увеличением ОВ и снижением риска прогрессирования | Высокая чувствительность, но низкая специфичность              | Низкая специфичность                 | Nekhaeva et al., 2024 [65]; Ogasawara et al., 2024 [67] |

## 7. Современные методы обнаружения биомаркеров

Выявление биомаркеров эффективности и безопасности иммунотерапии может быть затруднено из-за их низкой концентрации в анализируемых образцах. В настоящее время для обнаружения биомаркеров ЗНО используются методы проточной

цитофлюориметрии (включая внутриклеточное окрашивание), ИФА и его модификация ELISPOT (enzyme-linked immunospot), количественная ПЦР, FISH, а также мультиплексные иммунологические методы.

При использовании FISH флуоресцентно-меченый зонд гибридизуется с ДНК для обнаружения изменений числа копий гена (например, амплификации гена HER2) или слияния генов в опухолевых клетках. Выделяют также многоцветный FISH (спектральное кариотипирование), позволяющий идентифицировать одновременно все хромосомы за счет уникального окрашивания каждой из них. Данный метод характеризуется высокой чувствительностью и позволяет выявлять хромосомные аномалии. Многоцветный FISH может быть использован для обнаружения биомаркеров, диагностирующих и прогнозирующих эффективность лечения, особенно при гематологических злокачественных новообразованиях, саркомах, карциномах и опухолях головного мозга [69].

Особое место в онкоиммунологии занимает ELISPOT — высокочувствительный метод обнаружения и подсчета клеток, секретирующих индивидуальные белки *in vitro*. Метод предназначен для идентификации и определения количества клеток, секретирующих цитокины. Высокая разрешающая способность ELISPOT позволяет оценивать антиген-стимулированную продукцию цитокинов, что крайне важно для оценки специфического противоопухолевого иммунного ответа [70]. К преимуществам метода ELISPOT относятся определение продукции цитокинов на уровне каждой отдельной клетки, что дает возможность вычислять частоту цитокин-продуцирующих клеток; более высокая чувствительность по сравнению с ИФА (ELISPOT способен выявлять одну цитокин-продуцирующую клетку среди 300 000 клеток популяции); возможность исследования живых клеток, а не биологических жидкостей (в отличие от ИФА); объективный и быстрый анализ количества цитокин-продуцирующих клеток (пятен, spots) и относительного количества цитокина на одну клетку (размера пятна). Таким образом, метод дает как качественную (тип иммунного белка), так и количественную (число отвечающих клеток) информацию [71; 72].

Благодаря уникально высокой чувствительности ELISPOT-анализа идентификация малочисленных клеточных популяций (например, при антиген-специфических ответах), которая ранее была недоступна, стала относительно простой задачей. Высокая чувствительность во многом обусловлена тем, что детектируемый продукт в момент анализа находится на поверхности секретирующей клетки (будучи связан с ее рецепторами) до того, как он растворится в супернатанте или деградирует [72]. Это делает ELISPOT значительно более чувствительным, чем ИФА, и полезным для мониторинга антиген-специфических ответов в различных областях иммунологии: исследования рака, трансплантация органов, инфекционные и аутоиммунные заболевания, разработка вакцин [73]. На сегодняшний день существует модификация данного метода, FluoroSpot, дающая возможность одновременно выявлять несколько цитокинов, что позволяет более детально проанализировать функциональность иммунной системы [74].

В онкологии ELISPOT применяется для определения эффективности антиген-специфического лечения (по выработке интерферона-гамма, интерлейкинов, гранзима В, перфорина и других цитокинов иммунокомпетентными клетками), а также для подбора дозы, длительности и сроков введения препарата у больных, получающих клеточную иммунотерапию, химиотерапию или комбинированное лечение.

Помимо ELISPOT в настоящее время разрабатываются новые методы машинного обучения, позволяющие диагностировать онкологические заболевания. Так, подход TARGETS на основе искусственного интеллекта позволяет диагностировать и прогнозировать реакцию на конкретные лекарственные препараты [75]. Кроме того, проводятся испытания биосенсоров для повышения чувствительности и специфичности обнаружения биомаркеров. Биосенсоры представляют собой устройства, регистриру-

ющие биомаркер с помощью химического процесса, который преобразуется датчиком в электрический сигнал с последующей обработкой и усилением. Разрабатываемые биосенсоры могут быть использованы для выявления таких биомаркеров ЗНО, как циркулирующая опухолевая ДНК, РНК, микроРНК (например, miR-141 в сыворотке крови больных раком предстательной железы) [76], метилирование ДНК в цодНК [77], белки, циркулирующие опухолевые клетки в биологических жидкостях [78]. Недавно был описан новый биосенсор на основе флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET), позволяющий выявлять РНК теломеразы в опухолевых клетках молочной железы [79]. Данный подход дает возможность выявлять опухолевые клетки и осуществлять раннюю диагностику онкологических заболеваний. Для обнаружения биомаркеров ЗНО также разрабатываются микрофлюидные чипы [80], например существуют микрофлюидные чипы для выявления белков, ассоциированных с раком полости рта [81].

## Заключение

Представленные в обзоре данные свидетельствуют о том, что современная онкоиммунология располагает широким спектром потенциальных биомаркеров, ассоциированных с эффективностью и безопасностью иммунотерапии. Генетические особенности системы HLA, цодНК, экспрессия РТА, сигнальный путь PD1/PD-L1, ТЛС, клеточный состав опухолевого микроокружения и субпопуляционный состав периферической крови, цитокиновый профиль и реакция ГЗТ — каждый из этих подходов отражает отдельные грани сложного взаимодействия опухоли и иммунной системы.

Критическое сравнение прогностической силы различных биомаркеров показывает их существенную неоднородность. Наиболее высокую предсказательную ценность демонстрируют третичные лимфоидные структуры (ТЛС) и динамические показатели циркулирующей опухолевой ДНК (цодНК), в то время как рутинно используемый PD-L1 характеризуется ограниченной специфичностью и внутриопухолевой гетерогенностью. Цитокиновые маркеры (IL-6, IL-8) отражают текущий воспалительный статус, но страдают от высокой изменчивости, а HLA-генотипирование, хотя и стабильно, обладает умеренной прогностической силой, ограниченной определенными аллелями.

Ни один из рассмотренных маркеров на сегодняшний день не обладает достаточной предсказательной силой для рутинного клинического использования в качестве единственного прогностического критерия. Основными ограничениями являются гетерогенность опухолей, вариабельность иммунного статуса пациентов и отсутствие стандартизации методологии. Перспективным направлением представляется интеграция данных, полученных разными методами — особенно комбинация ТЛС (исходная стратификация) и цодНК (динамический мониторинг), — с применением алгоритмов машинного обучения для построения комплексных прогностических моделей для каждого пациента.

Особую важность решение этой проблемы приобретает в контексте развития клеточной иммунотерапии (ДКВ, CAR-T, TCR-T, TIL), где контроль качества клеточного продукта, его персистенции и функциональной активности требует разработки специфических динамических биомаркеров. Дальнейшие проспективные исследования, направленные на валидацию комбинированных панелей биомаркеров, в сочетании с интеграцией HLA-генотипирования, цитокинового профиля и ГЗТ-тестов с ИИ-моделями, позволят перейти к истинно персонализированному управлению иммунотерапией, максимизируя эффективность и пользу для пациентов с солидными опухолями при одновременном снижении ее токсичности.

**Финансирование.** Работа выполнялась в рамках исследований по плановой НИР ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России 2024—2026 гг. (РК 124020300020-0).

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи. Все авторы утвердили окончательную версию рукописи и принимают на себя ответственность за все аспекты работы, подразумевающую надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью или добросовестностью любой части работы.

**Вклад авторов:**

**И. В. Кравцов** — участие в разработке концепции, структуры и методологии обзора; поиск, отбор и анализ отечественных и зарубежных научных публикаций; систематизация, обобщение и интерпретация литературных данных; подготовка первоначального варианта рукописи, написание и доработка отдельных разделов статьи, участие в обсуждении научных результатов и редактировании текста;

**А. С. Сюткина** — участие в разработке концепции и структуры обзора; критический анализ, обобщение и интерпретация литературных данных; проверка актуальности и научной достоверности использованных источников; подготовка отдельных разделов рукописи, участие в обсуждении полученных результатов, редактировании и согласовании окончательной версии текста;

**Т. Л. Нехаева** — разработка общей научной концепции обзора, научное руководство работой, консультирование по вопросам интерпретации современных научных данных, критический пересмотр рукописи на предмет научного содержания и логики изложения, внесение существенных интеллектуальных замечаний, окончательное редактирование и утверждение рукописи.

Все авторы внесли существенный интеллектуальный вклад в подготовку статьи, приняли участие в обсуждении результатов анализа литературы, прочитали и утвердили окончательную версию рукописи, а также согласны нести ответственность за все аспекты работы, связанные с ее точностью и добросовестностью.

**Funding.** The scientific work was carried out within the framework of research on the planned research topic of the Federal State Budgetary Scientific Institution “N. N. Petrov National Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Health of the Russian Federation for 2024—2026 (RK 124020300020-0).

**Conflict of Interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article. All authors approved the final version of the manuscript and take responsibility for all aspects of the work, including ensuring that any questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

**Authors' contribution:**

**I. V. Kravtsov** — participated in the development of the review concept, structure, and methodology; performed the search, selection, and analysis of Russian and international scientific publications; systematized, summarized, and interpreted the published data; prepared the initial draft of the manuscript, wrote and revised individual sections of the article, and participated in the discussion of scientific findings and manuscript editing;

**A. S. Syutkina** — participated in the development of the review concept and structure; critically analyzed, summarized, and interpreted the published literature; verified the relevance and scientific accuracy of the cited sources; prepared individual sections of the manuscript; participated in the discussion of the findings, manuscript revision, and approval of the final text;

**T. L. Nekhaeva** — developed the overall scientific concept of the review; supervised the study; provided scientific guidance on the interpretation of current evidence; critically revised the manuscript for important intellectual content and logical consistency; contributed substantial intellectual input, performed the final editing, and approved the final version of the manuscript.

All authors made substantial intellectual contributions to this work, participated in the discussion and interpretation of the reviewed data, approved the final version of the manuscript, and agreed to be accountable for all aspects of the work.

## Список литературы

1. Larsson A. M., Nordström O., Johansson A., Rydén L., Leandersson K., Bergenfelz C. Peripheral Blood Mononuclear Cell Populations Correlate with Outcome in Patients with Metastatic Breast Cancer. *Cells*. 2022, 11(10), 1639, DOI: 10.3390/cells11101639.
2. Liu D., Che X., Wang X., Ma C., Wu G. Tumor Vaccines: Unleashing the Power of the Immune System to Fight Cancer. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023, 16(10), 1384, DOI: 10.3390/ph16101384.
3. Shi G., Scott M., Mangiamale C. G., Heller R. Modification of the Tumor Microenvironment Enhances Anti-PD-1 Immunotherapy in Metastatic Melanoma. *Pharmaceutics*. 2022, 14(11), 2429, DOI: 10.3390/pharmaceutics14112429.
4. Lanman R. B., Mortimer S. A., Zill O. A., Sebisanoovic D., Lopez R., Blau S., et al. Analytical and clinical validation of a digital sequencing panel for quantitative, highly accurate evaluation of cell-free circulating tumor DNA. *PLoS One*. 2015, 10(10), e0140712, DOI: 10.1371/journal.pone.0140712.
5. Elazezy M., Joosse S. A. Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2018, 16, 370–378, DOI: 10.1016/j.csbj.2018.10.002.
6. Hitchen N., Shahnam A., Tie J. Circulating Tumor DNA: A Pan-Cancer Biomarker in Solid Tumors with Prognostic and Predictive Value. *Annual Review of Medicine*. 2025, 76(1), 207–223, DOI: 10.1146/annurev-med-100223-090016.
7. Martínez-Vila C., Teixido C., Aya F., Martín R., González-Navarro E. A., Alos L., et al. Detection of Circulating Tumor DNA in Liquid Biopsy: Current Techniques and Potential Applications in Melanoma. *Int. J. Mol. Sci.* 2025, 26(2), 861, DOI: 10.3390/ijms26020861.
8. Chen X., Zhang M., Zhou Q., Guo N., Cao B., Zeng H., et al. Circulating tumor DNA as prognostic markers of non-small cell lung cancer (NSCLC): a systematic review and meta-analysis. *Translational Lung Cancer Research*. 2025, 14(12), 5491–5508, DOI: 10.21037/tlcr-2025-900.
9. Panet F., Parakonstantinou A., Borrell M., Vivancos J., Vivancos A., Oliveira M. Use of ctDNA in early breast cancer: analytical validity and clinical potential. *NPJ Breast Cancer*. 2024, 10(1), 50, DOI: 10.1038/s41523-024-00653-3.
10. Slusher N., Jones N., Nonaka T. Liquid biopsy for diagnostic and prognostic evaluation of melanoma. *Front. Cell Dev. Biol.* 2024, 12, 1420360, DOI: 10.3389/fcell.2024.1420360.
11. Sánchez-Herrero E., Serna-Blasco R., Robado de Lope L., González-Rumayor V., Romero A., Provencio M. Circulating Tumor DNA as a Cancer Biomarker: An Overview of Biological Features and Factors That may Impact on ctDNA Analysis. *Front. Oncol.* 2022, 12, 943253, DOI: 10.3389/fonc.2022.943253.
12. Schroeder C., Gatidis S., Kelemen O., Schütz L., Bonzheim I., Muyas F., et al. Tumour-informed liquid biopsies to monitor advanced melanoma patients under immune checkpoint inhibition. *Nat. Commun.* 2024, 15(1), 8750, DOI: 10.1038/s41467-024-52923-0.
13. Forghani S., Shahsavand A., Samiee R., Kharaghani M., Kiumarsi A., Sabet F. M., et al. The prognostic and clinical utility of circulating tumor DNA in diffuse large B-cell Lymphoma: a systematic review and meta-analysis. *NPJ Precision Oncology*. 2025, 9(1), 385, DOI: 10.1038/s41698-025-01174-3.
14. Avanzini S., Kurtz D. M., Chabon J. J., Moding E. J., Hori S. S., Gambhir S. S. A mathematical model of ctDNA shedding predicts tumor detection size. *Sci. Adv.* 2020, 6(50), eabc4308, DOI: 10.1126/sciadv.abc4308.
15. Alimardani M., Rahimi H., Ghasemi A., Moghbeli M., Gholamin M., Abbaszadegan M. R. Overexpression of cancer testis antigens in gastric cancer and their correlations with the patients' clinicopathological characteristics. *BMC Med. Genomics*. 2025, 19(1), 25, DOI: 10.1186/s12920-025-02295-1.

16. Ren S., Zhang Z., Li M., Wang D., Guo R, Fang X., et al. Cancer testis antigen sub-families: Attractive targets for therapeutic vaccine (Review). *Int. J. Oncol.* 2023, 62(6), 71, DOI: 10.3892/ijo.2023.5519.
17. Alimardani M., Rahimi H., Ghasemi A., Moghbeli M., Gholamin M., Abbaszadegan M. R. Overexpression of cancer testis antigens in gastric cancer and their correlations with the patients' clinicopathological characteristics. *BMC Medical Genomics.* 2026, 19(1), 25, DOI: 10.1186/s12920-025-02295-1.
18. Wang H., Chen D., Wang R., Quan W., Xia D., Mei J. NY-ESO-1 expression in solid tumors predicts prognosis. *Medicine.* 2019, 98(48), e17990, DOI: 10.1097/MD.00000000000017990.
19. Salmaninejad A., Zamani M. R., Pourvahedi M., Golchehre Z., Bereshneh A. H., Rezaei N. Cancer/Testis Antigens: Expression, Regulation, Tumor Invasion, and Use in Immunotherapy of Cancers. *Immunol. Invest.* 2016, 45(7), 619–640, DOI: 10.1080/08820139.2016.1197241.
20. Alsalloum A., Shevchenko J., Sennikov S. The Melanoma-Associated Antigen Family A (MAGE-A): A Promising Target for Cancer Immunotherapy? *Cancers.* 2023, 15(6), 1779, DOI: 10.3390/cancers15061779.
21. D'Angelo S. P., Araujo D. M., Razak A. R. A., Agulnik M., Attia S., Blay J.-Y., et al. Afamitresgene autoleucel for advanced synovial sarcoma and myxoid round cell liposarcoma (SPREARHEAD-1): an inter-national, open-label, phase 2 trial. *Lancet.* 2024, 403(10435), 1460–1471, DOI: 10.1016/S0140-6736(24)00319-2.
22. Wood G. E., Meyer C., Petitprez F., D'Angelo S. P. Immunotherapy in Sarcoma: Current Data and Promising Strategies. *ASCO Educ. Book.* 2024, 44(3), e432234, DOI: 10.1200/EDBK\_432234.
23. Dendrou C. A., Petersen J., Rossjohn J., Fugger L. HLA variation and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2018, 18, 325–339, DOI: 10.1038/nri.2017.143.
24. Abualrous E. T., Stricht J., Freund C. Major histocompatibility complex (MHC) class I and class II proteins: impact of polymorphism on antigen presentation. *Current Opinion in Immunology.* 2021, 70, 95–104, DOI: 10.1016/j.coi.2021.04.009.
25. Ivanova M., Shivarov V. HLA genotyping meets response to immune checkpoint inhibitors prediction: A story just started. *Int. J. Immunogenet.* 2021, 48(2), 193–200, DOI: 10.1111/iji.12517.
26. Correale P., Saladino R. E., Giannarelli D., Giannicola R., Agostino R., Staropoli N., et al. Distinctive germline expression of class I human leukocyte antigen (HLA) alleles and DRB1 heterozygosity predict the outcome of patients with non-small cell lung cancer receiving PD-1/PD-L1 immune checkpoint blockade. *J. Immunother. Cancer.* 2020, 8(1), e000733, DOI: 10.1136/jitc-2020-000733.
27. Tanegashima T., Shiota M., Fujiyama N., Narita S., Habuchi T., Fukuchi G., et al. Effect of HLA Genotype on Anti-PD-1 Antibody Treatment for Advanced Renal Cell Carcinoma in the SNI-P-RCC Study. *J. Immunol.* 2024, 213(1), 23–28, DOI: 10.4049/jimmunol.2300308.
28. Nekhaeva T. L., Novik A. V., Girdyuk D. V., Danilova A. B., Savchenko P. A., Grigoryevskaya A. V., et al. Prognostic value of HLA class I expression in patients with cutaneous melanoma and soft tissue sarcomas treated with cancer-testis antigens-based vaccine. *Explor Med.* 2025, 6, 1001287, DOI: 10.37349/emed.2025.1001287.
29. Naranbhai V., Viard M., Dean M., Groha S., Braun D. A., Labaki C., et al. HLA-A\*03 and response to immune checkpoint blockade in cancer: an epidemiological biomarker study. *Lancet Oncol.* 2022, 23(1), 172–184, DOI: 10.1016/S1470-2045(21)00582-9.
30. Mandal K., Barik G. K., Santra M. K. Overcoming resistance to anti-PD-L1 immunotherapy: mechanisms, combination strategies, and future directions. *Mol. Cancer.* 2025, 24(1), 246, DOI: 10.1186/s12943-025-02400-z.
31. Neil V., Lee S. W. Advancing Cancer Treatment: A Review of Immune Check-point Inhibitors and Combination Strategies. *Cancers (Basel).* 2025, 17(9), 1408, DOI: 10.3390/cancers17091408.
32. Topalian S. L., Hodi F. S., Brahmer J. R., Gettinger S. N., Smith D. C., McDermott D. F., et al. Five-Year Survival and Correlates Among Patients With Advanced Melanoma, Renal Cell Carcinoma, or Non-Small Cell Lung Cancer Treated With Nivolumab. *JAMA Oncol.* 2019, 5(10), 1411–1420, DOI: 10.1001/jamaoncol.2019.2187.

33. Zhang J., Song Z., Zhang Y., Zhang C., Xue Q., Zhang G., et al. Recent advances in biomarkers for predicting the efficacy of immunotherapy in non-small cell lung cancer. *Front. Immunol.* 2025, 16, 1554871, DOI: 10.3389/fimmu.2025.1554871.
34. Oisakede E. O., Akinro O., Bello O. J., Analikwu C. C., Egbon E., Olawade D. B. Predictive models for immune checkpoint inhibitor response in cancer: A review of current approaches and future directions. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2025, 216, 104980, DOI: 10.1016/j.critrevonc.2025.104980.
35. Li A., Luo L., Du W., Yu Z., He L., Fu S., et al. Deciphering transcriptomic determinants of the divergent link between PD-L1 and immunotherapy efficacy. *NPJ Precis. Oncol.* 2023, 7(1), 87, DOI: 10.1038/s41698-023-00443-3.
36. Hernández-Verdin I., Dimberg A., Thommen D. S., Engblom C., Vanhersecke L., Silina K., et al. Tertiary lymphoid structures in the era of cancer therapy. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2026, 45(1), 48, DOI: 10.1186/s13046-026-03644-3.
37. Su G.-L., Zhang M.-J., Li H., Sun Z.-J. Dissecting Tertiary Lymphoid Structures in Cancer: Maturation, Localization and Density. *Theranostics.* 2025, 15(18), 9459–9485, DOI: 10.7150/thno.113940.
38. Liu Y.-M., Zhao K., Xie M., Bao X.-Y., Cai W.-H., Jin J.-M., et al. Density and maturity ratio of tertiary lymphoid structures in stage II-III non-small cell lung cancer predict postoperative recurrence risk. *Transl. Lung Cancer Res.* 2025, 14(9), 3349–3362, DOI: 10.21037/tlcr-2025-477.
39. Hayashi Y., Makino T., Doki Y. Tertiary Lymphoid Structures as Predictive Biomarkers for Immune Checkpoint Inhibitor Therapy in Esophageal Cancer. *Gan To Kagaku Ryoho.* 2025, 52(9), 618–623, PMID: 41047768.
40. Italiano A., Bessedé A., Pulido M., Bompas E., Piperno-Neumann S., Chevreau C., et al. Pembrolizumab in soft-tissue sarcomas with tertiary lymphoid structures: a phase 2 PEMBROSARC trial cohort. *Nat. Med.* 2022, 28(6), 1199–1206, DOI: 10.1038/s41591-022-01821-3.
41. Luis M.-E., Rhodes J. L., Marion V. C., Kemp R. A. Tertiary lymphoid structures in cancer — considerations for patient prognosis. *Cell Mol. Immunol.* 2020, 17(6), 570–575, DOI: 10.1038/s41423-020-0457-0.
42. van Rijthoven M., Obahor S., Pagliarulo F., van den Broek M., Schraml P., Moch H., et al. Multi-resolution deep learning characterizes tertiary lymphoid structures and their prognostic relevance in solid tumors. *Commun. Med. (Lond).* 2024, 4(1), 5, DOI: 10.1038/s43856-023-00421-7.
43. Le Rochais M., Brahim I., Zeghlache R., Redoulez G., Guillard M., Le Noac’h P., et al. Automated classification of tertiary lymphoid structures in colorectal cancer using TLS-PAT artificial intelligence tool. *Sci. Rep.* 2025, 15(1), 9845, DOI: 10.1038/s41598-025-94664-0.
44. Tang Z., Bai Y., Fang Q., Yuan Y., Zeng Q., Chen S., et al. Spatial transcriptomics reveals tryptophan metabolism restricting maturation of intratumoral tertiary lymphoid structures. *Cancer Cell.* 2025, 43(6), 1025–1044.e14, DOI: 10.1016/j.ccell.2025.03.011.
45. Zhao Y., Ge X., He J., Cheng Y., Wang Z., Wang J., et al. The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer differs by anatomical subsite: a systematic review and meta-analysis. *World J. Surg. Oncol.* 2019, 17(1), 85, DOI: 10.1186/s12957-019-1621-9.
46. Nersesian S., Schwartz S. L., Grantham S. R., MacLean L. K., Lee S. N., Pugh-Toole M., et al. NK cell infiltration is associated with improved overall survival in solid cancers: A systematic review and meta-analysis. *Transl. Oncol.* 2021, 14(1), 100930, DOI: 10.1016/j.tranon.2020.100930.
47. Speiser D. E., Chijioke O., Schaeuble K., Münz C. CD4<sup>+</sup> T cells in cancer. *Nat Cancer.* 2023, 4(3), 317–329, DOI: 10.1038/s43018-023-00521-2.
48. Киселева Е. П., Кудрявцев И. В., Рубинштейн А. А., Старикова Э. А., Маммедова Д. Т., Нехаева Т. Л., и др. Особенности дифференцировки и поляризации Т-хелперов периферической крови у пациентов с первичной меланомой кожи. *Вопросы онкологии.* 2025, 71(4), 799–809, DOI: 10.37469/0507-3758-2025-71-4-OF-2436.
49. Dobrowolska-Szumowska A., Kamocki Z. K., Mierzejewska Ż. A. Integrating Blood-Based Immune-Inflammation Biomarkers into Artificial Intelligence—Driven Prognostic Models in Oncology. *Int. J. Mol. Sci.* 2026, 27(7), 3192, DOI: 10.3390/ijms27073192.

50. Gooden M. J. M., de Bock G. H., Leffers N., Nijman H. W. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br. J. Cancer*. 2011, 105(1), 93–103, DOI: 10.1038/bjc.2011.189.
51. Carrión-Barberà I., Lood C. Performance of the neutrophil-to-lymphocyte ratio as a prognostic tool for survival in solid cancers. *Front. Oncol.* 2025, 15, 1616477, DOI: 10.3389/fonc.2025.1616477.
52. Hamid H. K. S., Emile S. H., Davis G. N. Prognostic Significance of Lymphocyte-to-Monocyte and Platelet-to-Lymphocyte Ratio in Rectal Cancer: A Systematic Review, Meta-analysis, and Meta-regression. *Dis. Colon. Rectum*. 2022, 65(2), 178–187, DOI: 10.1097/DCR.0000000000002291.
53. Jin J., Yang L., Liu D., Li W. M. Prognostic Value of Pretreatment Lymphocyte-to-Monocyte Ratio in Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Technol. Cancer Res. Treat.* 2021, 20, 1533033820983085, DOI: 10.1177/1533033820983085.
54. Novik A. V., Emelianova N. V., Nekhaeva T. L., Pipia N. P., Zozulya A. Yu., Avdonkina N. A., et al. Prevalence of deviations of immunological parameters from reference values in patients with solid tumors. *Proceedings of the 6th St. Petersburg International Oncology Forum “White Nights 2020”*. St. Petersburg, 2020. 129.
55. Berraondo P., Sanmamed M. F., Ochoa M. C., Etcheberria I., Aznar M. A., Perez-Gracia J. L., et al. Cytokines in clinical cancer immunotherapy. *Br. J. Cancer*. 2019, 120(1), 6–15, DOI: 10.1038/S41416-018-0328-Y.
56. Wang M., Zhai X., Li J., Guan J., Xu S., Li Y., et al. The Role of Cytokines in Predicting the Response and Adverse Events Related to Immune Checkpoint Inhibitors. *Front. Immunol.* 2021, 12, 670391, DOI: 10.3389/fimmu.2021.670391.
57. Chen J., Tarantino G., Severgnini M., Baginska J., Giobbie-Hurder A., Weirather J. L. et al. Circulating cytokine associations with clinical outcomes in melanoma patients treated with combination nivolumab plus ipilimumab. *Oncoimmunology*. 2024, 14(1), 2432723, DOI: 10.1080/2162402X.2024.2432723.
58. Schalper K. A., Carleton M., Zhou M., Chen T., Feng Y., Huang S.-P., et al. Elevated serum interleukin-8 is associated with enhanced intratumor neutrophils and reduced clinical benefit of immune-checkpoint inhibitors. *Nat. Med.* 2020, 26(5), 688–692, DOI: 10.1038/s41591-020-0856-x.
59. Tobin R. P., Jordan K. R., Kapoor P., Sponberg E., Davis D., Vorwald V. M., et al. IL-6 and IL-8 Are Linked With Myeloid-Derived Suppressor Cell Accumulation and Correlate With Poor Clinical Outcomes in Melanoma Patients. *Front. Oncol.* 2019, 9, 1223, DOI: 10.3389/fonc.2019.01223.
60. Reschke R., Enk A. H., Hassel J. C. Chemokines and Cytokines in Immunotherapy of Melanoma and Other Tumors: From Biomarkers to Therapeutic Targets. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25(12), 6532, DOI: 10.3390/ijms25126532.
61. de Vries I. J. M., Bernsen M. R., Lesterhuis W. J., Scharenborg N. M., Strijk S. P., Gerritsen M. J. P., et al. Immunomonitoring tumor-specific T cells in delayed-type hypersensitivity skin biopsies after dendritic cell vaccination correlates with clinical outcome. *J. Clin. Oncol.* 2005, 23(24), 5779–5787, DOI: 10.1200/JCO.2005.06.478.
62. Wong C. E., Chang Y., Chen P.-W., Huang Y.-T., Chang Y.-C., Chiang C.-H., et al. Dendritic cell vaccine for glioblastoma: an updated meta-analysis and trial sequential analysis. *J. Neurooncol.* 2024, 170(2), 253–263, DOI: 10.1007/s11060-024-04798-w.
63. van ‘t Land F. R., Willemsen M., Bezemer K., van der Burg S. H., van den Bosch T. P. P., Doukas M., et al. Dendritic Cell-Based Immunotherapy in Patients With Resected Pancreatic Cancer. *J. Clin. Oncol.* 2024, 42(26), 3083–3093, DOI: 10.1200/JCO.23.02585.
64. McCune C. S., O'Donnell R. W., Marquis D. M., Sahasrabudhe D. M. Renal cell carcinoma treated by vaccines for active specific immunotherapy: Correlation of survival with skin testing by autologous tumor cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 1990, 32(1), 62–66, DOI: 10.1007/BF01741726.
65. Нехаева Т. Л., Савченко П. А., Новик А. В., Ефремова Н. А., Балдуева И. А. Оценка прогностического значения реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) при при-

менении аутологичной дендритно-клеточной вакцины у больных меланомой и саркомами мягких тканей. Вопросы онкологии. 2024, 70(6), 1077–1085, DOI: 10.37469/0507-3758-2024-70-6-1077-1085.

66. Kotsakis A., Vetsika E.-K., Christou S., Hatzidaki D., Vardakis N., Aggouraki D., et al. Clinical outcome of patients with various advanced cancer types vaccinated with an optimized cryptic human telomerase reverse transcriptase (TERT) pep-tide: results of an expanded phase II study. *Ann. Oncol.* 2012, 23(2), 442–449, DOI: 10.1093/annonc/mdr396.

67. Ogasawara M. Wilms' tumor 1 -targeting cancer vaccine: Recent advancements and future perspectives. *Hum. Vaccin Immunother.* 2024, 20(1), 2296735, DOI: 10.1080/21645515.2023.2296735.

68. Bol K. F., Schreibelt G., Rabold K., Wculek S. K., Schwarze J. K., Dzionek A., et al. The clinical application of cancer immunotherapy based on naturally circulating dendritic cells. *J. for Immunotherapy of Cancer.* 2019, 7, 109, DOI: 10.1186/s40425-019-0580-6.

69. Marino F. Z., Brunelli M., Rossi G., Calabrese G., Calì A., Nardiello P., et al. Multitarget fluorescence in situ hybridization diagnostic applications in solid and hematological tumors. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2021, 21(2), 161–173, DOI: 10.1080/14737159.2021.1887733.

70. Mishra H. K. The Applications of ELISpot in the Identification and Treatment of Various Forms of Tuberculosis and in the Cancer Immunotherapies. *Methods in molecular biology.* 2024, 2768, 51–58, DOI: 10.1007/978-1-0716-3690-9\_4.

71. Huang J., Ehrnfelt C., Paulie S., Zuber B., Ahlborg N. ELISpot and ELISA analyses of human IL-21-secreting cells: Impact of blocking IL-21 interaction with cellular receptors. *J. Immunol. Methods.* 2015, 417, 60–66, DOI: 10.1016/j.jim.2014.12.007.

72. Slota M., Lim J. B., Dang Y., Disis M. L. ELISpot for measuring human immune responses to vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2011, 10(3), 299–306, DOI: 10.1586/erv.10.169.

73. Lecoester B., Xie Y., Marguier A., Boulerot L., Malfroy M., Adotévi O., et al. Enzyme-linked ImmunoSpot (ELISpot) assay to quantify peptide-specific IFN- $\gamma$  production by splenocytes in a mouse tumor model after radiation therapy. *Methods Cell Biol.* 2024, 189, 41–54, DOI: 10.1016/bs.mcb.2024.07.001.

74. Mauthe A., Cedrone E., Villar-Hernández R., Rusch E., Springer M., Schuster M., et al. IFN- $\gamma$ /IL-2 Double-Color FluoroSpot Assay for Monitoring Human Primary T Cell Activation: Validation, Inter-Laboratory Comparison, and Recommendations for Clinical Studies. *AAPS J.* 2025, 27, 81, DOI: 10.1208/s12248-025-01072-3.

75. Rydzewski N. R., Peterson E., Lang J. M., Yu M., Chang S. L., Sjöström M., et al. Predicting Cancer Drug TARGETS-Treatment Response Generalized Elastic-Net Signatures. *NPJ Genom. Med.* 2021, 6(1), 76, DOI: 10.1038/s41525-021-00239-z.

76. Jou A. F.-J., Lu C.-H., Ou Y.-C., Wang S.-S., Hsu S.-L., Willner I., et al. Diagnosing the MiR-141 Prostate Cancer Biomarker Using Nucleic Acid-Functionalized CdSe/ZnS QDs and Telomerase. *Chem. Sci.* 2015, 6(1), 659–665, DOI: 10.1039/c4sc02104e.

77. Sina A. A. I., Carrascosa L. G., Liang Z., Grewal Y. S., Wardiana A., Shiddiky M. J. A., et al. Epigenetically Reprogrammed Methylation Landscape Drives the DNA Self-Assembly and Serves as a Universal Cancer Biomarker. *Nat. Commun.* 2018, 9(1), 4915, DOI: 10.1038/s41467-018-07214-w.

78. Chu Y., Gao Y., Tang W., Qiang L., Han Y., Gao J., et al. Attomolar-Level Ultrasensitive and Multiplex MicroRNA Detection Enabled by a Nanomaterial Locally Assembled Microfluidic Biochip for Cancer Diagnosis. *Anal. Chem.* 2021, 93(12), 5129–5136, DOI: 10.1021/acs.analchem.0c04896.

79. Zhang Q., Liu H., Xu Q., Liu H., Han Y., Li D.-L., et al. Construction of a 3D Quantum Dot Nanoassembly with Two-Step FRET for One-Step Sensing of Human Telomerase RNA in Breast Cancer Cells and Tissues. *Anal. Chem.* 2024, 96(19), 7738–7746, DOI: 10.1021/acs.analchem.4c01042.

80. Li C., He W., Wang N., Xi Z., Deng R., Liu X., et al. Application of Microfluidics in Detection of Circulating Tumor Cells. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022, 10, 907232, DOI: 10.3389/fbioe.2022.907232.

81. Malhotra R., Patel V., Chikkaveeraiah B. V., Munge B. S., Cheong S. C., Zain R. B., et al. Ultra-sensitive Detection of Cancer Biomarkers in the Clinic by Use of a Nanostructured Microfluidic Array. *Anal. Chem.* 2012, 84(14), 6249–6255, DOI: 10.1021/ac301392g.

## Об авторах

**Илья Владимирович Кравцов**, лаборант-исследователь, специалист отдела контроля качества, врач клинической лабораторной диагностики, НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова, Россия.

ORCID: 0009-0000-0307-5612

E-mail: iv.kravcov@yandex.ru

**Анастасия Сергеевна Сюткина**, лаборант-исследователь, НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова, Россия.

ORCID: 0009-0002-9866-2143

E-mail: S.5nastasia@yandex.ru

**Татьяна Леонидовна Нехаева**, кандидат медицинских наук, заведующий научным отделом онкоиммунологии, ведущий научный сотрудник, НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова, Россия.

ORCID: 0000-0002-7826-4861

E-mail: nehaevat151274@mail.ru

## The authors

**Ilya V. Kravtsov**, Research Laboratory Assistant, Quality Control Specialist, Clinical Laboratory Diagnostics Physician, N. N. Petrov National Research Institute of Oncology, the Ministry of Health of the Russian Federation, Russia.

ORCID: 0009-0000-0307-5612

E-mail: iv.kravcov@yandex.ru

**Anastasia S. Syutkina**, Research Laboratory Assistant, N. N. Petrov National Research Institute of Oncology, the Ministry of Health of the Russian Federation, Russia.

ORCID: 0009-0002-9866-2143

E-mail: S.5nastasia@yandex.ru

**Tatyana L. Nekhaeva**, PhD (Medicine), Head of the Department of Oncoimmunology Research, Leading Research Fellow, N. N. Petrov National Research Institute of Oncology, the Ministry of Health of the Russian Federation, Russia.

ORCID: 0000-0002-7826-4861

E-mail: nehaevat151274@mail.ru

Оригинальная исследовательская статья

## МОДУЛИРОВАНИЕ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ У МЫШЕЙ РАЗЛИЧНЫХ ЛИНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНТЕТИЧЕСКИХ ЛИГАНДОВ TLR9

Е. Д. Гаврилова<sup>1\*</sup>, Е. В. Гойман<sup>1</sup>, Е. Н. Демченко<sup>1</sup>,  
Е. В. Чуб<sup>2</sup>, Н. Н. Вольский<sup>1</sup>, В. А. Козлов<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт фундаментальной  
и клинической иммунологии,  
630099, Россия, Новосибирск

<sup>2</sup> Государственный научный центр вирусологии  
и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора,  
630559, Россия, Новосибирск

\* Автор-корреспондент: edav.gavr@mail.ru

### Для цитирования:

Гаврилова Е. Д.,  
Гойман Е. В., Демченко Е. Н.,  
Чуб Е. В., Вольский Н. Н.,  
Козлов В. А. Модулирование  
воспалительной реакции в экс-  
периментальных моделях у мышей  
различных линий с использовани-  
ем синтетических лигандов TLR9.  
*Современные направления в биомеди-  
цине.* 2026;2(1):89—100.  
<https://doi.org/10.5922/ATB-2026-2-1-6>

Поступила  
02.03.2026 г.  
Прошла рецензирование  
14.04.2026 г.  
Принята к печати  
16.04.2026 г.  
Опубликована  
09.09.2026 г.

© Гаврилова Е. Д., Гойман Е. В.,  
Демченко Е. Н., Чуб Е. В.,  
Вольский Н. Н., Козлов В. А., 2026  
© Оформление, БФУ им. И. Канта,  
2026

**Резюме:** Внеклеточная ДНК животных и человека обладает иммуномодулирующими свойствами и в основе механизма ее действия может лежать связывание с рецепторами распознавания образов, например TLR9. В результате активации этих рецепторов инициируется воспаление и увеличивается продукция провоспалительных цитокинов. Представляется актуальным изучение влияния активации TLR9-рецептора специфическим агонистом ODN 1826 на изменение уровней вкДНК и продукцию TNF-α в ответ на экзогенный провоспалительный стимул у мышей C57BL/6 и Balb/c, оппозитных линий — в ответ на развитие воспаления и продукцию TNF-α — в ответ на экзогенный провоспалительный стимул.

Установлено, что введение агониста рецептора TLR9 — олигонуклеотида ODN 1826 — увеличивает у мышей показатели интенсивности воспаления при введении LPS, характеризующиеся повышением концентрации TNFα и вкДНК в крови и уменьшением содержания вкДНК, ковалентно связанной с белками на поверхности клеток. На раннем этапе развития воспаления реакция мышей Balb/c на LPS качественно не отличалась от аналогичной реакции у мышей линии C57BL/6. Результаты дают основание предполагать, что способные активировать TLR9 препараты могут оказаться эффективными фармакологическими средствами при лечении иммунопатологических процессов, при которых требуется коррекция Th1/Th2-баланса.

**Ключевые слова:** внеклеточная ДНК, TLR9, олигонуклеотиды, воспаление, TNF-α, LPS

Original research article

## MODULATION OF THE INFLAMMATORY RESPONSE IN EXPERIMENTAL MODELS OF MICE OF DIFFERENT STRAINS USING SYNTHETIC TLR9 LIGANDS

E. D. Gavrilova<sup>1\*</sup>, E. V. Goiman<sup>1</sup>, E. N. Demchenko<sup>1</sup>,  
E. V. Chub<sup>2</sup>, N. N. Volsky<sup>1</sup>, V. A. Kozlov<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Federal State Budgetary Scientific Institution  
“Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology,”  
630099, Novosibirsk, Russia  
<sup>2</sup> Federal Budgetary Scientific Institution “State Research Center  
of Virology and Biotechnology ‘Vector’ of Rospotrebnadzor,”  
630559, Novosibirsk, Russia

\* Corresponding author: edav.gavr@mail.ru

### To cite this article:

Gavrilova E. D., Goiman E. V.,  
Demchenko E. N., Chub E. V.,  
Volsky N. N., Kozlov V. A. Modulation  
of the inflammatory response in  
experimental models of mice of  
different strains using synthetic  
TLR9 ligands. *Advanced Targets in  
Biomedicine*. 2026;2(1):89–100.  
<https://doi.org/10.5922/ATB-2026-2-1-6>

Received  
02.03.2026  
Revised  
14.04.2026  
Accepted  
16.04.2026  
Published  
09.09.2026

© Gavrilova E. D., Goiman E. V.,  
Demchenko E. N., Chub E. V.,  
Volsky N. N., Kozlov V. A., 2026  
© Design, IKBFU, 2026

**Abstract:** Cell-free DNA (cfDNA) from animals and humans possesses immunomodulatory properties, and the underlying mechanism of its action may involve binding to pattern recognition receptors such as TLR9. Activation of these receptors initiates inflammation and increases the production of proinflammatory cytokines. It is therefore relevant to study the effect of TLR9 receptor activation by the specific agonist ODN 1826 on changes in blood cfDNA levels and TNF- $\alpha$  production in response to an exogenous proinflammatory stimulus in C57BL/6 and Balb/c mice — strains known to differ in their response to the development of inflammation.

It was found that administration of the TLR9 receptor agonist ODN 1826 increased inflammation intensity in LPS-treated mice, as characterized by increased TNF- $\alpha$  and cfDNA concentrations in the blood and a decrease in the content of cfDNA covalently bound to proteins on the cell surface. At the early stage of inflammation development, the response of Balb/c mice to LPS was not qualitatively different from that of C57BL/6 mice.

These results suggest that agents capable of activating TLR9 may prove to be effective pharmacological tools for the treatment of immunopathological processes requiring correction of the Th1/Th2 balance.

**Keywords:** cell-free DNA, TLR9, oligonucleotides, inflammation, TNF- $\alpha$ , LPS

## Введение

Вклад в развитие и поддержание иммунного воспаления, патологической аутоиммунной реакции могут вносить общебиологические процессы (апоптоз, некроз), эпигенетическая регуляция [1–3]. На сегодняшний день существует достаточное количество исследований, которые свидетельствуют об изменениях содержания внеклеточной ДНК (вкДНК) в крови при определенных патологических процессах, а также об использовании этого показателя в качестве диагностического критерия при некоторых заболеваниях [1; 4–7]. Кроме того, в некоторых работах [8; 9] предполагается, что вкДНК животных и человека обладает иммуномодулирующими свойствами и в основе механизма ее действия может лежать связывание с рецепторами распознавания образов, например TLR9 [1]. Белки TLR9 входят в обширное семейство толл-подобных рецепторов (toll-like receptors), естественными лигандами которых являются определенные консервативные участки в молекулах патогенных бактерий и вирусов, объединяемых под названием патоген-ассоциированных молекулярных фрагментов [10]. Благодаря способности распознавать такие фрагменты белки этого семейства играют важную роль в создании первой линии защиты от инфекционных агентов, обеспечивая инициацию реакций врожденного иммунитета и развитие неспецифического воспаления при попадании в организм инфекционных агентов. Параллельно с этим TLR-белки способны активировать механизмы последующего специфического иммунного ответа на конкретные патогены, участвуя тем самым в регуляции направления и интенсивности иммунных реакций [10; 11].

TLR9 экспрессируются главным образом в клетках иммунной системы, таких как В-клетки, дендритные клетки и моноциты / макрофаги, и активируются в ответ на ДНК, содержащую неметилированные CpG-мотивы, которые характерны для бактериальной ДНК, участвуя в регуляции реакций врожденного противои инфекционного иммунитета [11–13]. При определенных условиях TLR9 могут распознавать и ауто-ДНК, в результате чего происходит активация этих рецепторов, инициируется воспаление и увеличивается продукция провоспалительных цитокинов [14]. Благодаря этому TLR9-белки могут принимать участие в развитии аутоиммунных реакций. Было обнаружено, что нокаут гена TLR9 у мышей с иммунокомплексным люпус-подобным нефритом приводит к значительному усилению проявлений болезни, в то время как гиперэкспрессия этого гена в В-клетках заметно тормозит развитие нефрита [15].

Исходя из представленных данных, представлялось актуальным изучить влияние активации TLR9 специфическим агонистом ODN 1826 на изменения уровней вкДНК в крови мышей и продукцию TNF- $\alpha$  в ответ на экзогенный провоспалительный стимул, а также выяснить возможность модуляции экспрессии гена TLR9 в клетках иммунной системы синтетическими лигандами этого рецептора, в том числе вкДНК крови, уровень которой существенно возрастает в ранней фазе воспалительного ответа.

Следует иметь в виду, что иммунная система контролирует развитие и интенсивность воспалительных реакций, так что сдвиг баланса хелперов в сторону Th1-лимфоцитов, продуцирующих провоспалительные цитокины, является постоянным элементом реакций организма на индуцирующие воспаление внешние воздействия [16].

В связи с этим естественно ожидать, что во многих случаях изменение уровня вкДНК в крови может быть значимо связано с величиной Th1/Th2-соотношения в организме, что во многом определяет патогенез воспалительных процессов при различных заболеваниях.

## Материалы и методы

### Объекты исследования

В качестве экспериментальных животных были выбраны линии мышей C57BL/6 и Balb/c, оппозитных, как известно из данных литературы [17], в отношении ответа на развитие воспаления. В опыты были включены здоровые половозрелые 6–8-недель-

ные мыши, содержащиеся в виварии в условиях, соответствующих требованиям эксперимента. Животные получали гранулированный комбикорм, сбалансированный по потребностям в белках, жирах, углеводах, витаминах, минеральных веществах и микроэлементах в рациональных дозах (ГОСТ Р 50258-92). Все эксперименты проводили в стандартных условиях содержания животных, соблюдения температурного режима, освещенности. В работе использовали самок мышей линий C57BL/6 и Balb/c (виварий, г. Томск). Экспериментальные исследования выполнены в полном соответствии с требованиями Международной конвенции по гуманному обращению с подопытными животными (Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (г. Страсбург, 1986) и Директивой № 2010/63/ЕС Европейского парламента и совета ЕС о защите животных, использующихся для научных целей (г. Страсбург, 2010). Исследование на экспериментальных животных одобрено локальным этическим комитетом НИИФКИ (протокол № 92 от 10.11.2015).

Мыши каждой из исследуемых линий были разделены на четыре группы (по 6 животных):

- 1-я — интактные мыши;
- 2-я — животные с воспалительной реакцией, вызванной введением LPS (контроль);
- 3-я — мыши, которым помимо LPS был введен специфический лиганд TLR9 — ODN 1826, содержащий в своей структуре два CpG-динуклеотида;
- 4-я — мыши, которым помимо LPS был введен другой лиганд TLR9 — ODN 1982, где CpG-динуклеотиды отсутствуют.

Всем животным экспериментальных групп (группы 2—4) однократно внутрибрюшинно вводили LPS *E. coli* штамма 111:B4 (Sigma, США) в дозе 1 мкг/мышь. Животным, входящим в группу 1, вводился соответствующий объем PBS. Мышам в группах 3 и 4 двукратно до инъекции липополисахарида (LPS) подкожно 2 раза с интервалом в два дня вводили ODN 1826 или в качестве контроля ODN 1982 в дозе 25 мкг/мышь. Через 4 ч после введения LPS мышей забивали, забирали у них кровь для последующих исследований.

### Методы исследования

Выделение и количественное определение вкДНК проводили согласно методике [18]. Кровь собирали в пробирки, содержащие 3×PBS (PBS — 10 mM фосфатный буфер pH 7,4, 0,15 M NaCl) и 15 mM ЭДТА в качестве антикоагулянта. Плазму отделяли центрифугированием при 400 g в течение 20 мин. К осажденным клеткам добавляли девятикратный объем PBS с 5 mM ЭДТА, супернатант отделяли центрифугированием при 400 g в течение 20 мин. Для определения вкДНК, связанной с клеточной поверхностью, клетки инкубировали 5 мин с 0,25%-ным раствором трипсина, реакцию останавливали добавлением ингибитора трипсина из соевых бобов (Sigma, США) и центрифугированием отделяли супернатант, содержащий вкДНК. Выделение ДНК из полученных фракций проводили на колонках компании «БиоСилика» (Новосибирск) согласно прилагаемой инструкции. Определение ДНК осуществляли с помощью флюоресцентного красителя PicoGreen (Invitrogen, США). ДНК рассчитывалась по калибровочной кривой, построенной для известных концентраций стандартной двухцепочечной  $\lambda$  ДНК.

Количество TNF $\alpha$  в сыворотке крови мышей определяли иммуноферментным методом с помощью набора Mouse TNF-alpha Quantikine ELISA kit (R&D Systems, Inc, США).

Определение количества мРНК гена TLR9 осуществлялось методом ПЦР в режиме «реального времени» на приборе CFX96 Thermal Cycler (Bio-Rad, США).

### Статистическая обработка

Результаты в таблицах и на рисунках приведены в виде средних величин. Достоверность выявленных различий и величину связей между измеренными па-

раметрами оценивали методом непараметрической статистики с использованием U-критерия Манна — Уитни. Различия между группами считались статистически значимыми при достигнутом уровне  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждения

### Оценка влияния синтетических лигандов TLR9 на развитие воспалительной реакции у мышей линий C57BL/6 и Balb/c

В задачу исследования входила оценка уровня вкДНК и продукции TNF $\alpha$  у интактных и LPS-стимулированных экспериментальных животных и изучение влияние олигонуклеотида ODN 1826 (агониста TLR9) на уровень вкДНК и синтез TNF $\alpha$  у мышей линий C57BL/6 и Balb/c.

В ранее проведенных исследованиях [19–21] нами было обнаружено, что концентрация вкДНК в плазме крови существенно увеличивается при ответе на небольшую дозу LPS и, следовательно, этот параметр может служить одним из показателей интенсивности воспалительных процессов в организме. Такой хорошо согласующийся с имеющимися литературными данными вывод был сделан нами на основании результатов экспериментов, проведенных на других линиях мышей. Результаты настоящего исследования на мышах C57BL/6 и Balb/c свидетельствуют, что повышение уровней вкДНК в плазме крови на ранней стадии развития воспалительных реакций наблюдается у животных этих линий (графа 1 в таблицах 1 и 2). Этот показатель хорошо коррелировал с повышением уровня TNF-а в ответ на воспалительный стимул как у мышей C57BL/6 ( $p = 0,51$ ,  $p < 0,05$ ), так и у Balb/c ( $p = 0,44$ ,  $p < 0,05$ ).

Таблица 1

#### Влияние лигандов рецептора TLR9 на показатели LPS-стимулированного воспалительного ответа у мышей линии C57BL/6

Table 1

#### The effect of TLR9 receptor ligands on LPS-stimulated inflammatory response in C57BL/6 mice

| Группа             | Внеклеточная ДНК, нг/мл |     |      | Соотношение «вкДНК, связанная с поверхностью клеток / суммарная вкДНК» | N/L    | TNF-а, пг/мл |
|--------------------|-------------------------|-----|------|------------------------------------------------------------------------|--------|--------------|
|                    | 1                       | 2   | 3    |                                                                        |        |              |
| 1. Интактные мыши  | 25                      | 255 | 3302 | 0,9                                                                    | 0,17   | 12,49        |
| 2. +LPS            | 249                     | 86* | 1412 | 0,83                                                                   | 0,46** | 174,4**      |
| 3. +ODN 1826 + LPS | 852                     | 137 | 1367 | 0,64                                                                   | 0,33   | 476,1##      |
| 4. +ODN 1982 + LPS | 436                     | 151 | 827# | 0,6#                                                                   | 0,42   | 217,7        |

*Примечание.* Обозначения фракций вкДНК в столбце «Внеклеточная ДНК»: 1 — плазма; 2 — буфер; 3 — вкДНК, связанная с поверхностью клеток; N/L — соотношение «нейтрофилы / лимфоциты» в крови.

Достоверное отличие от группы 1 (контроль): \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$ .

Достоверное отличие от группы 2 (+LPS): # —  $p < 0,05$ ; ## —  $p < 0,01$ .

*Note:* Designations of cfDNA fractions in the “Cell-Free DNA” column: 1 — plasma; 2 — buffer; 3 — cell-surface-bound cfDNA; N/L — neutrophil / lymphocyte ratio in the blood.

Significant difference from group 1 (control): \* —  $p < 0.05$ ; \*\* —  $p < 0.01$ .

Significant difference from group 2 (+LPS): # —  $p < 0.05$ ; ## —  $p < 0.01$ .

Другим значимым следствием развития в организме животных воспалительной реакции можно считать снижение количества вкДНК, ковалентно связанной с белками на поверхности клеток крови, и, соответственно, уменьшение соотношения «вкДНК, связанная с поверхностью клеток / суммарная вкДНК», что видно из результатов, представленных в таблицах 1, 2. При этом у линии Balb/c эти изменения достоверны (табл. 2).

Таблица 2

**Влияние лигандов рецептора TLR9 на показатели LPS-стимулированного воспалительного ответа у мышей линии Balb/c**

Table 2

**The effect of TLR9 receptor ligands on LPS-stimulated inflammatory response in Balb/c mice**

| Группа             | Внеклеточная ДНК, нг/мл |                  |       | Соотношение «вкДНК, связанная с поверхностью клеток / суммарная вкДНК» | N/L               | TNF-a, пг/мл |
|--------------------|-------------------------|------------------|-------|------------------------------------------------------------------------|-------------------|--------------|
|                    | 1                       | 2                | 3     |                                                                        |                   |              |
| 1. Интактные мыши  | 39                      | 140              | 4807  | 0,96                                                                   | 0,6               | 21,9         |
| 2. +LPS            | 491**                   | 142              | 2501* | 0,8**                                                                  | 0,29              | 690,3**      |
| 3. +ODN 1826 + LPS | 1601 <sup>#</sup>       | 421 <sup>#</sup> | 3119  | 0,61 <sup>#</sup>                                                      | 0,16 <sup>#</sup> | 1458,1       |
| 4. +ODN 1982 + LPS | 767                     | 126              | 1532  | 0,63 <sup>#</sup>                                                      | 0,35              | 352,5        |

*Примечание.* Обозначения фракций вкДНК в столбце «Внеклеточная ДНК»: 1 — плазма; 2 — буфер; 3 — вкДНК, связанная с поверхностью клеток; N/L — соотношение «нейтрофилы / лимфоциты» в крови.

Достоверное отличие от группы 1 (контроль): \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$ .

Достоверное отличие от группы 2 (+LPS): # —  $p < 0,05$ ; ## —  $p < 0,01$ .

*Note:* Designations of cfDNA fractions in the “Cell-Free DNA” column: 1 — plasma; 2 — buffer; 3 — cell-surface-bound cfDNA; N/L — neutrophil/lymphocyte ratio in the blood.

Significant difference from group 1 (control): \* —  $p < 0.05$ ; \*\* —  $p < 0.01$ .

Significant difference from group 2 (+LPS): # —  $p < 0.05$ ; ## —  $p < 0.01$ .

В данной работе было исследовано влияние на вышеуказанные параметры двух лигандов TLR9: олигонуклеотида ODN 1826, содержащего в своей структуре два CpG-динуклеотида, что должно обеспечивать выраженную активацию TLR9, и олигонуклеотида ODN 1982, в котором CpG-динуклеотиды отсутствуют. Оба использованных препарата представляли собой фосфотиоатные производные соответствующих олигонуклеотидов, что обеспечивает их устойчивость к разрушению эндогенными нуклеазами [22].

Из приведенных в таблицах 1, 2 данных видно, что ODN 1826 — агонист TLR9 — существенно увеличивает интенсивность воспалительного ответа на LPS, оцениваемую с помощью исследованных нами параметров (уровни TNF-a и вкДНК в плазме, уровень связанной с поверхностью клеток вкДНК и отношение связанной с поверхностью клеток вкДНК к суммарной вкДНК). Это согласуется с имеющимися литературными данными и может быть истолковано, как способность активированного TLR9 влиять на Th1/Th2-соотношение, сдвигая этот баланс в провоспалительную сторону. Из работ других авторов известно, что агонисты этого рецептора могут стимулировать продукцию IL-12 дендритными клетками [23] и подавлять Th2-зависимые иммунные реакции при аллергии [24] и аутоиммунных процессах [10; 25].

Не содержащий CpG олигонуклеотид (ODN 1982) не воздействовал на показатели воспалительной реакции, такие как уровень TNF-a и количество вкДНК в плазме у мы-

шей обеих линий. Однако фракция вкДНК, связанной с поверхностью клеток, значительно снижена, что приводит к изменению индекса, то есть соотношения этой фракции к общему количеству вкДНК, что может косвенно свидетельствовать о том, что не только фрагменты ДНК, богатые неметилированными CpG-динуклеотидами, могут быть лигандами TLR9. При этом нельзя исключать и другие потенциальные механизмы активации или блокировки данного рецептора, что, конечно, требует дополнительных исследований.

Выявленные нами изменения параметров воспалительного ответа у мышей исследованных линий не позволяют охарактеризовать мышей Balb/c как генетически предрасположенных к иному варианту ответа на воспалительные стимулы, нежели наблюдаемый у мышей линии C57BL/6. Следует отметить, что у мышей Balb/c, даже у интактных животных, уровни TNF- $\alpha$  и вкДНК в плазме почти в два раза выше, чем у мышей C57BL/6 (табл. 1, 2), тогда как на фоне воспалительной реакции и под действием ODN 1826 эти показатели в группах 2 и 3 у линии Balb/c выше в 3–4 раза, чем у C57BL/6. Можно предположить, что различия ответа на активацию TLR9 проявляются в силе реакции, а не в разнонаправленности эффектов. В обеих линиях наблюдается значительное снижение содержания вкДНК, ковалентно связанной с белками на поверхности клеток, и, соответственно, уменьшение соотношения «вкДНК, связанная с поверхностью клеток / суммарная вкДНК», что видно из результатов соотношения «трипсин / суммарная вкДНК» (табл. 1, 2).

В качественном отношении выявленные изменения оцениваемых параметров сходны у обеих линий мышей, то есть различия ответа на активацию TLR9 проявляются не в разнонаправленности действия, как предполагалось изначально, а в выраженности реакции.

Этот вывод формально противоречит известной оппозиции указанных линий в отношении иммунного ответа на Т-зависимые антигены (у Balb/c выше Th2-зависимый гуморальный ответ, в то время как у C57BL/6 выше Th1-зависимая реакция ГЗТ) и результатам недавней работы группы китайских авторов [17]. В их исследовании было установлено, что при развитии воспалительного процесса концентрация вкДНК в плазме крови мышей Balb/c, измеряемая в течение нескольких дней после заражения животных, заметно ниже, чем у C57BL/6 при аналогичных условиях эксперимента. В нашей работе такое отличие не наблюдалось и даже интенсивность ответа на LPS у Balb/c была несколько выше, чем у C57BL/6. Однако на деле между полученными нами и литературными данными нет реального противоречия, поскольку, во-первых, в цитируемой работе речь идет о тяжелом септическом процессе с гибелью почти всех экспериментальных животных, в то время как в ранее выполненных нами экспериментах вызванное LPS-воспаление имело умеренную интенсивность с возвращением всех показателей к исходному уровню через 24 ч после введения липополисахарида [20]. Во-вторых, и это главное, как было показано в исследовании китайских авторов, в первые сутки после заражения постепенное увеличение концентрации вкДНК в крови происходит совершенно одинаково у обеих исследованных линий мышей [17], что полностью совпадает с результатами нашей работы.

Следует предполагать, что величина и направление конкретных изменений в организме этих животных при дальнейшем развитии воспаления обусловлены совокупным действием многих регуляторных факторов, одним из которых может быть степень экспрессии TLR9 у мышей различных линий и его активации при различных воздействиях.

Результаты проведенных экспериментов и данные литературы дают основание предполагать, что способные активировать TLR9 препараты бактериальной ДНК и синтетические лиганды этого рецептора (со свойствами как его агонистов, так и антагонистов) могут оказаться эффективными фармакологическими средствами при лечении иммунопатологических процессов, при которых требуется коррекция Th1/Th2-баланса. Выяснение их терапевтических возможностей представляется актуальной задачей дальнейших исследований.

## Оценка экспрессии гена TLR9 у мышей различных линий при воздействии синтетических лигандов этого рецептора

После изучения эффектов синтетических лигандов TLR9 на развитие воспаления в экспериментальной модели и выяснения того факта, что уровни вкДНК и TNF $\alpha$  в крови мышей — как C57BL/6 (Th1), так и Balb/c (Th2) — существенно зависят от воздействия на TLR9, было исследовано влияние этих лигандов на экспрессию гена TLR9 (количество мРНК TLR9) и сделана попытка выявить взаимосвязь этого процесса с уровнем вкДНК при разных типах иммунологического ответа Th1 и Th2 у мышей линии C57BL/6 и Balb/c.

Данные, полученные в экспериментах, в которых изучалось возможное влияние лигандов TLR9 на экспрессию гена TLR9 в спленоцитах мышей двух оппозитных линий, представлены в таблице 3.

Таблица 3

**Изменения уровней мРНК гена TLR9 в спленоцитах мышей линий Balb/c и C57BL/6 под влиянием LPS и лигандов данного рецептора**

Table 3

**Changes in TLR9 mRNA levels in splenocytes of Balb/c and C57BL/6 mice under the influence of LPS and ligands of this receptor**

| Группа                     | Уровень мРНК, усл. ед.             |                                     |
|----------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
|                            | Balb/c                             | C57BL/6                             |
| 1. Контроль (n = 6)        | 0,96 $\pm$ 0,12                    | 1,30 $\pm$ 0,26                     |
| 2. +LPS (n = 6)            | 1,21 $\pm$ 0,09 (26 % $\uparrow$ ) | 1,69 $\pm$ 0,27 (30 % $\uparrow$ )  |
| 3. +ODN 1826 + LPS (n = 6) | 1,29 $\pm$ 0,07 (34 % $\uparrow$ ) | 1,23 $\pm$ 0,19 (5 % $\downarrow$ ) |
| 4. +ODN 1982 + LPS (n = 5) | 2,35 $\pm$ 0,54 ( $\geq 2$ раза)   | 1,49 $\pm$ 0,28 (15 % $\uparrow$ )  |

Примечание: % $\uparrow\downarrow$  — относительно контрольных групп соответствующих линий мышей.

Note: % $\uparrow\downarrow$  — relative to the control groups of the corresponding mouse strains.

Отличия между исследованными группами, которые представлены в таблице 3, не позволяют считать, что использованные нами искусственные лиганды могут существенно влиять на транскрипцию мРНК TLR9 в иммунокомпетентных клетках (спленоцитах), так как изменения недостоверны. То же можно сказать и о соответствующем влиянии вкДНК на этот параметр (по крайней мере в ранней фазе воспалительного ответа на введение LPS, когда уровень вкДНК в крови существенно возрастает).

Следовательно, наблюдаемые эффекты лигандов TLR9 на развитие воспалительной реакции нельзя объяснить изменениями количества мРНК этого рецептора, а, видимо, можно связать с активацией уже существующих TLR9. Этот факт, разумеется, не исключает возможности влияния лигандов данного рецептора (в том числе и вкДНК крови) на его экспрессию в более поздние периоды после их воздействия. Однако проверка такого предположения требует проведения специальных экспериментов.

## Заключение

В экспериментах на мышах линий Balb/c и C57BL/6 продемонстрирована возможность модулирования воспалительной реакции в ответ на LPS с использованием синтетических лигандов рецептора TLR9. Введение агониста TLR9 — ODN 1826 — увеличивало у мышей показатели интенсивности воспаления при введении LPS, харак-

теризующиеся повышением концентрации TNF $\alpha$  и вкДНК в крови животных и уменьшением содержания вкДНК, ковалентно связанной с белками на поверхности клеток. Не содержащий CpG олигонуклеотид ODN 1982 в меньшей степени воздействовал на показатели воспалительной реакции. На раннем этапе развития воспаления реакция мышей Balb/c на LPS качественно не отличалась от аналогичной реакции у мышей линии C57BL/6. Результаты проведенных экспериментов и данные литературы дают основание предполагать, что способные активировать TLR9 препараты бактериальной ДНК и синтетические лиганды этого рецептора (со свойствами как его агонистов, так и антагонистов) могут оказаться эффективными фармакологическими средствами при лечении иммунопатологических процессов, при которых требуется коррекция Th1/Th2-баланса. Исследование их терапевтических возможностей представляется актуальным и перспективным направлением.

В то же время обнаружено, что лиганды TLR9 (как синтетические лиганды, так и вкДНК плазмы крови, уровень которой существенно возрастает после стимуляции острой воспалительной реакции у этих животных) не приводят к достоверным изменениям экспрессии гена TLR9 в спленоцитах мышей, по крайней мере в ранней фазе воспалительного ответа на введение LPS. Однако не исключается возможность влияния лигандов данного рецептора (в том числе и вкДНК крови) на экспрессию гена TLR9 в более поздние периоды после их воздействия.

**Финансирование.** Исследование проведено за счет средств федерального бюджета для выполнения государственного задания на научно-исследовательскую работу (ПК № 124112700049-9).

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи. Все соавторы одобрили окончательную версию рукописи и принимают ответственность за все аспекты работы, включая корректное изучение и урегулирование вопросов, относящихся к точности и добросовестности представленных данных.

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Наибольший вклад распределен следующим образом:

**Е. Д. Гаврилова** — концепция и дизайн исследования, написание черновика текста статьи, анализ и обсуждение данных, редактирование статьи;

**Е. В. Гойман** — сбор и обработка биологического материала, оформление ссылок и таблиц;

**Е. Н. Демченко** — сбор и обработка биологического материала, обсуждение материалов;

**Е. В. Чуб** — определение количества мРНК гена TLR9 методом ПЦР;

**Н. Н. Вольский** — статистическая обработка и анализ результатов;

**В. А. Козлов** — концепция исследования, привлечение финансирования.

**Funding.** The study was conducted using federal budget funds to fulfill the state assignment for scientific research work (№ 124112700049-9).

**Conflict of Interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article. All authors approved the final version of the manuscript and take responsibility for all aspects of the work, including ensuring that any questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

**Authors' contribution.** All authors confirm that their authorship complies with the international ICMJE criteria (all authors made a significant contribution to the concept development, conduct of the study, and preparation of the article, and read and approved the final version before publication). The major contributions were distributed as follows:

**E. D. Gavrilova** — study concept and design, drafting the article, data analysis and discussion, and editing;

**E. V. Goiman** — collection and processing of biological material, references and table preparation;

**E. N. Demchenko** — collection and processing of biological material, discussion of materials;  
**E. V. Chub** — determination of the TLR9 gene mRNA quantity by PCR;  
**N. N. Volskiy** — statistical processing and analysis of results;  
**V. A. Kozlov** — conceptualization, funding acquisition.

## Список литературы

1. Ferrera F., Altosole T., Tardito S., Astone G., Bernardi C., Parodi A., et al. Immunoregulatory properties of cell free DNA. *Cell Mol. Life Sci.* 2025, 82(1), 320, DOI: 10.1007/s00018-025-05862-y.
2. Wang Y., Du C., Zhang Y., Zhu L. Composition and function of neutrophil extracellular Traps. *Biomolecules.* 2024, 14(4), 416, DOI: 10.3390/biom14040416.
3. Singhal A., Kumar S. Neutrophil and remnant clearance in immunity and inflammation. // *Immunology.* 2022, 165, 22—43, DOI: 10.1111/imm.13423.
4. Múzes G., Bohusné Barta B., Szabó O., Horgas V., Sipos F. Cell-Free DNA in the Pathogenesis and Therapy of Non-Infectious Inflammations and Tumors. *Biomedicines*, 2022, 10(11), 2853, DOI: 10.3390/biomedicines10112853.
5. Zhang Y., Liu Z., Ji K., Li X., Wang C., Ren Z., et al. Clinical Application Value of Circulating Cell-free DNA in Hepatocellular Carcinoma. *Front. Mol. Biosci.* 2021, 8, 736330, DOI: 10.3389/fmolb.2021.736330.
6. Смирнова С. Ю., Никулина Е. Е., Габеева Н. Г., Королева Д. А., Татарникова С. А., Смолянинова А. К., и др. Свободно циркулирующая ДНК в плазме у пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой и В-клеточной лимфомой высокой степени злокачественности ('double hit'/'triple hit'). *Клиническая онкогематология.* 2023, 16(2), 200—208, DOI: 10.21320/2500-2139-2023-16-2-200-208.
7. Киреева В. В., Лепехова С. А., Иноземцев П. О., Усольце Ю. К., Трофимова Е. А. Роль митохондриальной ДНК в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний. *Казанский медицинский журнал.* 2022, 103(3), 455—466, DOI: 10.17816/KMJ2022-455.
8. McCarthy C. G., Wenceslau C. F., Gouloupoulou S., Ogbi S., Baban B., Sullivan J. C., et al. Circulating mitochondrial DNA and Toll-like receptor 9 are associated with vascular dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc. Res.*, 2015, 107(1), 119—130, DOI: 10.1093/cvr/cvv137.
9. Brynychova I., Zinkova A., Hoffmanova I., Korabecna M., Dankova P. Immunoregulatory properties of cell-free DNA in plasma of celiac disease patients — A pilot study. *Autoimmunity*, 2019, 52(2), 88—94, DOI: 10.1080/08916934.2019.1608965.
10. Saber M. M., Monir N., Awad A. S., Elsherbiny M. E., Zaki H. F. TLR9: A friend or a foe. *Life Sci.* 2022, 307, 120874, DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120874.
11. Okude H., Ori D., Kawai T. Signaling Through Nucleic Acid Sensors and Their Roles in Inflammatory Diseases. *Front. Immunol.*, 2021, 11, 625833, DOI: 10.3389/fimmu.2020.625833.
12. Liu H., Ji Y., Ma X., He A., Zhao W., Zhang P., et al. Effects of CpG oligodeoxynucleotides on the differentiation of Treg/ Th17 cells. *Molecular Immunology.* 2021, 132, 199—208, DOI: 10.1016/j.molimm.2021.01.003.
13. Qu Y., Jiang Z., Chen Z., Luo S., Xie B., Wu X., et al. CpG-oligodeoxynucleotides challenged macrophages ameliorate acetaminophen induced liver injury by activating TLR9/IRG1/ itaconate metabolic pathway. *Molecular Medicine*, 2025, 31(1), 282, DOI: 10.1186/s10020-025-01324-0.
14. Lamphier M. S., Sirois C. M., Verma A., Golenbock D. T., Latz E. TLR9 and the recognition of self and non-self nucleic acids. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006, 1082(1), 31—43, DOI: 10.1196/annals.1348.005.
15. Tilstra J. S., John S., Gordon R. A., Leibler C., Kashgarian M., Bastacky S., et al. B cell-intrinsic TLR9 expression is protective in murine lupus. *J. Clin. Invest.* 2020, 130(6), 3172—3187, DOI: 10.1172/JCI132328.

16. You K., Gu H., Yuan Z., Xu X. Tumor Necrosis Factor Alpha Signaling and Organogenesis. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021, 9, 727075, DOI: 10.3389/fcell.2021.727075.
17. Xin Y., Gao X., Wang W., Xu X., Yu L., Ju X., et al. Circulating cell-free DNA indicates M1/M2 responses during septic peritonitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016, 477(4), 589–594, DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.06.092.
18. Tamkovich S. N., Litviakov N., Bryzgunova O. E., Dobrodeev A. Yu., Rykova E. Y., Tuzikov S. A., et al. Cell-Surface-Bound Circulating DNA as a Prognostic Factor in Lung Cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008, 1137, 214–217, DOI: 10.1196/annals.1448.042.
19. Демченко Е. Н., Гаврилова Е. Д., Гойман Е. В., Вольский Н. Н., Козлов В. А. Динамика уровня внеклеточной ДНК в ЛПС-индуцированной модели воспаления *in vivo*. Российский иммунологический журнал. 2022, 25(4), 423–430, DOI: 46235/1028-7221-1179-DOC.
20. Демченко Е. Н., Гаврилова Е. Д., Гойман Е. В., Вольский Н. Н., Колесникова О. П., Козлов В. А. Внеклеточная ДНК в крови как показатель воспалительной реакции *in vivo*. Медицинская иммунология. 2022, 24(4), 853–860, DOI: 10.15789/1563-0625-EDI-2504.
21. Demchenko E. N., Gavrilova E. D., Goiman E. V., Volsky N. N. Fatty acid receptor GPR84 and Th1/Th2 balance in the experimental system *in vivo*. *Medical Immunology (Russia)*. 2021, 23(4), 659–664, DOI: 10.15789/1563-0625-FAR-2235.
22. Gavrilova E. D., Goiman E. V., Derzhalova A. S., Stetsenko D. A., Burakova E. A. Effects of Immunosuppressive Oligonucleotides A151, ODN4084-F, and  $\mu$ -ODN4084-F on Mitigation of Acute Graft-Versus-Host Disease in Experimental Model. *Cytokines and inflammation*. 2024, 21(3), 135–143, DOI: 10.17816/CI642255.
23. Jakob T., Walker P. S., Krieg A. M., Udey M. C., Vogel J. C. Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J. Immunol.* 1998, 161(6), 3042–3049.
24. Hayashi T., Beck L., Rossetto C., Gong X., Takikawa O., Takabayashi K., et al. Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* 2004, 114(2), 270–279, DOI: 10.1172/JCI21275.
25. Christensen S. R., Shupe J., Nickerson K., Kashgarian M., Flavell R. A., Shlomchik M. J. Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity*. 2006, 25(3), 417–428, DOI: 10.1016/j.immuni.2006.07.013.

## Об авторах

**Елена Давидовна Гаврилова**, кандидат биологических наук, ученый секретарь НИИФКИ, заведующая Лабораторией экспериментальной иммунотерапии, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Россия.

ORCID: 0000-0002-2014-3397

E-mail: edav.gavr@mail.ru

**Елена Владимировна Гойман**, кандидат медицинских наук, научный сотрудник Лаборатории экспериментальной иммунотерапии, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Россия.

ORCID: 0000-0002-6443-6917

E-mail: l.goiman@mail.ru

**Елена Николаевна Демченко**, кандидат химических наук, научный сотрудник Лаборатории экспериментальной иммунотерапии, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Россия.

ORCID: 0009-0001-5178-5616

E-mail: elena.demchenko@gmail.com

**Елена Владимировна Чуб**, кандидат биологических наук, заведующая отделом — начальник экспериментального участка отдела разработки и производства средств диагностики вирусных заболеваний, Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Россия.

ORCID: 0000-0003-1521-897X

E-mail: chub.e.v@yandex.ru

**Николай Николаевич Вольский**, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник Лаборатории экспериментальной иммунотерапии, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Россия.

ORCID: 0000-0002-9341-1997

E-mail: dttheory@yandex.ru

**Владимир Александрович Козлов**, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, научный руководитель НИИФКИ, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Россия.

ORCID: 0000-0002-1756-1782

E-mail: vakoz40@yandex.ru

## The authors

**Elena D. Gavrilova**, PhD (Biology), Scientific Secretary, Head of the Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Russia.

ORCID: 0000-0002-2014-3397

E-mail: edav.gavr@mail.ru

**Elena V. Goiman**, PhD (Medicine), Researcher, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Russia.

ORCID: 0000-0002-6443-6917

E-mail: l.goiman@mail.ru

**Elena N. Demchenko**, PhD (Chemistry), Researcher, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Russia.

ORCID: 0009-0001-5178-5616

E-mail: elena.demchenko@gmail.com

**Elena V. Chub**, PhD (Biology), Head of Department — Head of the Experimental Section, Department for the Development and Production of Viral Disease Diagnostics, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector” of Rospotrebnadzor, Russia.

ORCID: 0000-0003-1521-897X

E-mail: chub.e.v@yandex.ru

**Nikolai N. Volskiy**, PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Russia.

ORCID: 0000-0002-9341-1997

E-mail: dttheory@yandex.ru

**Vladimir A. Kozlov**, Academician of the Russian Academy of Sciences, Dr. habil. (Medicine), Professor, Scientific Director, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Russia.

ORCID: 0000-0002-1756-1782

E-mail: vakoz40@yandex.ru

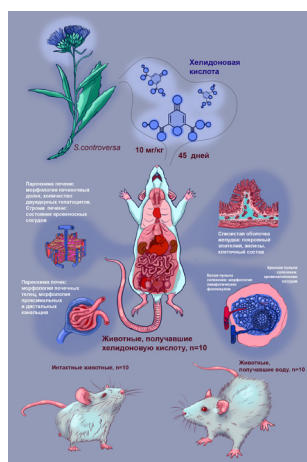
Оригинальная исследовательская статья

## ВЛИЯНИЕ ХЕЛИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

А. В. Горохова, Т. Ф. Насибов, А. Ю. Рыжкова,  
А. В. Лешенкова, Е. Д. Порохова, А. Н. Дзюман,  
Е. Ю. Авдеева, М. В. Белоусов, И. А. Хлусов\*

Сибирский государственный медицинский университет,  
634050, Томск, Россия

\* Автор-корреспондент: khlusov63@mail.ru



### Для цитирования:

Горохова А. В., Насибов Т. Ф.,  
Рыжкова А. Ю., Лешенкова А. В.,  
Порохова Е. Д., Дзюман А. Н.,  
Авдеева Е. Ю., Белоусов М. В.,  
Хлусов И. А. Влияние хелидоновой  
кислоты природного происхожде-  
ния на морфофункциональное  
состояние внутренних органов в экс-  
перименте. *Современные направления  
в биомедицине*. 2026;2(1):101–123.  
<https://doi.org/10.5922/ATB-2026-2-1-7>

Поступила  
05.03.2026 г.  
Прошла рецензирование  
16.04.2026 г.  
Принята к печати  
17.04.2026 г.  
Опубликована  
09.09.2026 г.

© Горохова А. В., Насибов Т. Ф.,  
Рыжкова А. Ю., Лешенкова А. В.,  
Порохова Е. Д., Дзюман А. Н.,  
Авдеева Е. Ю., Белоусов М. В.,  
Хлусов И. А., 2026  
© Оформление, БФУ им. И. Канта,  
2026

**Резюме:** Впервые проведена комплексная *in vivo* оценка влияния длительного (45 суток) ежедневного внутрижелудочного введения мышам линии Balb/c водного раствора хелидоновой кислоты (ChA) — малой молекулы природного происхождения — на морфофункциональное состояние ключевых систем, участвующих в метаболизме и экскреции ксенобиотиков (желудок, печень, почки), а также иммунокомпетентного органа (селезенка). Результаты демонстрируют отсутствие патологических изменений в тканях при использовании вещества в концентрации 10 мг/кг в 0,2 мл растворителя (дистиллированная вода). При этом, как установлено ранее, ChA и ее кальциевая соль в указанной дозе обладают специфической (остеогенной) активностью в отношении мезенхимных стромальных / стволовых клеток как *in vitro*, так и *in vivo*. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии общетоксического действия на изученные органы низкой концентрации вещества при пероральном назначении линейным мышам. Это открывает перспективы дальнейших испытаний для регистрации активной фармацевтической субстанции отечественного происхождения, имеющей существенное значение для развития арсенала регенеративной биомедицины, в первую очередь в отношении биоинженерии костной ткани.

**Ключевые слова:** сосюра спорная, хелидоновая кислота, пероральное введение, желудок, печень, почки, селезенка, морфометрический анализ

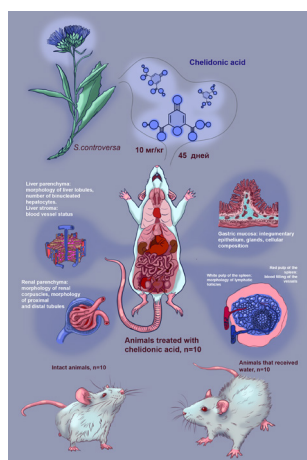
Original research article

## THE EFFECT OF NATURALLY OCCURRING CHELIDONIC ACID ON THE MORPHOFUNCTIONAL STATUS OF INTERNAL ORGANS: AN EXPERIMENTAL STUDY

A. V. Gorokhova, T. F. Nasibov, A. Yu. Ryzhkova,  
A. V. Leshenkova, E. D. Porokhova, A. N. Dzyuman,  
E. Yu. Avdeeva, M. V. Belousov, I. A. Khlusov\*

Siberian State Medical University,  
634050, Tomsk, Russia

\* Correspondence: khlusov63@mail.ru



### To cite this article:

Gorokhova A. V., Nasibov T. F.,  
Ryzhkova A. Yu., Leshenkova A. V.,  
Porokhova E. D., Dzyuman A. N.,  
Avdeeva E. Yu., Belousov M. V.,  
Khlusov I. A. The effect of naturally  
occurring chelidonic acid on the  
morphofunctional status of internal  
organs: an experimental study.  
*Advanced targets in Biomedicine*.  
2026;2(1):101–123.  
<https://doi.org/10.5922/ATB-2026-2-1-7>

Received  
05.03.2026

Revised  
16.04.2026

Accepted  
17.04.2026

Published  
09.09.2026

© Gorokhova A. V., Nasibov T. F.,  
Ryzhkova A. Yu., Leshenkova A. V.,  
Porokhova E. D., Dzyuman A. N.,  
Avdeeva E. Yu., Belousov M. V.,  
Khlusov I. A., 2026  
© Design, IKBFU, 2026

**Abstract:** For the first time, a comprehensive *in vivo* evaluation of the effects of long-term (45 days) daily intragastric administration of water solution of naturally occurring small molecules of chelidonic acid (ChA) to Balb/c mice was conducted. The study was focused on the morphofunctional state of several key organs involved in xenobiotic metabolism and excretion, including the stomach, liver, kidneys, as well as an immunocompetent organ (spleen). The obtained results demonstrate the absence of pathological changes in these organs when the substance was administered orally at a concentration of 10 mg/kg in 0.2 ml of solvent (distilled water) for 45 days. Moreover, as previously established, ChA and its calcium salt at the indicated dose exhibit specific (osteogenic) activity against mesenchymal stromal/stem cells both *in vitro* and *in vivo*. These findings indicate an absence of general toxicity to studied organs of a low concentration of ChA in lineage mice, suggesting that it may be a promising candidate for future clinical use. This opens up promising opportunities for further research and development of an active pharmaceutical substance that is entirely domestic in origin. This is of great importance for the advancement of the field of regenerative biomedicine, primarily in the area of bone tissue engineering.

**Keywords:** *Saussurea controversa*, chelidonic acid, oral administration, stomach, liver, kidneys, spleen, morphometric analysis

## Введение

Малые молекулы (ММ) — это органические соединения с низкой молекулярной массой, меньше 1000 Да, к которым относятся некоторые метаболиты, лекарственные препараты, моносахариды, вторичные мессенджеры и ксенобиотики [1]. Их применение в биомедицине и фармакологии обусловлено рядом преимуществ, определяющих перспективность использования: (1) благодаря низкой молекулярной массе ММ эффективно преодолевают клеточные мембраны, что обеспечивает их взаимодействие не только с внеклеточными, но и с внутриклеточными мишенями, включая регуляцию сигнальных путей [2–5]; (2) высокая диффузионная способность ММ способствует их накоплению в тканях с ограниченной васкуляризацией, что расширяет терапевтические возможности [4; 5]; (3) большинство ММ не требует сложных схем приема, а главный способ применения — пероральный [4; 5]; (4) быстрая абсорбция и предсказуемая фармакокинетика позволяют легче дозировать содержащие ММ препараты и гибко корректировать режимы терапии [4; 5]. Кроме того, синтез ММ в лабораторных условиях или их выделение из природных источников требуют меньших затрат по сравнению с макромолекулярными соединениями [6; 7] а их стабильность при хранении и транспортировке упрощает логистику [8; 9], делая ММ доступными даже для небольших исследовательских центров.

Хелидоновая кислота (ChA, молекулярная масса 184,1) — одна из ММ, весьма перспективная для биомедицинских приложений вследствие широкого спектра фармакологической активности [10]. Экспериментальные данные свидетельствуют о высокой иммуномодулирующей активности ChA на моделях воспалительных заболеваний, таких как язвенный колит у мышей, где она улучшала состояние животных, снижая уровни провоспалительных цитокинов IL-6, TNF- $\alpha$ , а также экспрессию COX-2 и HIF-1 $\alpha$  [11]. Ее противовоспалительные свойства также продемонстрированы в культуре человеческих кератиноцитов, где ChA нормализовала концентрации IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 и TNF- $\alpha$  [12]. Кроме того, ChA показала противоаллергическое действие, снижая реакцию на аллергены, количество эозинофилов и уровни IL-1 $\beta$  и COX-2 у мышей с ринитом [13]. Эти данные согласуются с исследованиями на крысах, где она уменьшала тканевую инфильтрацию эозинофилами и уровень IgE [14].

Другие работы указывают на анальгетический и противовоспалительный потенциал ChA, сравнимый с действием ацетилсалициловой кислоты и индометацина [15], что было подтверждено в последующих экспериментах [16]. В неврологии ChA проявляет тимолептический эффект, увеличивая экспрессию нейротрофического фактора и влияя на уровни серотонина, дофамина и норадреналина [17], а ее производные могут ингибировать образование бета-амилоида при болезни Альцгеймера [18]. ChA модулирует глутаматергическую нейротрансмиссию через ингибирование глутаматдегидрогеназы [19].

Наши предыдущие исследования расширили эти данные, демонстрируя специфическую активность ChA и ее производного хелидоната кальция (ChACa) при стимулировании остеогенной дифференцировки и созревания мезенхимных стромальных / стволовых клеток (МСК), а также процессов минерализации *in vitro* [20] и в тесте эктопического остеогенеза *in situ* [21]. Хелидонаты также активируют гемопоэз и остеогенез, что подтверждается анализом баз данных *in silico* [22; 23]. Недавно выполненное компьютерное моделирование показало перспективные молекулярные мишени (метаболические пути и таргетные гены), опосредующие остеогенный эффект ChA [23; 24].

Однако, несмотря на растущий интерес к терапевтическому потенциалу ChA, доступных данных о безопасности применения этой малой молекулы, особенно в условиях курсового (длительного) введения, недостаточно. Это создает проблемы в продвижении на фармацевтический рынок потенциальных лекарственных форм, разрабатываемых на основе ChA. Вещество является слабой кислотой, но при хроническом применении может оказывать негативные побочные эффекты. В этом плане

органы пищеварения и выделения представляют наибольший интерес, поскольку при пероральном введении первыми контактируют с ксенобиотиком и участвуют в его элиминации из организма.

## Цель исследования

Изучить влияние природной формы хелидоновой кислоты, выделенной из растения соссурея спорная, при курсовом пероральном введении на морфологическое состояние желудка, печени, селезенки и почек мышей.

## Материалы и методы

### Содержание животных

Дизайн эксперимента одобрен комиссией IACUC Центральной научно-исследовательской лабораторией СибГМУ (Заключение № 1 от 03.04.2023), признан соответствующим базовым биоэтическим требованиям. Все процедуры с участием лабораторных животных проводились в соответствии с Директивой Европейского парламента 2010/63/ЕС о защите животных, используемых в научных целях. Исследование проводилось на базе вивария Центра доклинических исследований (ЦДИ) центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) СибГМУ на 30 самцах мышей линии Balb/c в возрасте 12 недель, массой 20–25 г, после 7-дневного карантина в амбиентных условиях. Животных содержали в специальных промаркированных клетках, по пять особей, при температуре воздуха 20–26 °С и относительной влажности воздуха 40–70 %, в условиях искусственного освещения и принудительной вентиляции, на подстилке из предварительно простерилизованной сухой древесной стружки. Для кормления животных использовали промышленный сертифицированный корм Биопро (ДельтаФидс, Россия) с установленным сроком годности. Питательную воду животные получали в неограниченном количестве. Критерием невключения в эксперимент служили признаки нездоровья животных, установленные ветеринарным врачом при внешнем осмотре (вялость, отсутствие аппетита, выпадение шерсти, зуд и покраснение кожи и слизистых оболочек).

### Тестируемая субстанция

ChA получали из экстрактов растения *Saussurea controversa* DC (семейство Asteraceae), как описано ранее [20]. Видовая принадлежность образца установлена сотрудником кафедры ботаники Томского государственного университета М. Н. Шуруповой (гербарный образец № ТК-004605). Природная ChA получена в виде бесцветных кристаллов, структура соединения доказана методом рентгеноструктурного анализа (дифрактометр Bruker KAPPA APEX II с двумерным детектором (излучение MoK $\alpha$  с графитовым монохроматором,  $\omega$ -ф-сканирование). На хроматограммах, полученных с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (хроматограф Shimadzu LC-20AD, колонка PerfectSil Target ODS-3), присутствует один пик, соответствующий Ch A. Отсутствие остаточных органических растворителей, используемых в процессе получения ChA, доказано методом газожидкостной хроматографии (газовый хроматограф «Хромос GX-1000»). Вещество в кристаллической форме хранили в амбиентных условиях и растворяли водой непосредственно перед внутрижелудочным зондовым введением лабораторным животным.

### Дизайн эксперимента

Животные были распределены случайным образом на три группы, по 10 самцов в каждой. Контрольная группа (Cont) состояла из интактных животных, не получавших каких-либо вмешательств или введений. Вторая группа (ContW) служила контролем

процедуры введения и получала однократное внутривентральное введение дистиллированной воды посредством желудочного зонда. Основная экспериментальная группа (ExpChA) подвергалась внутривентральному введению водного раствора ChA в дозировке 10 мг/кг массы лабораторных животных в 0,2 мл растворителя (воды). В данной концентрации ChA проявляет специфическую остеогенную активность в отношении МСК [20], в том числе при длительном (35 суток) пероральном введении вещества [21]. В связи с этим первичная оценка безопасности курсового назначения ChA представляла несомненный интерес. Процедура введения тестируемых жидкостей двум группам (ContW и ExpChA) выполнялась один раз в сутки на протяжении всего периода назначений (45 дней).

По окончании указанного срока животных выводили из эксперимента методом контролируемой асфиксии углекислым газом. Сразу после эвтаназии у всех подопытных особей были извлечены внутренние органы для последующего гистологического анализа. В перечень отобранных образцов для гистологического наблюдения вошли желудок, печень, селезенка и почки.

### *Гистологическое и морфометрическое исследование*

Гистологическое исследование внутренних органов мышей осуществляли на базе кафедры морфологии и общей патологии СибГМУ (Томск). Извлеченные из каждого животного целевые органы фиксировали в 10%-ном забуференном растворе формалина (pH 7,4, Biovitrum, Санкт-Петербург, Россия) на протяжении минимум 24 ч. Затем из фиксированного материала вырезали стандартные фрагменты тканей, которые последовательно промывали в проточной воде в течение 24 ч и дегидратировали в шести сменах раствора IsoPrep на основе изопропанола (Biovitrum, Санкт-Петербург, Россия) согласно протоколу производителя. Обезвоженные образцы заключали в парафиновую среду HISTOMIX (Biovitrum, Санкт-Петербург, Россия). С использованием полуавтоматического микротомы МЗП 01 (Техном, Москва, Россия) получали серийные срезы толщиной 5 мкм, которые монтировали на предметные стекла.

Для оценки влияния ChA на морфологическое состояние целевых органов применяли рутинное окрашивание гематоксилином Джилла (Biovitrum, Санкт-Петербург, Россия) и водным раствором эозина (Biovitrum, Санкт-Петербург, Россия), а также гистохимический метод окрашивания по Эйнарсону [25]. Окраска по Эйнарсону направлена на выявление нуклеиновых кислот и позволяет оценить синтетическую активность клеток по распределению красителя в ядре и цитоплазме. Все этапы приготовления гистологических препаратов проводили в унифицированных условиях, что обеспечивает сопоставимость результатов и позволяет интерпретировать выявленные морфофункциональные различия как отражение истинных структурных изменений в тканях.

Изучение гистологических препаратов внутренних органов проводили с использованием светового микроскопа Axioscope 40 (Zeiss, Hilden, Germany). Цифровые микрофотографии получали в строго стандартизированных условиях освещения, применяя фотоаппарат Canon PowerShot G5 X (разрешение 14,1 Мп; Canon Inc., Китай) и специализированное программное обеспечение AxioVision 4.8.2 (Zeiss, Hilden, Germany) для захвата и первичной обработки изображений.

На основе полученных микрофотографий выполняли оценку общей гистоархитектоники, а также проводили анализ специфических морфологических признаков, характерных для каждого исследуемого органа.

При исследовании желудка оценивали целостность слизистой оболочки и функциональное состояние покровного эпителия, глубину желудочных ямок, морфологию и плотность расположения желез, наличие, степень выраженности и клеточный состав воспалительного инфильтрата в собственной пластинке слизистой оболочки и подслизистой основе.

При исследовании печени анализировали сохранность дольковой структуры, оценивали состояние гепатоцитов, включая признаки жировой дистрофии и некроза. Изучали состояние ядер, включая количество двуядерных клеток, а также состояние портальных трактов и синусоидов.

При исследовании селезенки определяли соотношение белой и красной пульпы и их структурные особенности. В белой пульпе оценивали состояние лимфоидных фолликулов, в том числе наличие и активность герминативных центров, а также структуру периартериолярных лимфоидных муфт и маргинальной зоны. В красной пульпе анализировали степень кровенаполнения синусов.

Для паренхимы почек визуальная оценка включала состояние клубочкового аппарата — целостность капсулы и клеточность почечных телец, а также морфологию проксимальных и дистальных канальцев (наличие дистрофических изменений эпителиоцитов, признаков некроза или цилиндров в просветах). Дополнительно описывалось состояние интерстициальной стромы, в частности наличие отека или очагов воспалительной инфильтрации.

Морфометрический анализ выполняли с использованием программных комплексов AxioVision 4.8.2 (Zeiss, Hilden, Germany) и ImageJ (версия 1.38, Национальный институт здоровья, Бетезда, США; <http://www.rsb.info.nih.gov/ij>), руководствуясь принципами компьютерной морфометрии цифровых изображений, изложенными в методической литературе [26] и позволяющими получить количественные характеристики изучаемых объектов. Для количественной оценки определяли ряд параметров: для почек измеряли относительные площади коркового и мозгового вещества, а также количество и площадь почечных телец; для печени подсчитывали процентное соотношение двуядерных гепатоцитов к общему числу клеток; для селезенки определяли соотношение белой и красной пульпы и число лимфоидных фолликулов в белой пульпе (на площадь поперечного среза  $\sim 20 \text{ мм}^2$ ).

### **Статистическая обработка данных**

Статистический анализ данных проводился с помощью языка программирования R (версия 4.4.0) в среде RStudio (версия 2023.12.0 + 369). Количественные признаки проверялись на соответствие закону нормального распределения с помощью теста Шапиро — Уилка с поправкой Ройстона для больших выборок (Royston AS R94,  $3 \leq n \leq 5000$ ) [27].

Описание количественных нормально распределенных признаков приводится в виде выборочного среднего и выборочного стандартного отклонения ( $\bar{X} \pm SD$ ), количественных признаков, не соответствующих нормальному распределению, в виде медианы и первого и третьего квартилей ( $Me (Q1; Q3)$ ).

Для множественного сравнения количественных нормально распределенных признаков применялся однофакторный дисперсионный анализ Уэлча (Welch's ANOVA). Выбор данного критерия основывался на следующих факторах: (а) Welch's ANOVA не требует равенства дисперсий сравниваемых групп и, как следствие [28; 29], (б) не требует проведения предварительного теста на равенство дисперсий (критерием Бартлетта, Bartlett's test), что приводит к уменьшению возникновения ошибки первого рода; (в) мощность Welch's ANOVA сопоставима с обычным однофакторным дисперсионным анализом (ANOVA) при равных дисперсиях и выше при существовании отличий между ними (дисперсиями) [29—32]. В качестве апостериорного теста использовался критерий Геймса — Хоувела (Games — Howell post-hoc test), обладающий достаточной мощностью и необходимым уровнем контроля возникновения ошибки первого рода [33].

Для ранговых и количественных, не согласующихся с нормальным законом, независимых данных множественное сравнение проводилось при помощи критерия Ван дер Вардена (Van der Waerden test). Выбор теста Ван дер Вардена основывается

на том, что он обеспечивает высокую мощность (на уровне ANOVA, при которой выполняются предположения о нормальности) [34] и вместе с тем обладает достаточной надежностью [35; 36]. В качестве апостериорного теста использовался критерий Стиля — Дваса (Steel — Dwass post-hoc test), обладающий необходимой мощностью и достаточным уровнем контроля возникновения ошибки первого рода [37; 38].

## Результаты и обсуждение

### Общее состояние животных

Общее состояние животных во всех группах (Cont, ContW, ExpChA) на протяжении всего 45-суточного эксперимента оставалось удовлетворительным, без видимых отклонений от нормы. У всех мышей сохранялись активность, аппетит и нормальное потребление воды, а их масса тела соответствовала возрастной норме для линии Balb/c. Внешний осмотр животных ветеринаром ЦДИ ЦНИЛ СибГМУ не выявил таких визуальных признаков нездоровья, как вялость, выпадение шерсти, зуд или покраснение кожных покровов. Не наблюдалось изменений в поведенческих реакциях, не было зафиксировано случаев гибели животных, что указывает на хорошую переносимость процедуры ежедневного внутрижелудочного введения как растворителя (воды), так и изучаемого вещества. Таким образом, хроническое введение ChA в использованной дозировке не оказало негативного влияния на общее состояние подопытных мышей.

### Морфофункциональное состояние желудка

При гистологическом исследовании стенка желудка во всех группах сохраняла нормальное строение (рис. 1). В контрольных группах (Cont, ContW) слизистая оболочка не имела повреждений, имела типичный рельеф из складок, полей и ямок. Желудочные ямки имели правильную конфигурацию и равномерную глубину, в железах фундального отдела отсутствовали признаки острого или хронического воспаления (рис. 1, а, б). Слизистая оболочка желудка выстлана однослойным призматическим эпителием с выраженной клеточной полярностью.

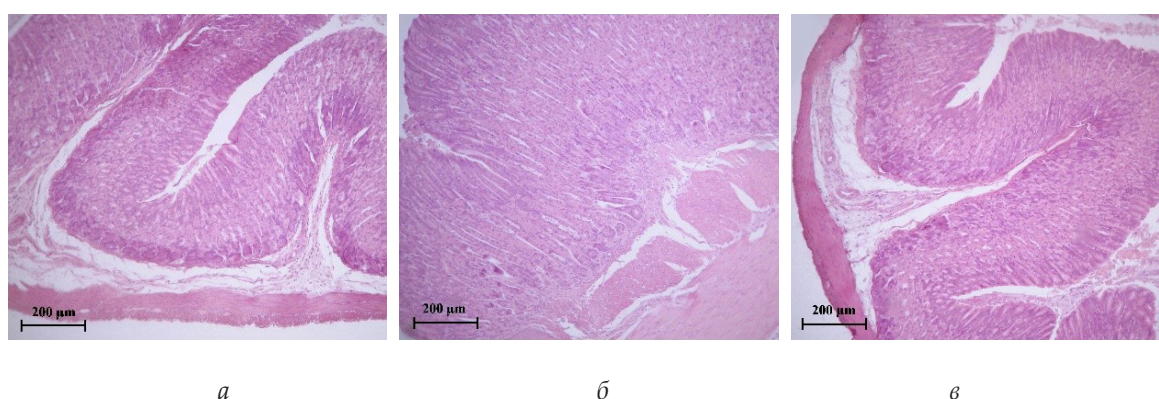


Рис. 1. Участок желудка мышей в группах Cont (а), ContW (б) и ExpChA (в).  
Окрасивание гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 100$

Fig. 1. Stomach section of mice in the Cont (а), ContW (б), and ExpChA (в) groups.  
Hematoxylin and eosin staining. Magnification  $\times 100$

В группе животных, получавших ChA (ExpChA), патологических изменений в желудке также не обнаружено (рис. 1, в). Слизистая оболочка оставалась интактной, без

эрозий или изъязвлений. Подслизистая основа и мышечные слои не имели признаков отека, фиброза или дистрофии. Железистый аппарат сохранял характерные плотность и морфологию. В собственной пластинке слизистой отмечалась умеренная диффузная полиморфноядерная клеточная инфильтрация без формирования очаговых лимфоидных скоплений. Таким образом, гистологическая картина соответствовала сохранной архитектонике желудочной стенки; обусловленные реакцией стресс или раздражающим действием кислоты эрозивно-язвенные или выраженные воспалительные процессы отсутствовали.

### Морфофункциональное состояние печени

Морфологическая оценка печени не выявила патологических отклонений ни в одной из исследованных групп. У интактных животных (Cont) и мышей, получавших воду (ContW), орган имел обычные макроскопические характеристики: стандартные размеры, красно-коричневый цвет, гладкую капсулу без видимых очагов некроза или кровоизлияний. При микроскопии после стандартного окрашивания гематоксилином и эозином паренхима печени была представлена классическими печеночными дольками с сохранной гистоархитектоникой (рис. 2, а, б). Гепатоциты имели центрально расположенные ядра без признаков кариопикноза или кариорексиса, их цитоплазма была гомогенной, без вакуолизации (рис. 2, а, б). Соединительнотканые прослойки по ходу портальных трактов оставались тонкими, без морфологических признаков развития токсического фиброза печени (рис. 2, а, б).

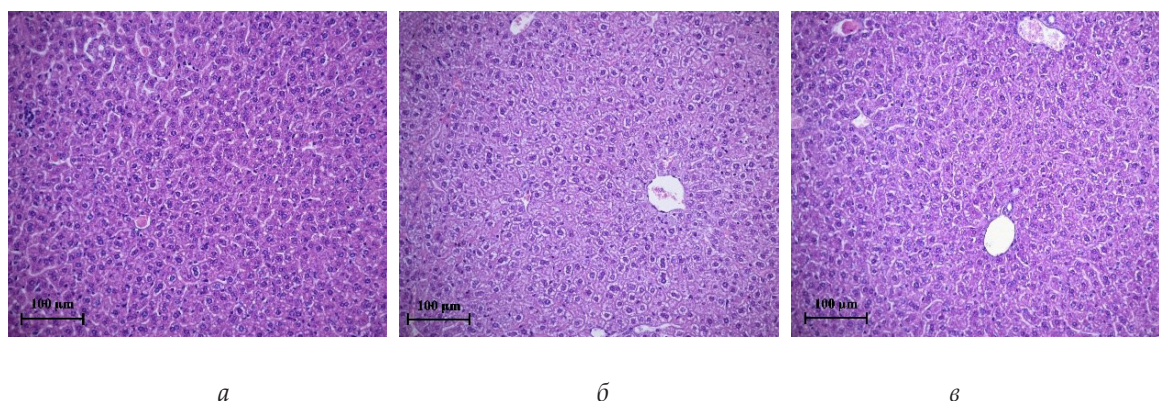


Рис. 2. Участок печени мышей в группах Cont (а), ContW (б) и ExpChA (в).  
Окрашивание гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 200$

Fig. 2. Liver section of mice in the Cont (а), ContW (б), and ExpChA (в) groups.  
Hematoxylin and eosin staining. Magnification  $\times 200$

Аналогичная картина наблюдалась в группе, получавшей ChA (ExpChA) (рис. 2, в). Внутривенное введение ChA на протяжении 45 суток не привело к развитию морфологических изменений. В паренхиме печени и в портальных трактах отсутствовали признаки дистрофии, фокального или массивного некроза гепатоцитов, холестаза или воспалительной лейкоцитарной инфильтрации (рис. 2, в). Распределение двуядерных гепатоцитов в дольках было равномерным и соответствовало норме для данного вида животных — менее 30 % [39; 40] — во всех исследуемых группах (табл. 1). Так, в группе интактных животных (Cont) доля двуядерных гепатоцитов составляла 14 (12; 15) % (абсолютное число двуядерных гепатоцитов — 414 (355; 444)), в контроле процедуры введения (ContW) — 13 (10; 15) % (389 (299; 448)), а у мышей, получавших

ChA (ExpChA), — 13 (11; 17) % (420 (355; 549)) (табл. 1). При множественном сравнении (Van der Waerden test,  $p = 0,68$ , табл. 1) статистически значимых различий между группами не обнаружено.

Таблица 1

**Результаты морфометрического анализа цифровых изображений  
гистологических срезов печени в исследуемых группах**

Table 1

**Results of morphometric analysis of digital images of histological sections  
of the liver in the study groups**

| Группа | N  | Доля двуядерных гепатоцитов, %<br>от общего числа гепатоцитов Me (Q1;Q3) | Множественное<br>сравнение | Анализ<br>post-hoc |
|--------|----|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------|--------------------|
| Cont   | 10 | 14 (12; 15)                                                              | $p = 0,68$                 | —                  |
| ContW  | 10 | 13 (10; 15)                                                              |                            |                    |
| ExpChA | 10 | 13 (11; 17)                                                              |                            |                    |

*Примечание:* N — объем выборки (число животных в группе). У каждого животного для подсчетов использовали 10 уникальных полей зрения на увеличении  $\times 200$ .

*Note:* N — sample size (number of animals in the group). For each animal, 10 unique fields of view were used for calculations at a magnification of  $\times 200$ .

Таким образом, 45-дневное пероральное назначение ChA в дозе 10 мг/кг не влияет на регенераторную активность паренхимы печени, оцениваемую по уровню бинуклеации, что позволяет сделать вывод об отсутствии токсического действия ChA на ткань печени в условиях проведенного эксперимента.

### Морфофункциональное состояние почек

Проведенное гистологическое исследование почек показало, что структура органа во всех экспериментальных группах соответствовала норме (рис. 3).

У интактных животных (Cont) и мышей контрольной группы, получавших воду (ContW), наблюдалась типичная архитектура с четкой дифференциацией на корковое и мозговое вещество (рис. 3, а, б, в, г). Почечные тельца были сохранены, клубочки имели нормальную клеточность и форму, капсула Шумлянского — Боумана не была утолщена или деформирована (рис. 3, б, г). Канальцевый аппарат, включая проксимальные и дистальные извитые канальцы, не имел признаков дистрофии, некроза или атрофии. Эпителий канальцев сохранял целостность, а просветы не содержали цилиндров (рис. 3, а, б, в, г). Строма органа была без признаков отека, очаговой лимфоидной инфильтрации или фиброза.

Длительное (45-дневное) внутрижелудочное введение ChA (группа ExpChA) не вызвало визуальных и микроскопических патологических изменений в почечной ткани. Гистологическая картина была полностью сопоставима с таковой в обеих контрольных группах (рис. 3). Как и в контрольных группах, отсутствовали вакуолизация или гиалиново-капельная дистрофия эпителия канальцев, склероз или гиалиноз клубочков, расширение (дилатация) канальцев или интерстициальный отек, воспалительная инфильтрация (рис. 3, д, е). Отсутствие вышеуказанных признаков свидетельствует о том, что ChA не обладает раздражающим или иммунопатологическим эффектом на почечную паренхиму при выбранном режиме введения.

Данные гистологического анализа получили подтверждение в результатах морфометрического исследования. Относительная площадь коркового вещества почки

у животных всех групп соответствовала норме для данного вида — 60–80 % [41; 42]. У интактных животных (Cont) она составила 65 (61; 70)%, в контрольной группе (ContW) — 67 (60; 71)%, у мышей, получавших ChA (ExpChA), — 66 (62; 71)%; статистически значимых различий между группами не выявлено (Van der Waerden test,  $p = 0,72$ , табл. 2). Удельное количество почечных телец также не имело отличий в сравниваемых группах: 9 (7; 10) шт/мм<sup>2</sup> в группе Cont, 8 (6; 9) шт/мм<sup>2</sup> в ContW и 8 (6; 10) шт/мм<sup>2</sup> в ExpChA (Van der Waerden test,  $p = 0,90$ , табл. 2). Средняя площадь одного почечного тельца составила  $1855,85 \pm 245,63$  мкм<sup>2</sup> у интактных животных,  $1920,41 \pm 198,45$  мкм<sup>2</sup> в контроле процедуры введения и  $2053,20 \pm 266,77$  мкм<sup>2</sup> в опытной группе. При множественном сравнении статистически значимых различий также не обнаружено (Welch's ANOVA,  $p = 0,28$ , табл. 2). Исследуемые характеристики почечных телец также соотносились с нормой [43; 44].

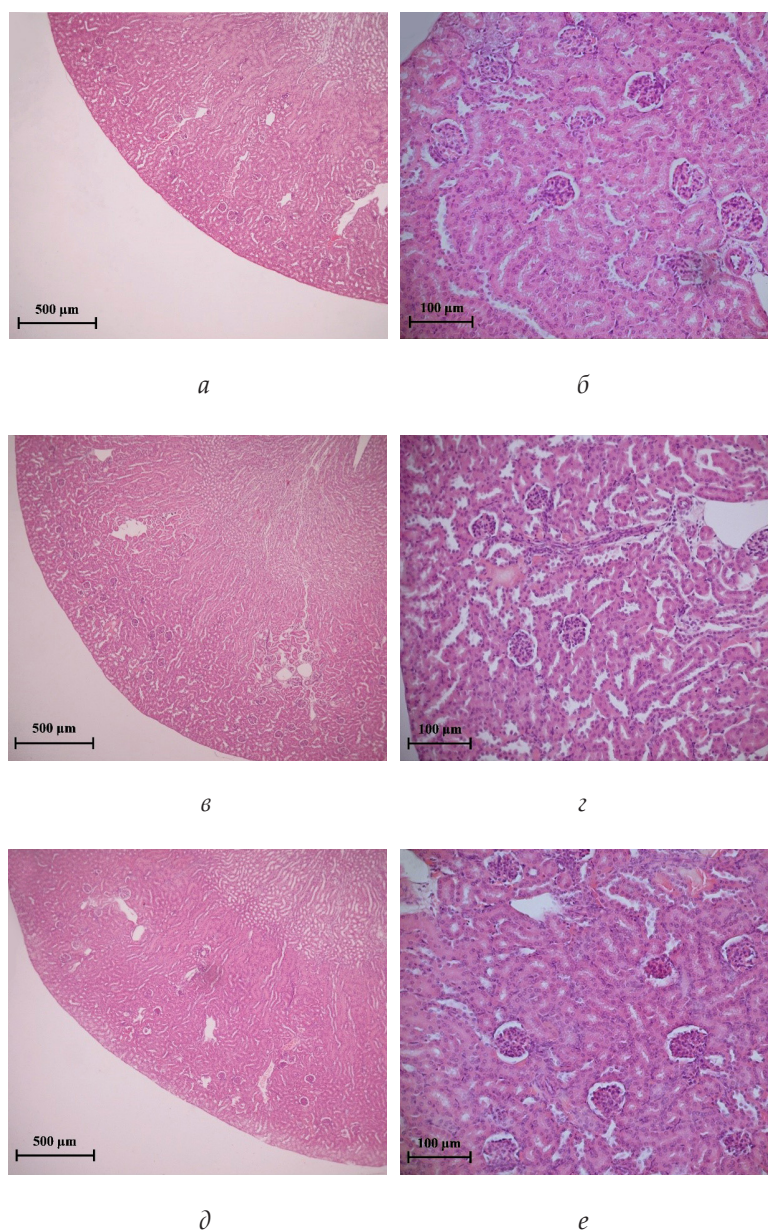


Рис. 3. Участок почек мышей в группах Cont (а, б), ContW (в, г) и ExpChA (д, е).  
Окрашивание гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 50$  (а, в, д) и  $\times 200$  (б, г, е)

Fig. 3. Kidney section of mice in the Cont (а, б), ContW (в, г), and ExpChA (д, е) groups.  
Hematoxylin and eosin staining. Magnification  $\times 50$  (а, в, д) and  $\times 200$  (б, г, е)

Таблица 2

**Результаты морфометрического анализа цифровых изображений  
гистологических срезов почек в исследуемых группах**

Table 2

**Results of morphometric analysis of digital images of histological sections  
of kidneys in the study groups**

| Группа                       | N  | Площадь коркового<br>вещества, %<br>от общей<br>площади почки<br>Me (Q1;Q3) | Удельное количество<br>почечных телец,<br>шт/мм <sup>2</sup><br>Me (Q1;Q3) | Средняя площадь<br>одного почечного<br>тельца, мкм <sup>2</sup><br>X ± SD |
|------------------------------|----|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Cont                         | 10 | 65 (61; 70)                                                                 | 9 (7; 10)                                                                  | 1855,85 ± 245,63                                                          |
| ContW                        | 10 | 67 (60; 71)                                                                 | 8 (6; 9)                                                                   | 1920,41 ± 198,45                                                          |
| ExpChA                       | 10 | 66 (62; 71)                                                                 | 8 (6; 10)                                                                  | 2053,20 ± 266,77                                                          |
| Множественное срав-<br>нение |    | p = 0,72                                                                    | p = 0,90                                                                   | p = 0,28                                                                  |
| Анализ post-hoc              |    | —                                                                           | —                                                                          | —                                                                         |

*Примечание:* N — объем выборки (число животных в группе). Множественное сравнение и анализ post-hoc для признаков «Площадь коркового вещества» и «Удельное количество почечных телец» выполнены с помощью Van der Waerden test и Steel — Dwass test соответственно; для признака «Средняя площадь одного почечного тельца» — с помощью Welch's ANOVA и Games — Howell test.

*Note:* N — sample size (number of animals per group). Multiple comparisons and post-hoc analysis for the Cortex area and Specific renal corpuscle count traits were performed using the Van der Waerden test and Steel — Dwass test, respectively; for the Average renal corpuscle area trait — Welch's ANOVA and Games — Howell test.

Таким образом, 45-суточное внутрижелудочное введение ChA в дозе 10 мг/кг не влияет на морфофункциональное состояние почек, включая соотношение коркового и мозгового вещества, количество и размеры почечных телец, что свидетельствует об отсутствии у соединения нефротоксического действия в условиях проведенного эксперимента.

### **Морфофункциональное состояние селезенки**

Гистологическое исследование селезенки не выявило наличие патологических изменений, а также качественных и количественных различий в структуре органа ни в одной из исследуемых групп (рис. 4).

У животных контрольных групп (Cont, ContW) наблюдалась типичная гистоархитектоника с четким разделением на белую и красную пульпу (рис. 4, а, з). Лимфоидные фолликулы белой пульпы были хорошо различимы, с заметными герминативными центрами (рис. 4, б, в, д), свидетельствующими об активном иммунном статусе. Кроме того, визуализировались периартериоллярные лимфоидные муфты (рис. 4, б, в, е), окружающие ветви центральной артерии. Маргинальная зона не имела признаков расширения или истощения (рис. 4, б, в, д, е). Красная пульпа была представлена типичными синусоидными структурами с умеренным физиологическим кровенаполнением, без признаков застойных явлений, экстрамедуллярного кроветворения или скопления сидерофагов (рис. 4, а, б, в, з, д, е).

У мышей, получавших ChA (группа ExpChA), картина была полностью сопоставима с контролем (рис. 4). Не отмечено изменений в соотношении белой и красной пульпы, а также в структуре лимфоидных образований (рис. 4, ж, з, и). Лимфоидные фолликулы сохраняли высокую клеточность (рис. 4, з, и). Признаков атрофии лимфоидной ткани, гиперплазии или воспалительной инфильтрации в строме органа обнаружено не было (рис. 4, ж). Красная пульпа также не имела отличий от контроля: синусы были умеренно заполнены форменными элементами крови, трабекулы не были утолщены (рис. 4, ж, з, и).

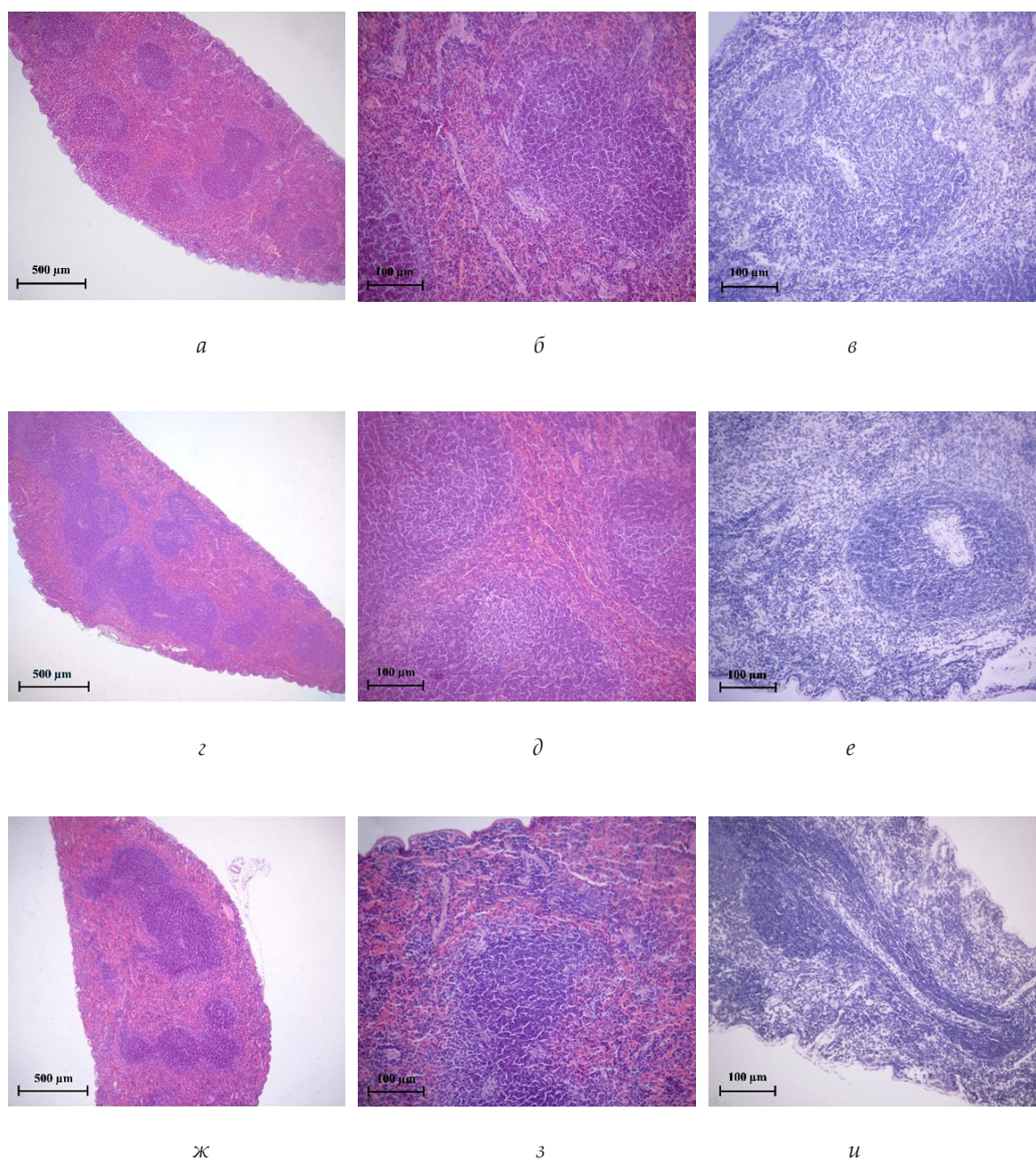


Рис. 4. Участок селезенки мышей в группах Cont (а, б, в), ContW (з, д, е) и ExpChA (ж, з, и). Окрашивание гематоксилином и эозином (а, б, з, д, ж, з), и по методу Эйнарсона (в, е, и). Увеличение  $\times 50$  (а, з, ж) и  $\times 200$  (б, в, д, е, з, и).

Fig. 4. Spleen section of mice in the Cont (а, б, в), ContW (з, д, е) and ExpChA (ж, з, и) groups. Staining with hematoxylin and eosin (а, б, з, д, ж, з) and by the Einarson method (в, е, и). Magnification  $\times 50$  (а, з, ж) and  $\times 200$  (б, в, д, е, з, и).

Результаты морфометрического анализа подтверждают описательные данные. Площадь белой пульпы у интактных животных (Cont) составила 22 (17; 23)%, в контрольной группе (ContW) — 20 (18; 25)%, у мышей, получавших ChA (ExpChA), — 23 (20; 25)%; статистически значимых различий между группами не выявлено (Van der Waerden test,  $p = 0,85$ , табл. 3). Соотношение площадей белой и красной пульпы также не имело существенных отличий: 3,55 (3,35; 4,88) в группе Cont, 4,00 (3,00; 4,56) в ContW и 3,35 (3,00; 4,00) в ExpChA (Van der Waerden test,  $p = 0,67$ , табл. 3). При этом нормальная относительная площадь красной пульпы и ее отношение к белой для мышей составляют 70—90 % и 4/1 — 2,5/1 соответственно [45—47]. Число лимфоидных фолликулов на срез оставалось сопоставимым во всех трех группах: для интактной группы (Cont) — 10 (9; 13), для животных, получавших воду (ContW), — 11 (10; 13), а ChA (ExpChA) — 10 (8; 11) (Van der Waerden test,  $p = 0,41$ , табл. 3).

Таблица 3

**Результаты морфометрического анализа цифровых изображений гистологических срезов селезенки в исследуемых группах**

Table 3

**Results of morphometric analysis of digital images of histological sections of the spleen in the study groups**

| Группа                                          | N  | Площадь белой пульпы, % от общей площади среза<br>Me (Q1; Q3) | Отношение площадей белой и красной пульпы<br>Me (Q1; Q3) | Число фолликулов на весь срез*<br>Me (Q1; Q3) |
|-------------------------------------------------|----|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Cont                                            | 10 | 22 (17; 23)                                                   | 3,55 (3,35; 4,88)                                        | 10 (9; 13)                                    |
| ContW                                           | 10 | 20 (18; 25)                                                   | 4,00 (3,00; 4,56)                                        | 11 (10; 13)                                   |
| ExpChA                                          | 10 | 23 (20; 25)                                                   | 3,35 (3,00; 4,00)                                        | 10 (8; 11)                                    |
| Множественное сравнение<br>Van der Waerden test |    | $p = 0,85$                                                    | $p = 0,67$                                               | $p = 0,41$                                    |
| Анализ post-hoc<br>Steel — Dwass test           |    | —                                                             | —                                                        | —                                             |

*Примечание:* N — объем выборки (число животных в группе); \* — площади срезов не отличались в исследуемых группах и составляли около 20 мм<sup>2</sup>.

*Note:* N — sample size (number of animals in a group). (\*) — Section areas did not differ between the study groups and were approximately 20 mm<sup>2</sup>.

Таким образом, 45-суточное внутрижелудочное введение ChA в дозе 10 мг/кг не влияет на морфофункциональное состояние селезенки, что свидетельствует об отсутствии у тестируемого вещества повреждающего влияния на иммунокомпетентный орган в условиях проведенного эксперимента.

## Обсуждение и выводы

ChA представляет значительный интерес как ММ с широким спектром фармакологической активности [10], включающей противовоспалительное [12; 16], противоаллергическое [13; 14], нейропротекторное [17; 18] и регенеративное [20—23] действие. Однако, несмотря на растущее количество данных о ее эффективности, систематические исследования безопасности, особенно при длительном пероральном применении,

остаются фрагментарными. В частности, практически отсутствуют сведения о влиянии хронического введения ChA на морфофункциональное состояние органов пищеварения и выделения, что создает пробел в оценке ее общего терапевтического потенциала.

Результаты настоящей работы впервые демонстрируют, что ежедневное внутрижелудочное введение ChA в концентрации 10 мг/кг в течение 45 суток не вызывает патологических структурных изменений в ключевых органах-мишенях (желудок, печень, почки) и не нарушает гистоархитектонику селезенки у мышей линии Balb/c.

Пероральный путь введения рассматривается как наиболее предпочтительный для терапевтического применения MM, что обусловлено простотой применения, хорошей биодоступностью и предсказуемой фармакокинетикой [4; 5]. Вместе с тем желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), будучи первым барьером на пути ксенобиотика и обеспечивая не только транспорт, но и расщепление, переваривание и всасывание нутриентов, электролитов и воды, особенно уязвим к повреждающему действию лекарственных средств [48]. Данная проблема наиболее актуальна для соединений с противовоспалительной и анальгетической активностью, поскольку многие нестероидные противовоспалительные препараты ассоциированы с развитием гастропатий, эрозий и язв слизистой оболочки желудка [49].

ChA, согласно литературным данным, обладает фармакологическим профилем, характерным для анальгетиков и противовоспалительных средств [11; 16]. Также следует принимать во внимание раздражающее действие органической кислоты. Это делает оценку ее потенциального влияния на состояние желудка достаточно важной для определения безопасности перорального применения.

Существующие сведения о переносимости ChA со стороны ЖКТ ограничены и носят фрагментарный характер. В частности, имеющиеся данные о безопасности внутрижелудочного введения вещества получены в краткосрочных экспериментах (до 75 мин) и носят скорее описательный характер в рамках исследований, сфокусированных на синтезе и первичной фармакологической оценке производных 4(1H)-пиридинона, к которым относится ChA [16].

Результаты проведенного гистологического анализа свидетельствуют о том, что длительное введение ChA не вызывало раздражения или повреждения слизистой оболочки желудка, а также не приводило к развитию воспалительных процессов в слизистой, подслизистой или мышечном слоях (см. рис. 1, в). Общая морфологическая картина соответствовала норме, что согласуется с имеющимися данными об отсутствии острых неблагоприятных реакций со стороны желудка после введения ChA [16]. Более того, полученные данные коррелируют с результатами исследований, демонстрирующих защитную роль ChA в модели язвенного колита, индуцированного декстрансульфатом натрия [11]. Можно предположить, что собственные противовоспалительные свойства ChA могут компенсировать потенциально раздражающее воздействие при ее хроническом контакте со слизистой оболочкой ЖКТ.

Печень играет центральную роль в метаболизме ксенобиотиков, выступая в качестве основного органа детоксикации благодаря наличию специализированных ферментативных систем [50]. Эти системы включают комплекс ксенобиотик-биотрансформирующих ферментов I фазы (окисление, восстановление, гидролиз) и II фазы (конъюгация), а также транспортные белки III фазы, ответственные за выведение метаболитов [51; 52]. Благодаря такой многоуровневой организации печень способна как к деактивации потенциально опасных соединений [50; 53], так и, в некоторых случаях, к их метаболической активации в более реакционноспособные формы [53; 54].

Именно поэтому оценка состояния печени является критически важным элементом скрининга любых новых биологически активных веществ, поскольку этот орган из-за своей функциональной нагрузки часто становится основной мишенью для гепатотоксических эффектов [55]. Существующие данные о безопасности ChA для печеночной паренхимы носят ограниченный, но обнадеживающий характер. Публикации свиде-

тельствуют об отсутствии признаков острой токсичности даже при введении высоких доз ChA (до 2000 мг/кг) в течение 14 дней, а также о хорошей переносимости при ее длительном применении в более низких дозах (до 40 мг/кг) на крысиных моделях [56].

Результаты настоящего исследования, в котором проводилась гистологическая оценка состояния печени после 45-дневного ежедневного внутрижелудочного введения ChA в дозе 10 мг/кг, полностью согласуются с этими данными. Проведенный анализ не выявил каких-либо патологических отклонений от нормы (см. рис. 2, табл. 1). Отсутствие морфологических изменений в печени в нашем эксперименте, дополняя ранее полученные сведения о переносимости, укрепляет вывод о благоприятном профиле безопасности ChA и отсутствии у нее выраженного гепатотоксического потенциала в изученном режиме дозирования.

В метаболизме и элиминации ксенобиотиков наряду с печенью активное участие принимают почки [57]. Этот орган обладает собственным спектром специфических ферментов, способных к биотрансформации лекарственных веществ, а также играет ключевую роль в их окончательном выведении из организма [58; 59]. Высокая уязвимость почек к лекарственной токсичности обусловлена рядом физиологических особенностей: интенсивным кровотоком, значительным потреблением кислорода, концентрирующей функцией, активными процессами биотрансформации и выраженной активностью мембранных транспортных систем [60; 61]. Хотя для выявления повреждения почек традиционно используются биохимические маркеры в моче [62–64], гистологическое исследование предоставляет наиболее полную информацию, позволяя непосредственно оценить структурную целостность и морфологию почечной ткани [62; 65]. Учитывая определенную, хотя и ограниченную водорастворимость ChA, можно говорить о том, что ее выведение предположительно осуществляется почечным путем, что делает оценку состояния почек критически важной.

Проведенные в настоящей работе гистологические и морфометрические исследования показали, что 45-суточное введение ChA в дозе 10 мг/кг не приводит к развитию нефропатии, воспалительной инфильтрации или дистрофических изменений в почечной ткани (см. рис. 3). Количественный морфометрический анализ также не выявил статистически значимых отличий от контрольных групп по таким параметрам, как относительная площадь коркового и мозгового вещества, количество, а также средняя площадь почечных телец (см. табл. 2). Эти данные согласуются с результатами предыдущих исследований, в которых не было обнаружено признаков острой и субхронической токсичности ChA даже при использовании значительно более высоких доз (до 2000 мг/кг) [56]. Косвенным свидетельством вовлеченности почек в метаболизм ChA являются наши данные о возможном взаимодействии этого соединения с транспортером URAT1 (human urate transporter 1) [66], преимущественно экспрессирующимся в почках [67] и участвующим в реабсорбции мочевой кислоты [68].

Наличие такого потенциального механизма транспорта поднимает вопрос о возможном влиянии ChA на почечную функцию, которое теоретически могло быть как позитивным (например, за счет конкурентного ингибирования URAT1), так и негативным (риск нефропатии или изменения экскреторных процессов). Хотя настоящее исследование не ставило целью прямое подтверждение участия URAT1 в транспорте ChA, полученные морфологические данные об отсутствии повреждений свидетельствуют в пользу благоприятного профиля. Более того, имеющиеся литературные данные о способности ChA снижать нефротоксичность, индуцированную цисплатином, за счет модуляции воспалительных цитокинов [69] позволяют предположить, что ее влияние на почки при длительном введении может носить нейтральный или потенциально протекторный характер.

Хотя селезенка не участвует напрямую в метаболизме ксенобиотиков, наличие у ChA выраженных иммуномодулирующих свойств, описанных в литературе, побудило нас включить оценку ее гистоархитектоники в данную работу. Проведенное исследование показало, что курсовое (45 суток) внутрижелудочное введение ChA в дозе 10 мг/кг не привело к каким-либо структурным изменениям в селезенке. Не было от-

мечено статистически значимых отличий в соотношении белой и красной пульпы (см. табл. 3), а также в структурной организации лимфоидных образований (см. рис. 4). Лимфоидные фолликулы сохраняли клеточную плотность и архитектуру (см. рис. 4). В строме органа отсутствовали признаки атрофии лимфоидной ткани, гиперплазии или очаговой воспалительной инфильтрации, что свидетельствует об отсутствии морфологически выраженного воздействия на иммунный орган при систематическом введении соединения.

Интересно, что отсутствие структурных изменений на тканевом уровне контрастирует с данными, демонстрирующими четкое функциональное иммуномодулирующее действие ChA в других экспериментальных моделях. Так, в исследованиях на мышах с аллергическим ринитом применение ChA приводило к значимому снижению патологической реакции на аллергены, что коррелировало с уменьшением количества эозинофилов и тучных клеток в слизистых оболочках [13]. В другой работе на крысах внутрижелудочное введение ChA вызывало снижение тканевой эозинофильной инфильтрации, уменьшение количества циркулирующих эозинофилов и уровня сывороточного IgE, что в конечном итоге снижало смертность после иммунизации [14]. Таким образом, полученные нами данные позволяют предположить, что иммуномодулирующий эффект ChA, по-видимому, реализуется на уровне регуляции конкретных клеточных популяций и гуморальных факторов без явных морфологических изменений, что может рассматриваться как благоприятный признак селективности ее действия.

Важно отметить, что данное исследование имеет определенные ограничения. В частности, работа проводилась с использованием только одной, достаточно низкой, но активной дозировки (10 мг/кг) и на одной модели животных — самцах мышей линии Balb/c. Это не позволяет судить о возможных дозозависимых эффектах ChA и экстраполировать полученные данные на другие виды млекопитающих. Тем не менее гистологические методы проведенного анализа позволили получить объективные и репрезентативные доклинические результаты для данной экспериментальной модели.

## Заключение

В данном исследовании впервые проведена комплексная оценка влияния длительного (45 суток) внутрижелудочного введения ChA на морфофункциональное состояние ключевых органов, участвующих в метаболизме и экскреции ксенобиотиков (желудок, печень, почки), а также иммунокомпетентного органа (селезенка). Полученные результаты демонстрируют отсутствие патологических структурных изменений во всех исследуемых органах при использовании вещества в концентрации 10 мг/кг. При этом ChA и ее кальциевая соль в указанной дозе обладают специфической (остеогенной) активностью в отношении мезенхимных стромальных / стволовых клеток как *in vitro*, так и *in vivo* [20; 21].

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии общетоксического действия низкой концентрации вещества на линейных мышах, что открывает хорошие перспективы для дальнейших испытаний для регистрации активной фармацевтической субстанции полностью отечественного происхождения, имеющей существенное значение для развития арсенала регенеративной биомедицины, в первую очередь для биоинженерии костной ткани.

**Финансирование.** Исследование проводилось при финансовой и организационной поддержке ООО «БиоГлобус» (Москва) и ООО «Инновационные коммуникации» (Томск).

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи. Все соавторы одобрили окончательную версию рукописи и принимают ответственность за все аспекты работы, включая корректное изучение и урегулирование вопросов, относящихся к точности и добросовестности представленных данных.

**Вклад авторов:**

**А. В. Горохова** — исследование (морфометрический анализ, гистологические исследования), формальный анализ, написание оригинального текста;

**Т. Ф. Насибов** — формальный, статистический анализ, рецензирование и редактирование;

**А. Ю. Рыжкова** — исследование (эксперименты на животных, гистологические исследования);

**А. В. Лешенкова** — исследование (эксперименты на животных, морфометрический анализ);

**Е. Д. Порохова** — исследование (уход за животными, эксперименты на животных);

**А. Н. Дзюман** — исследование (уход за животными, эксперименты на животных);

**Е. Ю. Авдеева** — исследование (приготовление и стандартизация растворов, производство ChA);

**М. В. Белоусов** — исследование (приготовление и стандартизация растворов, производство ChA);

**И. А. Хлусов** — руководство проекта, концептуализация, рецензирование и редактирование.

**Funding.** The research was conducted with the financial and organizational support of BioGlobus LLC (Moscow) and Innovative Communications LLC (Tomsk).

**Conflict of Interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article. All authors approved the final version of the manuscript and take responsibility for all aspects of the work, including ensuring that any questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

**Authors' contribution:**

**A. V. Gorokhova** — investigation (morphometric analysis, histological studies), Formal analysis, Writing — original draft;

**T. F. Nasibov** — formal analysis, Statistical analysis, Writing — review & editing;

**A. Yu. Ryzhkova** — investigation (animal experiments, histological studies);

**A. V. Leshenkova** — investigation (animal experiments, morphometric analysis);

**E. D. Porokhova** — investigation (animal care, animal experiments);

**A. N. Dzyuman** — investigation (animal care, animal experiments);

**E. Yu. Avdeeva** — investigation (preparation and standardization of solutions, ChA production);

**M. V. Belousov** — investigation (preparation and standardization of solutions, ChA production);

**I. A. Khlusov** — project administration, Conceptualization, Writing — review & editing.

**Список литературы**

1. Mitchell J., Lo K. W. H. Small molecule-mediated regenerative engineering for craniofacial and dentoalveolar bone. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022, 10, 1003936, DOI: 10.3389/fbioe.2022.1003936.

2. Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W., Feeney P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2001, 46(1–3), 3–26, DOI: 10.1016/s0169-409x(00)00129-0.

3. Scott D. E., Bayly A. R., Abell C., Skidmore J. Small molecules, big targets: drug discovery faces the protein-protein interaction challenge. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2016, 15(8), 533–550, DOI: 10.1038/nrd.2016.29.

4. Chen S., Song Z., Zhang A. Small-Molecule Immuno-Oncology Therapy: Advances, Challenges and New Directions. *Curr. Top. Med. Chem.* 2019, 19(3), 180–185, DOI: 10.2174/1568026619666190308131805.

5. Toogood P. L. Small molecule immuno-oncology therapeutic agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2018, 28(3), 319–329, DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.12.044.

6. Morgan S., Grootendorst P., Lexchin J., Cunningham C., Greyson D. The cost of drug development: a systematic review. *Health Policy.* 2011, 100(1), 4–17, DOI: 10.1016/j.healthpol.2010.12.002.

7. Newman D. J., Cragg G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* 2020, 83(3), 770–803, DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.
8. Nielsen H. M., Jorgensen L. Challenges in Delivery of Biopharmaceuticals; the Need for Advanced Delivery Systems. *Delivery Technologies for Biopharmaceuticals*, John Wiley & Sons, Ltd; 2009. 1–8, DOI: 10.1002/9780470688397.ch1.
9. Makurvet F. D. Biologics vs. small molecules: Drug costs and patient access. *Medicine in Drug Discovery.* 2021, 9, 100075, DOI: 10.1016/j.medidd.2020.100075.
10. Miroshnichenko L. A., Polyakova T. Y., Avdeeva E. Y., Krivoshechekov S. V., Khlusov I. A., Belousov M. V. Chelidonic Acid and its Derivates: General Spectrum of Biological Activity and Osteogenic Properties (Review). *Drug development & registration.* 2022, 11(4), 60–71, DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4-60-71.
11. Kim D.-S., Kim S.-J., Kim M.-C., Jeon Y.-D., Um J., Hong S.-H. The therapeutic effect of chelidonic acid on ulcerative colitis. *Biol. Pharm. Bull.* 2012, 35(5), 666–671, DOI: 10.1248/bpb.35.666.
12. Liu H., Zheng Y., Li C., Zheng Y., Wang D., Wu Z., et al. Discovery of Anti-inflammatory Ingredients in Chinese Herbal Formula Kouyanqing Granule based on Relevance Analysis between Chemical Characters and Biological Effects. *Sci. Rep.* 2015, 5, 18080, DOI: 10.1038/srep18080.
13. Oh H.-A., Kim H.-M., Jeong H.-J. Beneficial effects of chelidonic acid on a model of allergic rhinitis. *Int. Immunopharmacol.* 2011, 11(1), 39–45, DOI: 10.1016/j.intimp.2010.10.002.
14. Singh D. K., Gulati K., Ray A. Effects of chelidonic acid, a secondary plant metabolite, on mast cell degranulation and adaptive immunity in rats. *Int. Immunopharmacol.* 2016, 40, 229–234, DOI: 10.1016/j.intimp.2016.08.009.
15. Aytemir M. D., Uzbay T., Erol D. D. New 4(1H)-pyridinone derivatives as analgesic agents. *Arzneimittelforschung.* 1999, 49(3), 250–254, DOI: 10.1055/s-0031-1300409.
16. Oztürk G., Erol D. D., Aytemir M. D., Uzbay T. New analgesic and antiinflammatory agents 4(1H)-pyridinone derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 2002, 37(10), 829–834, DOI: 10.1016/s0223-5234(02)01390-9.
17. Jeong H.-J., Yang S.-Y., Kim H.-Y., Kim N.-R., Jang J.-B., Kim H.-M. Chelidonic acid evokes antidepressant-like effect through the up-regulation of BDNF in forced swimming test. *Exp. Biol. Med. (Maywood).* 2016, 241(14), 1559–1567, DOI: 10.1177/1535370216642044.
18. Hamada Y., Suzuki K., Nakanishi T., Sarma D., Ohta H., Yamaguchi R., et al. Structure-activity relationship study of BACE1 inhibitors possessing a chelidonic or 2,6-pyridinedicarboxylic scaffold at the P(2) position. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014, 24(2), 618–623, DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.12.007.
19. Porter T. G., Martin D. L. Chelidonic acid and other conformationally restricted substrate analogues as inhibitors of rat brain glutamate decarboxylase. *Biochem. Pharmacol.* 1985, 34(23), 4145–4150, DOI: 10.1016/0006-2952(85)90207-2.
20. Avdeeva E., Shults E., Rybalova T., Reshetov Y., Porokhova E., Sukhodolo I., et al. Chelidonic Acid and Its Derivatives from *Saussurea Controversa*: Isolation, Structural Elucidation and Influence on the Osteogenic Differentiation of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells *In vitro*. *Biomolecules.* 2019, 9(5), 189, DOI: 10.3390/biom9050189.
21. Avdeeva E., Porokhova E., Khlusov I., Rybalova T., Shults E., Litvinova L., et al. Calcium Chelidonate: Semi-Synthesis, Crystallography, and Osteoinductive Activity *In vitro* and *In vivo*. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021, 14(6), 579, DOI: 10.3390/ph14060579.
22. Nasibov T., Gorokhova A., Starosvetskaya A., Bariev U., Nosov V., Litvinova L., et al. In situ and in silico modeling of the hematopoiesis-inducing effect of chelidonic acid. *Russ. J. Immunol.* 2024, 27(2), 187–196, DOI: 10.46235/1028-7221-16768-ISA.
23. Nasibov T., Gorokhova A., Porokhova E., Shupletsova V., Yurova K., Avdeeva E., et al. A hypothesis of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation mediated by chelidonic acid through the calcium import: original research and computer simulation. *Histochem. Cell Biol.* 2024, 163(1), 14, DOI: 10.1007/s00418-024-02342-5.

24. Nasibov T. F., Gorokhova A. V., Brazovsky K. S., Porokhova E. D., Avdeeva E. Y., Belousov M. V., et al. The pipeline for in silico prediction of target genes and target metabolic pathways for small molecules, using chelidonic acid as an example. *Adv. Target Biomed.* 2025, 1(1), 6–19, DOI: 10.5922/ATB-2025-1-1-1.
25. Pearse A. G. E. *Histochemistry, Theoretical and Applied*. London: Churchill Livingstone, 1968. 759.
26. Shakhov V. P., Khlusov I. A., Dambaev K. V., Zaitsev K. V., Salmina A. B., Shakhova S. S. et al. *Introduction to methods of cell culture, bio-engineering of organs and tissues*. Tomsk: STT, 2004. 385.
27. Royston P. Remark AS R94: a remark on algorithm AS 181: the W-test for normality. *J. R. Stat. Soc. Ser. C Appl. Stat.* 1995, 44(4), 547–551, DOI: 10.2307/2986146.
28. Celik N. Welch's ANOVA: Heteroskedastic skew-t error terms: *Communications in Statistics. Theory and Methods*. 2022, 51(9), 3065–3076, DOI: 10.1080/03610926.2020.1788084.
29. Delacre M., Lakens D., Leys C. Why Psychologists Should by Default Use Welch's t-test Instead of Student's t-test. *International Review of Social Psychology*. 2017, 30(1), 92, DOI: 10.5334/irsp.82.
30. Tomarken A. J., Serlin R. C. Comparison of ANOVA alternatives under variance heterogeneity and specific noncentrality structures. *Psychol. Bull.* 1986, 99(1), 90–99, DOI: 10.1037/0033-2909.99.1.90.
31. Levy K. J. An empirical comparison of the ANOVA F-test with alternatives which are more robust against heterogeneity of variance. *J. Stat. Comput. Sim.* 1978, 8(1), 49–57, DOI: 10.1080/00949657808810247.
32. Lix L. M., Keselman J. C., Keselman H. J. Consequences of Assumption Violations Revisited: A Quantitative Review of Alternatives to the One-Way Analysis of Variance F Test. *Review of Educational Research*. 1996, 66(4), 579–619, DOI: 10.3102/00346543066004579.
33. Tamhane A. C. A Comparison of Procedures for Multiple Comparisons of Means with Unequal Variances. *J. Am. Stat. Assoc.* 1979, 74(367), 471–480, DOI: 10.1080/01621459.1979.10482541.
34. Elamir E. On uses of van der Waerden test: a graphical approach. 2022. Available from: arXiv: 2203.02148, DOI: 10.48550/arXiv.2203.02148.
35. Macunluoglu A. C., Ocakoğlu G. Comparison of the performances of non-parametric k-sample test procedures as an alternative to one-way analysis of variance. *Eur. Res. J.* 2023, 9, 687–696, DOI: 10.18621/eurj.1037546.
36. Luepsen H. Comparison of nonparametric analysis of variance methods: a Monte Carlo study – a vote for van der Waerden. *Commun. Stat. Simul. Comput.* 2018, 47(9), 2547–2576, DOI: 10.1080/03610918.2017.1353613.
37. Douglas C. E., Michael F. A. On distribution-free multiple comparisons in the one-way analysis of variance. *Communications in Statistics - Theory and Methods*. 1991, 20(1), 127–139, DOI: 10.1080/03610929108830487.
38. Miller R. G. *Nonparametric Techniques*. In: Miller RG, editor. *Simultaneous Statistical Inference*, NY: Springer, 1981. 129–188, DOI: 10.1007/978-1-4613-8122-8\_4.
39. Madra S., Styles J., Smith A. G. Perturbation of hepatocyte nuclear populations induced by iron and polychlorinated biphenyls in C57BL/10ScSn mice during carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 1995, 16(4), 719–727, DOI: 10.1093/carcin/16.4.719.
40. Jácome F. C., Caldas G. C., Rasinhas A. C., de Almeida A. L. T., de Souza D. D. C., Paulino A. C., et al. Comparative analysis of liver involvement caused by two DENV-2 lineages using an immunocompetent murine model. *Sci. Rep.* 2021, 11(1), 9723, DOI: 10.1038/s41598-021-88502-2.
41. Missbach-Guentner J., Pinkert-Leetsch D., Dullin C., Ufartes R., Hornung D., Tampe B., et al. 3D virtual histology of murine kidneys -high resolution visualization of pathological alterations by micro computed tomography. *Sci. Rep.* 2018, 8, 1407, DOI: 10.1038/s41598-018-19773-5.
42. Sadeghinezhad J., Nyengaard J. R. Oxaliplatin Treatment for 3-Weeks Does not Affect Mice Kidney Structure: A Stereological Study. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*. 2022, 16(2), 101–119, DOI: 10.22059/IJVM.2021.311503.1005132.

43. Baldelomar E. J., Charlton J. R., Beeman S. C., Hann B. D., Cullen-McEwen L., Pearl V. M., et al. Phenotyping by magnetic resonance imaging nondestructively measures glomerular number and volume distribution in mice with and without nephron reduction. *Kidney Int.* 2016, 89(2), 498–505, DOI: 10.1038/ki.2015.316.
44. Sato F., Tsuchihashi S., Kawashima N. Age changes in number and size of the murine renal glomeruli. *Exp. Gerontol.* 1975, 10, 325–331, DOI: 10.1016/0531-5565(75)90022-4.
45. Pislyagin E. A., Manzhulo I. V., Dmitrenok P. S., Aminin D. L. Cucumarioside A2-2 causes changes in the morphology and proliferative activity in mouse spleen. *Acta Histochem.* 2016, 118(4), 387–392, DOI: 10.1016/j.acthis.2016.03.009.
46. Meyer E. M., Schlake W., Grundmann E. Comparative histologic, histochemical, and histomorphometric studies of T and B cell areas in peripheral lymphoid organs of normal young adult BALB/C mice. *Pathol. Res. Pract.* 1979, 164(2), 141–156, DOI: 10.1016/s0344-0338(79)80019-9.
47. Cherkasova M. N., Zhukhovitskii V. G., Borovaya T. G. Comparative Characteristics of the Spleen White Pulp in Experimental Models of Sepsis Caused by Different Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2020, 170(1), 46–48, DOI: 10.1007/s10517-020-05001-6.
48. Harrison A. P., Erlwanger K. H., Elbrønd V. S., Andersen N. K., Unmack M. A. Gastrointestinal-tract models and techniques for use in safety pharmacology. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 2004, 49(3), 187–199, DOI: 10.1016/j.vascn.2004.02.008.
49. Pusztaszeri M. P., Genta R. M., Cryer B. L. Drug-induced injury in the gastrointestinal tract: clinical and pathologic considerations. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 2007, 4, 442–453, DOI: 10.1038/ncpgasthep0896.
50. Remmer H. The role of the liver in drug metabolism. *Am. J. Med.* 1970, 49(5), 617–629, DOI: 10.1016/s0002-9343(70)80129-2.
51. Xu C., Li C. Y.-T., Kong A.-N. T. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch. Pharm. Res.* 2005, 28(3), 249–268, DOI: 10.1007/BF02977789.
52. Grant D. M. Detoxification pathways in the liver. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1991, 14(4), 421–430, DOI: 10.1007/BF01797915.
53. Apte U., Krishnamurthy P. Detoxification functions of the liver. In: Monga SPS, editor. *Molecular pathology of liver diseases*. Berlin: Springer; 2011. 147–463, DOI: 10.1007/978-1-4419-7107-4\_11.
54. You L. Steroid hormone biotransformation and xenobiotic induction of hepatic steroid metabolizing enzymes. *Chem. Biol. Interact.* 2004, 147(3), 233–246, DOI: 10.1016/j.cbi.2004.01.006.
55. Kleiner D. E. The histopathological evaluation of drug-induced liver injury. *Histopathology.* 2017, 70(1), 81–93, DOI: 10.1111/his.13082.
56. Khairnar S. I., Kulkarni Y. A., Murugesan S., Singh K. Effects of Acute and Repeated Dose Toxicity Profiling of Chelidonic Acid in Rats: *in Silico* and *in vivo* Evidence. *Chem. Biodivers.* 2023, 20(12), e202301241, DOI: 10.1002/cbdv.202301241.
57. Lohr J. W., Willsky G. R., Acara M. A. Renal drug metabolism. *Pharmacol. Rev.* 1998, 50(1), 107–141.
58. Miners J. O., Yang X., Knights K. M., Zhang L. The Role of the Kidney in Drug Elimination: Transport, Metabolism, and the Impact of Kidney Disease on Drug Clearance. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2017, 102(3), 436–449, DOI: 10.1002/cpt.757.
59. Knights K. M., Rowland A., Miners J. O. Renal drug metabolism in humans: the potential for drug-endobiotic interactions involving cytochrome P450 (CYP) and UDP-glucuronosyltransferase (UGT). *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2013, 76(4), 587–602, DOI: 10.1111/bcp.12086.
60. Radi Z. A. Kidney Pathophysiology, Toxicology, and Drug-Induced Injury in Drug Development. *Int. J. Toxicol.* 2019, 38(3), 215–227, DOI: 10.1177/1091581819831701.
61. Kim S. Y., Moon A. Drug-induced nephrotoxicity and its biomarkers. *Biomol. Ther. (Seoul).* 2012, 20(3), 268–272, DOI: 10.4062/biomolther.2012.20.3.268.
62. Fuchs T. C., Hewitt P. Biomarkers for drug-induced renal damage and nephrotoxicity—an overview for applied toxicology. *AAPS J.* 2011, 13(4), 615–631, DOI: 10.1208/s12248-011-9301-x.

63. Troth S. P., Simutis F., Friedman G. S., Todd S., Sistare F. D. Kidney Safety Assessment: Current Practices in Drug Development. *Semin. Nephrol.* 2019, 39(2), 120–131, DOI: 10.1016/j.semnephrol.2018.12.002.
64. Griffin B. R., Faubel S., Edelstein C. L. Biomarkers of Drug-Induced Kidney Toxicity. *Therapeutic Drug Monitoring.* 2019, 41(2), 213–226, DOI: 10.1097/FTD.0000000000000589.
65. Huang J. X., Blaskovich M. A., Cooper M. A. Cell- and biomarker-based assays for predicting nephrotoxicity. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2014, 10(12), 1621–1635, DOI: 10.1517/17425255.2014.967681.
66. Nasibov T., Gorokhova A., Brazovsky K., Ryzhkova A., Porokhova E., Avdeeva E., et al. Potential Transmembrane Proteins-transporters of Chelidonic Acid for its Intracellular Uptake: In Silico Simulation. *Pharm. Res.* 2025, 42(10), 1749–1773, DOI: 10.1007/s11095-025-03934-z.
67. Szabo L., Morey R., Palpant N. J., Wang P. L., Afari N., Jiang C., et al. Statistically based splicing detection reveals neural enrichment and tissue-specific induction of circular RNA during human fetal development. *Genome Biol.* 2015, 16(1), 126, DOI: 10.1186/s13059-015-0690-5.
68. Dai Y., Lee C.-H. Transport mechanism and structural pharmacology of human urate transporter URAT1. *Cell Res.* 2024, 34, 776–787, DOI: 10.1038/s41422-024-01023-1.
69. Khairnar S. I., Kulkarni Y. A., Singh K. Mitigation of cisplatin-induced nephrotoxicity by chelidonic acid in Wistar rats. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2024, 81, 127321, DOI: j.jtemb.2023.127321.

## Об авторах

**Анна Владимировна Горохова**, ассистент, лаборант-исследователь, кафедра морфологии и общей патологии, Сибирский государственный медицинский университет, Россия.

ORCID: 0000-0001-8401-7181

E-mail: a.gorokhova3062@gmail.com

**Темур Фиррудин оглы Насибов**, ассистент, лаборант-исследователь, кафедра морфологии и общей патологии, Сибирский государственный медицинский университет, Россия.

ORCID: 0000-0002-8056-3967

E-mail: temur.nsbv@gmail.com

**Алина Юрьевна Рыжкова**, студентка, медико-биологический факультет, Сибирский государственный медицинский университет, Россия.

ORCID: 0000-0002-7862-7992

E-mail: alya.ryzhkova.20031@gmail.com

**Анастасия Владимировна Лешенкова**, студентка, медико-биологический факультет, Сибирский государственный медицинский университет, Россия.

ORCID: 0009-0003-5358-9795

E-mail: nasya14.a@gmail.com

**Екатерина Даниловна Порохова**, ассистент, кафедра морфологии и общей патологии, Сибирский государственный медицинский университет, Россия.

ORCID: 0000-0002-7317-2036

E-mail: porohova\_e@mail.ru

**Анна Николаевна Дзюман**, кандидат медицинских наук, доцент, кафедра морфологии и общей патологии, Сибирский государственный медицинский университет, Россия.

ORCID: 0000-0002-0795-0987

E-mail: dzyuman.an@ssmu.ru

**Елена Юрьевна Авдеева**, доктор фармацевтических наук, профессор, кафедра фармацевтического анализа, Сибирский государственный медицинский университет, Россия.

ORCID: 000-0001-7061-9843

E-mail: avdeeva.ey@ssmu.ru

**Михаил Валерьевич Белоусов**, доктор фармацевтических наук, заведующий кафедрой, кафедра фармацевтического анализа, Сибирский государственный медицинский университет, Россия.

ORCID: 0000-0002-2153-7945

E-mail: belousov.mv@ssmu.ru

**Игорь Альбертович Хлусов**, доктор медицинских наук, профессор, кафедра морфологии и общей патологии, руководитель, лаборатория клеточных и микрофлюидных технологий, Сибирский государственный медицинский университет, Россия.

ORCID: 0000-0003-3465-8452

E-mail: khlusov63@mail.ru

## The authors

**Anna V. Gorokhova**, Assistant Professor, Research Assistant, Department of Morphology and General Pathology, Siberian State Medical University, Russia.

ORCID: 0000-0001-8401-7181

E-mail: a.gorokhova3062@gmail.com

**Temur F. Nasibov**, Assistant Professor, Research Assistant, Department of Morphology and General Pathology, Siberian State Medical University, Russia.

ORCID: 0000-0002-8056-3967

E-mail: temur.nsbv@gmail.com

**Alina Yu. Ryzhkova**, Student, Faculty of Medical and Biological Sciences, Siberian State Medical University, Russia.

ORCID: 0000-0002-7862-7992

E-mail: alya.ryzhkova.20031@gmail.com

**Anastasia V. Leshenkova**, Student, Faculty of Medical Biology, Siberian State Medical University, Russia.

ORCID: 0009-0003-5358-9795

E-mail: nasya14.a@gmail.com

**Ekaterina D. Porokhova**, Assistant Professor, Department of Morphology and General Pathology, Siberian State Medical University, Russia.

ORCID: 0000-0002-7317-2036

E-mail: porohova\_e@mail.ru

**Anna N. Dzyuman**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Morphology and General Pathology, Siberian State Medical University, Russia.

ORCID: 0000-0002-0795-0987

E-mail: dzyuman.an@ssmu.ru

**Elena Yu. Avdeeva**, Dr. habil. (Pharmaceutics), Professor, Department of Pharmaceutical Analysis, Siberian State Medical University, Russia.

ORCID: 000-0001-7061-9843

E-mail: avdeeva.ey@ssmu.ru

**Mikhail V. Belousov**, Dr. habil. (Pharmaceutics), Head of the Department of Pharmaceutical Analysis, Siberian State Medical University, Russia.

ORCID: 0000-0002-2153-7945

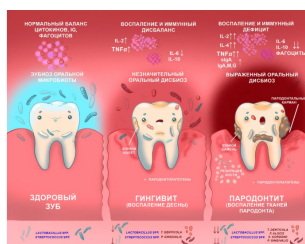
E-mail: belousov.mv@ssmu.ru

**Igor A. Khlusov**, Dr. habil. (Medicine), Professor, Department of Morphology and General Pathology; Head, Laboratory of Cellular and Microfluidic Technologies, Siberian State Medical University, Russia.

ORCID: 0000-0003-3465-8452

E-mail: khlusov63@mail.ru

Оригинальная исследовательская статья

ТАКСОНОМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОРАЛЬНЫХ  
МИКРОБИОМОВ У ПАЦИЕНТОВ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ  
ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПАРОДОНТА И ИХ ВЗАИМОСВЯЗЬ  
С ИММУНОЛОГИЧЕСКИМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИИ. А. Гимранова<sup>1\*</sup>, Г. М. Акмалова<sup>1</sup>, Е. М. Гареев<sup>1</sup>, В. А. Гриценко<sup>2</sup><sup>1</sup> Башкирский государственный медицинский университет,  
450008, Россия, Уфа<sup>2</sup> Оренбургский федеральный исследовательский центр  
УрО РАН (Институт клеточного  
и внутриклеточного симбиоза УрО РАН),  
460000, Россия, Оренбург

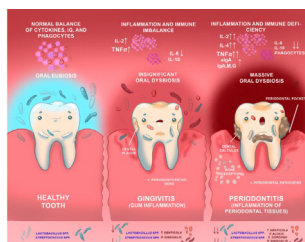
\* Автор-корреспондент: mia8408@mail.ru

**Резюме:** Обоснование роли пародонтопатогенных микроорганизмов при воспалительных заболеваниях пародонта и запущенного ими иммунного ответа в патогенезе может открыть новые возможности для диагностики, профилактики и лечения данной патологии.**Цель** — анализ взаимосвязей между таксономическими особенностями микробиома содержимого десневой борозды / пародонтального кармана и иммунологическими показателями у пациентов с гингивитом и хроническим генерализованным пародонтитом (ХГП) различной степени тяжести.**Материалы и методы.** Проводили секвенирование гена 16S рРНК в соответствии с протоколом Illumina для определения видового состава микробиома содержимого десневой борозды и пародонтального кармана 84 пациентов. В отобранных образцах методом иммуноферментного анализа определяли концентрацию про- и противовоспалительных цитокинов. В периферической крови обследованных лиц оценивали содержание иммуноглобулинов А, М и G и фагоцитарной активности нейтрофилов. Статистическая обработка данных и их корреляционный анализ проводились с помощью программного пакета Statistica 10.**Результаты и обсуждение.** Установлено, что у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта в ротовой жидкости повышались уровни ИЛ-2, ФНО $\alpha$  и ИЛ-4, а также sIgA на фоне статистически значимого снижения уровней ИЛ-6 и ИЛ-10. В периферической крови у пациентов с ХГП отмечались дисиммуноглобулинемия и снижение фагоцитарной активности лейкоцитов. Выявлены значимая «положительная» корреляция между наличием в оральном микробиоме представителей вида *V. dispar* и повышением уровней ФНО $\alpha$ , ИЛ-2, ИЛ-4 и sIgA ( $\tau = 0,27 \dots 0,36$ ,  $p < 0,05$ ), а также «отрицательная» корреляция встречаемости ассоциации *F. nucleatum*, *T. forsythia* и *F. alocis* с рядом иммунологических показателей — ФНО $\alpha$ , ИЛ-2, ИЛ-4, sIgA, IgA, IgM, IgG ( $\tau = -0,57 \dots -0,86$ ,  $p < 0,01$ ).**Закключение.** Присутствие в оральном микробиоме у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *F. alocis* и *V. dispar* приводит к угнетению клеточного и гуморального звеньев иммунитета и является потенциальным биомаркером тяжелого прогрессирующего течения заболевания, что необходимо учитывать при проведении комплексной терапии.**Ключевые слова:** гингивит, пародонтит, микробиом, *Porphyromonas gingivalis*, *Filifactor alocis*, *Veillonella dispar*, иммунный статус, цитокины

## Для цитирования:

Гимранова И. А.,  
Акмалова Г. М., Гареев Е. М.,  
Гриценко В. А. Таксономические  
особенности оральных микробио-  
мов у пациентов с воспалительными  
заболеваниями пародонта и их  
взаимосвязь с иммунологическими  
показателями. *Современные направле-  
ния в биомедицине*. 2026;2(1):124–136.  
<https://doi.org/10.5922/ATB-2026-2-1-8>Поступила  
12.03.2026 г.  
Прошла рецензирование  
24.04.2026 г.  
Принята к печати  
28.04.2026 г.  
Опубликована  
09.09.2026 г.© Гимранова И. А., Акмалова Г. М.,  
Гареев Е. М., Гриценко В. А., 2026  
© Оформление, БФУ им. И. Канта,  
2026

Original research article

TAXONOMIC COMPOSITION OF THE ORAL MICROBIOME  
AND ITS RELATIONSHIP WITH IMMUNE PARAMETERS  
IN PERIODONTAL INFLAMMATORY DISEASEI. A. Gimranova<sup>1\*</sup>, G. M. Akmalova<sup>1</sup>, E. M. Gareev<sup>1</sup>, V. A. Gritsenko<sup>2</sup><sup>1</sup> Bashkir State Medical University (BSMU), 450008, Ufa, Russia<sup>2</sup> Orenburg Federal Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences), 460000, Orenburg, Russia

\* Correspondence: mia8408@mail.ru

**Abstract:** Elucidating the role of periodontopathogenic microorganisms in inflammatory periodontal diseases and the immune response they trigger in the pathogenesis may open up new opportunities for the diagnosis, prevention, and treatment of this pathology.

The **aim** is to analyze the relationships between the taxonomic features of the microbiome of the gingival sulcus/periodontal pocket contents and immunological indicators in patients with gingivitis and chronic generalized periodontitis (CGP) of varying severity.

**Materials and methods.** The 16S rRNA gene was sequenced according to the Illumina protocol to determine the species composition of the microbiome in the gingival sulcus and periodontal pocket of 84 patients. The concentration of pro- and anti-inflammatory cytokines was determined in the selected samples using enzyme-linked immunosorbent assay. The peripheral blood of the patients was evaluated for the content of immunoglobulins A, M, and G and the phagocytic activity of neutrophils. Statistical data processing and correlation analysis were performed using the Statistica 10 software package.

**Results and discussion.** It was found that patients with inflammatory periodontal diseases had increased levels of IL-2, TNF $\alpha$ , and IL-4 in their oral fluid, as well as sIgA, while there was a statistically significant decrease in the levels of IL-6 and IL-10. In the peripheral blood of patients with CGP, there was a decrease in the phagocytic activity of leukocytes and dysgammaglobulinemia. A significant “positive” correlation was found between the presence of representatives of the *V. dispar* species in the oral microbiome and increased levels of TNF $\alpha$ , IL-2, IL-4, and sIgA ( $\tau = 0.27 \dots 0.36$ ,  $p < 0.05$ ), as well as a negative correlation between the occurrence of *F. nucleatum*, *T. forsythia*, and *F. alocis* with a number of immunological parameters — TNF $\alpha$ , IL-2, IL-4, sIgA, IgA, IgM, IgG ( $\tau = -0.57 \dots -0.86$ ,  $p < 0.01$ ).

**Conclusion.** The presence of *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *F. alocis*, and *V. dispar* in the oral microbiome of patients with chronic generalized periodontitis contributes to the suppression of cellular and humoral immunity and is a potential biomarker of severe and progressive disease, which should be taken into account during comprehensive therapy.

**Keywords:** gingivitis, periodontitis, microbiome, *Porphyromonas gingivalis*, *Filifactor alocis*, *Veillonella dispar*, immune status, cytokines

## To cite this article:

Gimranova I. A.,  
Akmalova G. M., Gareev E. M.,  
Gritsenko V. A. Taxonomic  
composition of the oral microbiome  
and its relationship with immune  
parameters in periodontal  
inflammatory disease. *Advanced targets  
in Biomedicine*. 2026;2(1):124–136.  
<https://doi.org/10.5922/ATB-2026-2-1-8>

Received  
12.03.2026  
Revised  
24.04.2026  
Accepted  
28.04.2026  
Published  
09.09.2026

© Gimranova I. A., Akmalova G. M.,  
Gareev E. M., Gritsenko V. A., 2026  
© Design, IKBFU, 2026

## Введение

Воспалительные заболевания пародонта (ВЗП) (гингивит, пародонтит) относятся к одним из наиболее распространенных заболеваний челюстно-лицевой области, которые по мере прогрессирования способствуют повышению подвижности и потере зубов, что негативно сказывается на качестве жизни пациентов [1; 2]. В основе рецидивирования и генерализации данной патологии лежит хронический вялотекущий и плохо поддающийся купированию инфекционно-воспалительный процесс в тканях пародонта. При этом ключевая роль в этиологии и патогенезе указанных заболеваний принадлежит пародонтопатогенным микроорганизмам и их взаимодействию с гуморальными и клеточными факторами иммунитета организма хозяина [3–5].

Микробиота / микробиом полости рта человека включает более 700 видов различных микроорганизмов, формирующих на поверхности зубов симбиотическую биопленку [6–8]. Возникающие в результате действия различных неблагоприятных факторов (нарушение гигиены полости рта, неправильные пищевые привычки, стрессовые воздействия и др.) дисбиотические сдвиги в оральной микробиоте, сопровождающиеся увеличением пула пародонтопатогенов, способствуют развитию и прогрессированию воспалительных заболеваний пародонта с переходом гингивита в хронический генерализованный пародонтит [2].

Наиболее этиологически значимые при пародонтите микроорганизмы относятся к видам *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и *Tannerella forsythia*, а также *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Streptococcus intermedius*, *Campylobacter rectus*, *Peptostreptococcus micros*, к роду *Spirochetes* и др. Все пародонтопатогены делятся на два порядка: I — включает *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* и *T. forsythia*, которые способствуют быстрому прогрессированию заболевания, поскольку их факторы патогенности / вирулентности причастны к деструкции тканей и внутриклеточному паразитированию возбудителей [9]; II — формируют *T. denticola*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *S. intermedius* и др., которые играют существенную, но менее важную роль в развитии воспалительной патологии пародонта. Однако представители II порядка способны образовывать ассоциации с другими пародонтопатогенами, что в дальнейшем может приводить к воспалению. В такие ассоциации могут вовлекаться *P. gingivalis* и *T. forsythia*, что может инициировать воспалительный процесс в поддесневой области, а консорциумы *P. intermedia* с другими пародонтопатогенами связывают с прогрессированием заболевания [10; 11].

Кроме того, в развитие ВЗП помимо комплекса дисбиотических сдвигов в структуре оральной микробиоты существенный вклад вносят патологические изменения иммунного статуса [12–14], коррелирующие с тяжестью течения гингивита и пародонтита [15]. Стимулируемые поддесневым налетом иммунные клетки обширно инфильтрируют соединительную ткань десны и секретируют множество цитокинов, которые играют ключевую роль в дополнительном привлечении иммунокомпетентных клеток, модуляции активности остеокластов и контроле патогенных микроорганизмов [16]. Такие провоспалительные цитокины, как IL-1 $\beta$  и хемокин CXCL-6, оказывают выраженное регуляторное влияние на ответ иммунных клеток и воспалительный процесс, связанный с деструкцией и резорбцией твердых тканей пародонта [7; 17]. Следует подчеркнуть вовлеченность в патогенез ВЗП различных звеньев адаптивного иммунитета. Так, при экспериментальном моделировании пародонтита у крыс наблюдалось снижение показателей клеточного (общие Т-лимфоциты, Т-хелперы) и гуморального (В-лимфоциты) иммунитета [18].

Необходимо отметить, что пародонтопатогенные микроорганизмы вызывают воспаление и деструкцию в тканях пародонта напрямую, дезинтегрируя соответствующие гистоструктуры пораженного зуба, или опосредованно, когда в ответ на их агрессию запускается комплекс иммунопатологических механизмов, способствующих разрушению альвеолярной кости, что сопровождается изменением состава микробиоты и ростом пародонтопатогенов [19], в результате чего формируется «порочный пато-

генетический круг», обеспечивающий поддержание и прогрессирование патологического процесса в тканях пародонта. В литературе имеется сравнительно мало данных о корреляции между встречаемостью определенных видов микроорганизмов и изменениями в показателях иммунного статуса, которые отражают прогрессирование пародонтита [20; 21]. При этом в фокусе таких исследований, как правило, оказывается узкий круг известных пародонтопатогенов, тогда как взаимоотношения других представителей оральной микробиоты с иммунной системой человека при ВЗП остаются малоизученными.

## Цель исследования

Анализ взаимосвязей между таксономическими особенностями микробиома содержимого десневой борозды / пародонтального кармана и иммунологическими показателями у пациентов с гингивитом и хроническим генерализованным пародонтитом различной степени тяжести.

## Материалы и методы

В исследовании были проанализированы составы микробиома содержимого десневой борозды и пародонтального кармана и ряд иммунологических параметров у 84 пациентов, обратившихся за лечением к стоматологу в стоматологическую клинику «Примадент» г. Уфы за период с 2021 по 2023 г. Пациенты с клинически подтвержденными диагнозами воспалительных заболеваний пародонта были разделены на 4 группы: 15 — с гингивитом (средний возраст 31,4 года); 30 — с ХГП легкой степени тяжести (49,8 года); 39 — с ХГП средней степени тяжести (53,4 года); в группу сравнения (контроль) входил 21 здоровый человек без признаков ВЗП (29,1 года). При этом из работы были исключены пациенты, в анамнезе которых имелись системные заболевания, острые и хронические соматические заболевания в стадии декомпенсации, онкологические заболевания, наличие ВИЧ-инфекции, гепатитов В и С, прием антибиотиков, гормональных препаратов и цитостатиков за 4 месяца до исследования, беременность, кормление грудью, курение. От каждого участника было получено информированное согласие на участие в исследовании, гарантирующее добровольность и осознанность их участия в процессе. Данный подход обеспечил репрезентативность выборки и минимизировал влияние посторонних факторов на результаты исследования.

Забор биоматериала проводился врачом-пародонтологом путем введения стерильных бумажных конусных эндодонтических штифтов Absorbent Paper Points размером № 20 по ISO (META BIOMED, Южная Корея) на глубину десневой борозды или пародонтального кармана на 15 с. Штифты затем помещали в стерильные пробирки с транспортной средой (DNA/RNA Shield, Zymo Research, USA). Далее полученный материал доставляли в лабораторию, где для проведения молекулярно-генетических исследований из образцов, предварительно гомогенизированных в лизирующем растворе с шариками, осуществляли выделение ДНК методом сорбентной колонки (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Germantown, MD, USA) в соответствии с рекомендациями производителя. Секвенирование проводили в генетической лаборатории «Сербалаб» (Санкт-Петербург). Библиотеки для секвенирования 16S ДНК готовили в соответствии с протоколом Illumina по подготовке 16S метагеномных библиотек для секвенирования (16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. Part #15044223 Rev. B). Наборы реагентов были приобретены у компании Illumina (Illumina, San Diego, CA, USA). Секвенирование проводили на платформе Illumina (модель устройства MiSeq) с длиной парных прочтений 2×300 п. н. Для амплификации целевого фрагмента гена 16S рРНК с помощью рекомендованных праймеров для области V3-V4 использовали 5 нг общей ДНК на образец. Проводили 25 циклов ПЦР с использованием смеси KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2× двухстадийная ПЦР) (Roche Diagnostics, Цуг, Швейцария), обра-

ботку полученных данных осуществляли с помощью биоинформатического пайплайна на языках программирования R v.3.6 и Python3. На первом этапе обработки последовательности праймеров для парных прочтений обрезались, а прочтения, которые не содержали праймеры, удалялись. Затем удалялись прочтения с плохим качеством (phred скор<sup>1</sup> — менее 10) и короткие прочтения (меньше 200 п. н.), оставшиеся данные обрабатывали с помощью конвейера DADA2 для выявления точных вариантов последовательностей [22]. На каждый образец приходилось от 20 000 до 80 000 прочтений. Далее полученные последовательности использовали для таксономической идентификации по методу Naïve Bayes с использованием референсной базы данных SILVA v138 [23]. Таксономическая идентификация полученных точных вариантов последовательностей выполнялась с использованием метода Naïve Bayes, реализованного в функции пакета DADA2 в среде R, с применением референсной базы данных SILVA v138 [23].

Концентрацию цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ФНО $\alpha$ ) и секреторного иммуноглобулина А (sIgA) в содержимом десневой борозды или пародонтального кармана определяли методом иммуноферментного анализа с использованием реактивов фирмы ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ» (Новосибирск). Также производили забор венозной крови из локтевой вены натощак; в сыворотке крови методом радиальной иммунодиффузии в геле по Манчини с использованием моноспецифических антисывороток определяли содержание IgA, IgM и Ig G. Для оценки неспецифического звена иммунитета устанавливали фагоцитарную активность нейтрофилов с использованием метода с латексными частицами.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программного пакета Statistica 10. Для оценки встречаемости бактерий у пациентов разных групп использовали коэффициент корреляции Крамера (V) [24], при этом учитывались лишь те зависимости, у которых коэффициент находился в области не ниже средней степени и выше — от порядка 0,5 и более. Оценка иммунологических показателей у обследуемых групп пациентов осуществлялась с применением дисперсионного анализа — параметрического по Фишеру или непараметрического по Краскелу — Уоллесу, который применялся в тех случаях, когда анализируемые данные не могли рассматриваться как модификации «нормального распределения» Гаусса. Для исследования корреляции между встречаемостью бактерий определенного вида, а также их ассоциаций и иммунологическими показателями (уровни ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ФНО $\alpha$ , sIgA, концентрации сывороточных IgA, IgM и IgG, фагоцитарный показатель, фагоцитарный индекс) использовали т-коэффициент ранговой корреляции Кендэла.

## Результаты и обсуждение

В результате метагеномных исследований были определены доминирующие виды микроорганизмов у здоровых людей из группы сравнения, а также у пациентов с гингивитом, ХГП легкой и средней степеней тяжести (ХГП-ЛС и ХГП-СС, соответственно).

Так, у здоровых людей в содержимом десневой борозды обнаружено преобладание таких видов бактерий, как *Streptococcus pseudopneumoniae*, *S. parasanguinis*, *Haemophilus haemolyticus*, *Lactobacillus fermentum* / *plantarum* / *reuteri* / *salivarius*, которые встречались чаще, чем при ВЗП. У пациентов с гингивитом отмечалось преобладание видов *Gemella haemolysans*, *Streptococcus anginosus*, *Aggregatibacter segnis*, *Veillonella parvula*, *Leptotrichia wadei*, причем у них в низкой концентрации было идентифицировано большинство таксонов бактерий, которые не выявлялись у здоровых людей, но были характерны для микробиоты пародонтальных карманов пациентов с ХГП, в частности *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *F. nucleatum*, *Filifactor alocis*, *Capnocytophaga sputigena*.

<sup>1</sup> Phred скор (Phred quality score) — логарифмическая метрика надежности определения нуклеотидов при автоматическом секвенировании ДНК.

Результаты корреляционного анализа свидетельствовали о наличии статистически значимой взаимосвязи между частотой встречаемости бактерий определенных видов и групповой принадлежностью пациентов с разными вариантами ВЗП, в том числе с учетом степени тяжести ХГП (табл. 1). В таблице представлены данные только по некоторым видам бактерий, коэффициенты корреляции которых с ВЗП находились на уровне средних значений и выше ( $V = 0,50$  и более).

Таблица 1

**Частота встречаемости бактерий некоторых видов  
в десневой борозде / пародонтальном кармане у обследованных лиц  
и ее корреляция с групповой принадлежностью пациентов**

Table 1

**The frequency of occurrence of certain types of bacteria  
in the gingival sulcus / periodontal pocket in the examined individuals  
and its correlation with the group affiliation of the patients**

| Вид бактерий                                                                   | Частота встречаемости бактерий данного вида<br>у обследованных лиц в анализируемых группах, % |                      |                    |                    | Коэффициент<br>корреляции<br>Крамера (V) |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|--------------------|--------------------|------------------------------------------|
|                                                                                | Здоровые<br>(n = 21)                                                                          | Гингивит<br>(n = 15) | ХГП-ЛС<br>(n = 30) | ХГП-СС<br>(n = 39) |                                          |
| <i>F. nucleatum</i>                                                            | 0                                                                                             | 0                    | 73                 | 82                 | 0,70                                     |
| <i>P. gingivalis</i>                                                           | 5                                                                                             | 13                   | 70                 | 82                 | 0,64                                     |
| <i>V. dispar</i>                                                               | 0                                                                                             | 0                    | 67                 | 62                 | 0,56                                     |
| <i>F. alocis</i>                                                               | 0                                                                                             | 7                    | 53                 | 67                 | 0,57                                     |
| <i>T. denticola</i>                                                            | 0                                                                                             | 40                   | 47                 | 59                 | 0,54                                     |
| <i>S. gordonii</i>                                                             | 0                                                                                             | 7                    | 37                 | 51                 | 0,54                                     |
| <i>L. fermentum</i> / <i>plantarum</i> /<br><i>reuteri</i> / <i>salivarius</i> | 86                                                                                            | 80                   | 3                  | 15                 | 0,71                                     |
| <i>Streptococcus spp.</i>                                                      | 100                                                                                           | 93                   | 53                 | 41                 | 0,50                                     |

Так, наиболее выраженная корреляционная взаимосвязь ( $V = 0,70$ ,  $p < 0,0001$ ) выявлена между обнаружением в оральном микробиоме (десневая борозда / пародонтальный карман) *F. nucleatum* и наличием у пациентов с ХГП. При этом бактерии данного вида были детектированы у большинства пациентов с ХГП-ЛС (73 %) и ХГП-СС (82 %), тогда как у больных гингивитом и здоровых лиц из группы сравнения они не обнаруживались. Сходная корреляционная взаимосвязь ( $V = 0,64$ ,  $p < 0,0001$ ) наблюдалась при анализе частоты встречаемости бактерий вида *P. gingivalis*, которые регистрировались у подавляющего большинства пациентов при ХГП легкой и средней степеней тяжести — 70 и 82 % соответственно. При переходе ХГП от легкой к средней степени тяжести данный пародонтопатоген встречался несколько чаще, хотя различия оказались статистически незначимыми ( $p > 0,23$ ). Полученные результаты согласуются с данными других исследований [25; 26], что может свидетельствовать о значении вегетирования *P. gingivalis* в инициации нарушений гомеостатического баланса нормальной микробиоты полости рта с последующим развитием воспаления пародонта.

Статистически достоверная корреляция ( $V = 0,56$ ,  $p < 0,0001$ ) выявлена между групповой принадлежностью обследованных лиц и частотой встречаемости *V. dispar* (табл. 1). Доли пациентов с ХГП разной тяжести, у которых были обнаружены бактерии данного вида в изученных образцах, различались несущественно — 67 % в группе с легкой степенью и 62 % в группе со средней степенью патологии; при этом в материале от здоровых лиц и больных гингивитом указанные бактерии не регистрирова-

лись. Аналогичное заключение относилось и к частоте встречаемости *F. alocis* ( $V = 0,57$ ,  $p < 0,0001$ ) — у пациентов с ХГП легкой и средней степенями тяжести бактерии этого вида встречались в 53 и 67 % случаев соответственно, тогда как у здоровых лиц они не выявлялись, а у больных гингивитом обнаруживались всего в 7 % случаев (табл. 1). В образцах содержимого десневой борозды здоровых людей *T. denticola* не была обнаружена, а в материале от пациентов с гингивитом и ХГП частота выявления бактерий данного вида была одинаково высокой (40—59 %,  $p > 0,05$ ) и статистически значимо коррелировала с наличием ВЗП ( $V = 0,54$ ,  $p < 0,0001$ ). С наличием у пациентов ВЗП коррелировало обнаружение у них в оральном микробиоме бактерий вида *S. gordonii* ( $V = 0,54$ ,  $p < 0,0001$ ), причем они градиентно чаще встречались в ряду «гингивит — ХГП-ЛС — ХГП-СС» (7, 37 и 51 % соответственно). Эти результаты указывают на причастность бактерий данных видов к развитию и прогрессированию воспалительной патологии пародонта (табл. 1).

Отметим, что диспропорция детектирования у обследованных лиц такого известного пародонтопатогена, как *T. forsythia*, оказалась менее выраженной, а корреляция с ВЗП — более слабой, чем в описанных выше случаях ( $V = 0,46$ ,  $p < 0,0001$ ), хотя и фиксировалось градиентное увеличение частоты встречаемости этих микроорганизмов в анализируемых группах — здоровые, пациенты с гингивитом, пациенты с ХГП-ЛС и ХГП-СС — от 10 до 85 %.

Вместе с тем выявлена и «обратная» корреляционная связь наличия ВЗП с частотой встречаемости в исследуемом материале бактерий некоторых видов / родов, прежде всего таких представителей нормальной оральной микробиоты, как лактобациллы и стрептококки. Например, бактерии рода *Lactobacillus* обнаруживались у большинства здоровых лиц и пациентов с гингивитом (86 и 80 % случаев соответственно) и гораздо реже у пациентов с ХГП легкой и средней степеней тяжести — в 3 и 15 % случаев соответственно ( $V = 0,71$ ,  $p < 0,0001$ ). Подобная зависимость отмечалась и при анализе частоты встречаемости в ротовой полости бактерий рода *Streptococcus* ( $V = 0,50$ ,  $p < 0,0001$ ), которые у пациентов с ХГП выявлялись почти в два раза реже, чем у здоровых людей и больных гингивитом (табл. 1). Следует отметить, что стрептококки относятся к доминирующим микроорганизмам оральной нормобиоты, однако некоторые представители этого рода, в частности *S. gordonii* и *S. intermedius*, могут участвовать в развитии пародонтита [27].

Полученные данные свидетельствуют о том, что прогрессирование ВЗП сопряжено с изменениями в видовом составе микробиома ротовой полости, которые выражаются в преобладании вегетирования в указанном биотопе пародонтопатогенов на фоне снижения его колонизации лактобациллами и стрептококками. Это укладывается в логику патогенеза ВЗП, поскольку известно, что лактобациллы, обладая высокой адгезивной способностью и выраженной антагонистической активностью, могут конкурировать с пародонтопатогенными бактериями за рецепторы прикрепления к эпителиальным клеткам, ингибировать образование ими биопленок и препятствовать их размножению [28—31]. Очевидно, «угнетение» пролиферации *Lactobacillus* spp. (возможно, и некоторых видов бактерий рода *Streptococcus*) ассоциируется со снижением колонизационной резистентности орального биотопа, создавая благоприятные условия для роста и размножения пародонтопатогенов разной видовой принадлежности, что способствует развитию и прогрессированию ВЗП с вовлечением в патологический процесс иммунной системы организма.

В этой связи нами проведен анализ ряда иммунологических показателей у обследованных лиц, который показал, что у пациентов с ВЗП (гингивит и ХГП) уровни про-(ИЛ-2 и ФНО $\alpha$ ) и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4), а также sIgA повышались на фоне снижения уровней ИЛ-10 и ИЛ-6 и параметров фагоцитарной активности (табл. 2).

Таблица 2

**Иммунологические показатели у обследованных лиц  
в анализируемых группах, Me (Q1 и Q2)**

Table 2

**Immunological indicators in the examined individuals  
in the analyzed groups, Me (Q1 and Q2)**

| Показатель                      | Значение иммунологических показателей<br>у обследованных лиц в анализируемых группах |                      |                       |                       |
|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                                 | Здоровые<br>(n = 21)                                                                 | Гингивит (n = 15)    | ХГП-ЛС<br>(n = 30)    | ХГП-СС<br>(n = 39)    |
| ИЛ-2, пг/мл                     | 11,3 (11,0; 11,6)                                                                    | 12,8 (12,5; 13,1)*   | 15,4 (14,3; 16,2)*    | 26,5 (24,3; 27,0)*    |
| ИЛ-4, пг/мл                     | 3,3 (3,1; 4,0)                                                                       | 4,3 (4,3; 4,8)       | 4,6 (4,2; 4,9)        | 6,8 (6,1; 6,9)*       |
| ИЛ-6, пг/мл                     | 1,0 (0,9; 1,0)                                                                       | 0,9 (0,9; 1,0)*      | 0,9 (0,7; 1,0)*       | 0,8 (0,7; 0,8)*       |
| ИЛ-10, пг/мл                    | 9,5 (8,9; 9,8)                                                                       | 8,1 (7,8; 8,2)*      | 4,1 (3,9; 4,5)*       | 2,2 (2,0; 2,4)*       |
| ФНО α, пг/мл                    | 3,3 (2,7; 4,2)                                                                       | 9,5 (8,5; 15,6)*     | 19,4 (17,5; 23,2)*    | 44,8 (41,6; 48,8)*    |
| sIgA, г/л                       | 211,0 (159,8; 262,2)                                                                 | 176,0 (138,9; 213,1) | 389,9 (327,7; 461,1)* | 466,4 (393,3; 539,5)* |
| IgA, г/л                        | 1,6 (1,4; 1,9)                                                                       | 1,8 (1,5; 2,3)       | 2,0 (1,5; 2,3)*       | 4,21 (3,7; 5,0)*      |
| IgM, г/л                        | 1,4 (1,1; 1,6)                                                                       | 1,4 (1,0; 1,6)       | 1,3 (1,0; 1,6)        | 2,1 (1,1; 3,6)*       |
| IgG, г/л                        | 13,5 (12,0; 15,0)                                                                    | 12,9 (12,0; 13,8)    | 14,0 (9,6; 14,4)      | 20,2 (15,8; 24,6)*    |
| Фагоцитарный<br>показатель, %   | 58 (56; 68)                                                                          | 56 (52; 68)          | 32 (27; 36)*          | 29 (26; 36)*          |
| Фагоцитарный<br>индекс, об./кл. | 8 (7; 9)                                                                             | 9 (8; 9,5)           | 3 (3; 4)*             | 2,5 (2; 3)*           |

*Примечание:* достоверные изменения по сравнению с группой здоровых лиц ( $p < 0,05$ ).

*Note:* significant changes compared to the group of healthy individuals.

При этом уровни содержания ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10 и ФНОα достоверно значимо зависели от наличия у пациентов той или иной формы ВЗП ( $\chi^2 = 64,2 \dots 88,2$ ,  $p < 0,0001$ ), причем динамика ИЛ-6 и ИЛ-10 носила «зеркальный» характер по отношению к изменениям ИЛ-2, ИЛ-4 и ФНОα. Оценка количества в содержимом десневой борозды / пародонтальном кармане sIgA указывала на модификацию нормального распределения этого показателя ( $D_{\max} = 0,9$ ,  $p > 0,20$ ), в связи с чем анализ зависимости уровня sIgA от групповой принадлежности пациентов проводился параметрическим дисперсионным анализом по Фишеру. Зависимость оказалась достаточно выраженной —  $\eta^2 = 75\%$ ,  $F = 97,5$  ( $p < 0,0001$ ).

Кроме того, у пациентов с ХГП по сравнению со здоровыми людьми и больными гингивитом наблюдалось изменение функциональной активности лейкоцитов периферической крови (табл. 2), а степень снижения фагоцитарного показателя и фагоцитарного индекса зависела от групповой принадлежности обследованных лиц (соответственно  $\chi^2 = 55,0$  и  $\chi^2 = 68,3$ ,  $p < 0,0001$ ).

Выявленные у пациентов с ХГП модификации «цитокинового статуса» и содержания sIgA, очевидно, отражают проявления «смешанного» воспалительного ответа с преобладанием провоспалительной реакции. На активный характер воспаления указывает повышение уровня провоспалительных цитокинов (ИЛ-2 и ФНОα), которое одновременно сочеталось с увеличением содержания противовоспалительного цитокина ИЛ-4 и sIgA, что может отражать «стремление» организма взять под регуляторный контроль течение воспалительного процесса. Вместе с тем снижение уровней ИЛ-10 (важного противовоспалительного цитокина) и ИЛ-6 (имеющего варибельную функциональную активность), вероятно, подтверждает недостаточность противовоспалительного

контроля и указывает на дисбаланс в иммунном ответе со сдвигом в сторону воспаления. В целом охарактеризованные отклонения этих иммунологических параметров, по-видимому, свидетельствуют о неэффективном подавлении уже сформированного и вялотекущего воспалительного процесса при ХГП.

Обращает на себя внимание тот факт, что при переходе ХГП от легкой к средней степени тяжести наблюдалось повышение показателей системного гуморального иммунитета, в частности уровней сывороточных иммуноглобулинов А, М и G (табл. 2). Содержание в сыворотке периферической крови IgA и IgM зависело от наличия у пациентов ВЗП —  $\chi^2 = 75,6$  и  $\chi^2 = 48,6$  соответственно ( $p < 0,0001$ ). Уровень сывороточного IgG также зависел от групповой принадлежности пациентов ( $\eta^2 = 40\%$ ,  $F = 22,6$ ,  $p < 0,0001$ ), причем существенный и значимый скачок среднего уровня IgG до  $20,2 \pm 4,4$  г/л ( $p < 0,0001$ ), как и в рассмотренных выше случаях, имел место лишь у пациентов с ХГП-СС.

Оценивая совокупность представленных данных об иммунологических параметрах обследованных лиц (здоровых и с воспалительной патологией пародонта), необходимо отметить, что наблюдаемые сдвиги иммунного статуса у пациентов с ХГП, очевидно, отражают нарушение у них баланса между врожденным и адаптивным иммунитетом с тенденцией к дисрегуляции иммунного ответа и свидетельствуют о формировании у больных с данной патологией вторичного иммунодефицита на фоне торпидного течения воспаления с длительной антигенной стимуляцией пародонтогенными микроорганизмами.

Это предположение косвенно подтвердили результаты корреляционного анализа, которые выявили достоверные взаимосвязи между встречаемостью в ротовой полости некоторых видов бактерий, а также их ассоциаций и уровнем выраженности отдельных иммунологических показателей.

Так, наличие в оральном микробиоме бактерий *V. dispar* сопровождалось повышением уровней ФНО $\alpha$ , ИЛ-2, ИЛ-4 и sIgA ( $\tau = 0,32$ ,  $\tau = 0,27$ ,  $\tau = 0,36$ ,  $\tau = 0,36$  соответственно,  $p < 0,05$ ), а также ассоциировалось со снижением фагоцитарной активности нейтрофилов ( $\tau = -0,78$ ,  $p < 0,01$ ). В результате анализа взаимосвязей с иммунологическими параметрами бактерий других видов, изолированно встречающихся в содержимом десневой борозды / пародонтальном кармане, значимых корреляций выявлено не было.

Вместе с тем установлено, что значения ряда иммунологических параметров коррелируют с вегетированием в ротовой полости двух и трехкомпонентных ассоциаций некоторых микроорганизмов. В частности, выявлена «отрицательная» корреляция между наличием в оральном биотопе *F. nucleatum*, *F. alocis*, *T. forsythia* (в различных сочетаниях) и уровнями ФНО $\alpha$ , ИЛ-2, ИЛ-4 и sIgA ( $\tau = -0,57 \dots -0,86$ ,  $p < 0,01$ ), а также показателями гуморального иммунитета, а именно IgA, IgM и IgG (соответственно  $\tau = -0,67$ ,  $\tau = -0,71$  и  $\tau = -0,57$ ,  $p < 0,01$ ). Не исключено, что пародонтопатогены могут выделять вещества, подавляющие продукцию цитокинов и синтез sIgA, их сорбцию и/или «деструкцию» (ферментативное расщепление протеазами), тем самым «извращая» иммунный ответ, что способствует персистенции возбудителей в организме и обуславливает хроническое течение и прогрессирование ВЗП.

В то же время наблюдалась «отрицательная» корреляция присутствия в оральном микробиоме *L. fermentum* / *plantarum* / *reuteri* / *salivarius* с такими иммунологическими показателями, как ИЛ-2, ИЛ-4, ФНО $\alpha$  и sIgA (соответственно  $\tau = -0,34$ ,  $\tau = -0,28$ ,  $\tau = -0,36$ ,  $\tau = -0,32$ ,  $p < 0,05$ ), и «положительная» — с фагоцитарной активностью лейкоцитов ( $\tau = 0,78$ ,  $p < 0,01$ ). Это, возможно, связано со способностью *Lactobacillus* spp. ингибировать патогенные микроорганизмы посредством запуска иммунного ответа [29–31] и/или проявлять в отношении пародонтогенов антагонистическую активность.

Безусловно, требуется проведение дальнейших исследований, чтобы подтвердить выявленные закономерности и раскрыть механизмы, лежащие в основе наблюдаемых корреляционных взаимосвязей.

## Заключение

Результаты проведенного исследования указывали на существенные таксономические изменения в оральной микробиоте у пациентов с гингивитом и хроническим генерализованным пародонтитом по сравнению со здоровыми людьми, свидетельствуя о развитии выраженных дисбиотических нарушений в ротовой полости при воспалительных заболеваниях пародонта. Выявлены не только отдельные виды микроорганизмов, но и их ассоциации, играющие, вероятно, решающую роль в этиологии и патогенезе воспалительных заболеваний пародонта. Полученные данные подтверждают необходимость проведения метагеномных исследований для изучения структуры орального микробиома, идентификации новых пародонтопатогенов и/или этиологически значимых многовидовых консорциумов микроорганизмов, а также для анализа характера их взаимодействия (антагонизм / синергизм) и оценки влияния оральной микробиоты на иммунный ответ макроорганизма и ее вклада в развитие сопутствующих (системных) заболеваний с учетом наблюдаемых при воспалительных заболеваниях пародонта изменений иммунологического статуса пациентов, затрагивающих как гуморальное, так и клеточное звено иммунитета и потенциально способствующих распространению (транслокации) инфекции из орального биотопа внутрь организма. Установленный уровень геномного разнообразия и выявленные отличительные характеристики оральной микробиоты могут служить ценным инструментом для диагностики и прогнозирования течения воспалительных заболеваний пародонта, а также для разработки персонализированных стратегий и повышения эффективности терапии и профилактики данной патологии.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи. Все соавторы одобрили окончательную версию рукописи и принимают ответственность за все аспекты работы, включая корректное изучение и урегулирование вопросов, относящихся к точности и добросовестности представленных данных.

### Вклад авторов:

**И. А. Гимранова** — разработка концепции и дизайна научной работы, сбор и обработка материала, составление текста рукописи, критический пересмотр рукописи;

**Г. М. Акмалова** — сбор и обработка материала;

**Е. М. Гареев** — статистическая обработка данных;

**В. А. Гриценко** — разработка концепции и дизайна научной работы, составление текста рукописи, критический пересмотр рукописи.

**Funding.** This research received no external funding.

**Conflict of Interest.** The authors declare no actual or potential conflicts of interest related to this publication. All authors approved the final manuscript and accept accountability for all aspects of the work, including ensuring that any questions concerning its accuracy or integrity are appropriately investigated and resolved.

### Authors' contribution:

**I. A. Gimranova** — development of the concept and design of the study, collection and processing of material, drafting of the manuscript, and critical revision of the manuscript;

**G. M. Akmalova** — collection and processing of material;

**E. M. Gareev** — statistical data processing;

**V. A. Gritsenko** — development of the concept and design of the study, drafting of the manuscript, and critical revision of the manuscript.

## Список литературы

1. Тарасенко С. В., Кулага О. И., Вавилова Т. П. Клинико-биохимические параллели при изучении эффективности применения препарата Дентал Гиалрипайер-02 у пациентов с хроническим пародонтитом. Медицинский алфавит. 2016, 21(284), 5—10, EDN: WNDHIV.
2. Гимранова И. А., Хакимова Л. Р., Акмалова Г. М., Газизуллина Г. Р. Современные методы диагностики заболеваний пародонта: возможности и перспективы (обзор литературы). Клиническая лабораторная диагностика. 2023, 68(9), 570—577, DOI: 10.51620/0869-2084-2023-68-9-570-577.
3. Sharifovich A. D., Alimjanovich R. J. The role of the immune system and oral fluid and blood antimicrobial peptides in patients with chronic generalized periodontitis. The American Journal of Interdisciplinary Innovations and Research. 2023, 5, 64—71, DOI: 10.37547/TAJMSPR/Volume05Issue05-13.
4. Cekici A., Kantarci A., Hasturk H., Van Dyke T. E. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. Periodontology. 2000, 2014, 64(1), 57—80, DOI: 10.1111/prd.12002.
5. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. Trends in immunology. 2014, 35(1), 3—11, DOI: 10.1016/j.it.2013.09.001.
6. Devine D. A., Marsh P. D., Meade J. Modulation of host responses by oral commensal bacteria. J. Oral. Microbiol. 2015, 7, 26941, DOI: 10.3402/jom.v7.26941.
7. Wang R., Hu J., Sun Q., Guo S., Zhang G., Lu A., et al. Identification and validation of endoplasmic reticulum autophagy-related potential biomarkers in periodontitis. Sci. Rep. 2025, 15(1), 24151, DOI: 10.1038/s41598-025-08180-2.
8. Faisal R. H., Ali A. O. Increased bacterial load of Filifactor alocis in deep periodontal pockets discriminate between periodontitis stage 3 and 4. Front. Oral Health. 2025, 6, 1543030, DOI: 10.3389/froh.2025.1543030.
9. Царев В. Н., Арутюнов С. Д., Балмасова И. П., Бабаев Э. А., Николаева Е. Н., Ипполитов Е. В., и др. Молекулярная диагностика пародонтита и метагеномный анализ микробиоты пародонта у пациентов с сахарным диабетом II типа. Бактериология. 2018, 3(2), 30—37, DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-30-37.
10. Царев В. Н., Николаева Е. Н., Ипполитов Е. В. Пародонтопатогенные бактерии — основной фактор возникновения и развития пародонтита. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2017, 5, 101—112, DOI: 10.36233/0372-9311-2017-5-101-112.
11. Чуйкин С. В., Мавзютов А. Р., Чуйкин О. С., Акатьева Г. Г., Кучук К. Н. Исследование пародонтопатогенной микрофлоры методом полимеразной цепной реакции у детей с врожденной расщелиной неба и дефектом после уранопластики. Стоматология детского возраста и профилактика. 2022, 22(1), 19—28, DOI: 10.33925/1683-3031-2021-22-1-19-28.
12. Булгакова А. И., Мавзютов А. Р., Тамарова Э. Р., Васильева Н. А., Швец К. Ю. Клинико-микробиологическое обоснование комплексного лечения больных пародонтитом со средней и тяжелой степенью тяжести с учетом молекулярно-генетической характеристики микробиоты полости рта. Пародонтология. 2017, 22(1), 70—73, EDN: YPSSWH.
13. Царев В. Н., Атрушкевич В., Ипполитов Е., Подпорин М. Сравнительный анализ антимикробной активности пародонтальных антисептиков с использованием автоматизированной системы контроля роста микроорганизмов в режиме реального времени. Пародонтология. 2017, 22(1), 4—10, EDN: YPSSQN.
14. Доменюк Д. А., Давыдов Б. Н., Гильмиярова Ф. Н., Ивченко Л. Г. Влияние тяжести течения сахарного диабета I типа у детей на стоматологический статус и иммунологические, биохимические показатели сыворотки крови и ротовой жидкости. Часть I. Пародонтология. 2017, 2(83), 53—60, EDN: YPRZSP.
15. Дзюба Е. В., Нагаева М. О., Жданова Е. В. Роль иммунологических процессов в развитии воспалительных заболеваний пародонта и возможности их коррекции. Проблемы стоматологии. 2019, 15(2), 24—31, DOI: 10.18481/2077-7566-2019-15-2-25-31.
16. Pan W., Wang Q., Chen Q. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. Int. J. Oral Sci. 2019, 11(3), 30, DOI: 10.1038/s41368-019-0064-z.

17. Plemmenos G., Evangeliou E., Polizogopoulos N., Chalazias A., Deligianni M., Piperi C. Central regulatory role of cytokines in periodontitis and targeting options. *Curr. Med. Chem.* 2021, 28(15), 3032–3058, DOI: 10.2174/0929867327666200824112732.
18. Быкова Н. И., Одольский А. В., Григорян В. А. Показатели клеточного и гуморального иммунитета при экспериментальном воспалении тканей пародонта. *Кубанский научный медицинский вестник.* 2016, 6, 20–26, EDN: XVJHCH.
19. Цыбиков Н. Н., Доманова Е. Т., Зобнин В. В., Игнатов М. Ю., Масло Е. Ю., Исакова Н. В. Свойства десневой жидкости при остром гингивите и хроническом пародонтите. *Российский стоматологический журнал.* 2012, 1, 40–42, EDN: PGJEVJ.
20. Linhartova P. B., Danek Z., Deissova T., Hromcik F., Lipovy B., Szaraz D., et al. Interleukin gene variability and periodontal bacteria in patients with generalized aggressive form of periodontitis. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21(13), 4728, DOI: 10.3390/ijms21134728.
21. Овчаренко Е. С., Еричев В. В., Аксенова Т. В., Мелехов С. В. Иммунологическая и микробиологическая оценка эффективности гигиены полости рта в комплексном лечении больных с воспалительными заболеваниями пародонта. *Медицинский алфавит.* 2017, 3(24), 38–41, EDN: ZVRCZT.
22. Callahan B. J., McMurdie P. J., Rosen M. J., Han A. W., Johnson A. J. A., Holmes S. P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods.* 2016, 13, 581–583, DOI: 10.1038/nmeth.3869.
23. Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2013, 41(Database issue), D590–D596, DOI: 10.1093/nar/gks1219.
24. Гржибовский А. М. Анализ номинальных данных. *Экология человека.* 2008, 8, 58–68, EDN: KXIFZ.
25. Benahmed A. G., Mujawdiya P. K., Noor S., Gasmi A. *Porphyromonas gingivalis* in the development of periodontitis: impact on dysbiosis and inflammation. *Arch. Razi Inst.* 2022, 77(5), 1539–1551, DOI: 10.22092/ARI.2021.356596.1875.
26. Hajishengallis G., Liang S., Payne M. A., Hashim A., Jotwani R., Eskandari M. A., et al. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host Microbe.* 2011, 10(5), 497–506, DOI: 10.1016/j.chom.2011.10.006.
27. Бажутова И. В., Исмагуллин Д. Д., Лямин А. В., Трунин Д. А., Жестков А. В., Разумный В. А. Клиническое значение представителей рода *Streptococcus* при развитии пародонтита. *Инфекция и иммунитет.* 2022, 12(1), 51–58, DOI: 10.15789/2220-7619-CSO-1698.
28. Jamal M., Ahmad W., Andleeb S., Jalil F., Imran M., Nawaz M. A., et al. Bacterial biofilm and associated infections. *J. Chin. Med. Assoc.* 2018, 81(1), 7–11, DOI: 10.1016/j.jcma.2017.07.012.
29. Barzegari A., Kheyrolahzadeh K., Khatibi S. M.H., Sharifi S., Memar M. Y., Vahed S. Z. The battle of probiotics and their derivatives against biofilms. *Infect. Drug. Resistance.* 2020, 13, 659–672, DOI: 10.2147/idr.s232982.
30. Gou H.-Z., Zhang Y.-L., Ren L.-F., Li Z.-J., Zhang L. How do intestinal probiotics restore the intestinal barrier? *Front. Microbiol.* 2022, 13, 929346, DOI: 10.3389/fmicb.2022.929346.
31. Vasiee A., Falah F., Mortazavi S. A. Evaluation of probiotic potential of autochthonous lactobacilli strains isolated from Zabuli yellow kashk, an Iranian dairy product. *J. Appl. Microbiol.* 2022; 133(5), 3201–3214, DOI: 10.1111/jam.15772.

## Об авторах

**Ирина Анатольевна Гимранова**, кандидат медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии, Башкирский государственный медицинский университет, Россия.

ORCID: 0000-0003-3330-9437

E-mail: mia8408@mail.ru

**Гюзель Маратовна Акмалова**, доктор медицинских наук, доцент, декан стоматологического факультета, Башкирский государственный медицинский университет, Россия.

ORCID: 0000-0001-7745-0489

E-mail: akmalova-ekb@yandex.ru

**Евгений Мусинович Гареев**, кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник отдела нейрофизиологии Всероссийского центра глазной и пластической хирургии, Башкирский государственный медицинский университет, Россия.

ORCID: 0000-0002-6561-0892

E-mail: gem46@list.ru

**Виктор Александрович Гриценко**, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН, Россия.

ORCID: 0000-0002-2086-5170

E-mail: vag59@mail.ru

## The authors

**Irina A. Gimranova**, PhD (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Fundamental and Applied Microbiology, Bashkir State Medical University, Russia.

ORCID: 0000-0003-3330-9437

E-mail: mia8408@mail.ru

**Guzel M. Akmalova**, Dr. habil. (Medicine), Associate Professor, Dean of the Faculty of Dentistry, Bashkir State Medical University, Russia.

ORCID: 0000-0001-7745-0489

E-mail: akmalova-ekb@yandex.ru

**Evgeny M. Gareev**, PhD (Biology), Associate Professor, Senior Researcher, Department of Neurophysiology, All-Russian Center for Eye and Plastic Surgery, Bashkir State Medical University, Russia.

ORCID: 0000-0002-6561-0892

E-mail: gem46@list.ru

**Viktor A. Gritsenko**, Dr. habil. (Medicine), Professor, Chief Research Fellow, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; Orenburg Federal Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Russia.

ORCID: 0000-0002-2086-5170

E-mail: vag59@mail.ru

СОВРЕМЕННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ  
В БИОМЕДИЦИНЕ

2026 •  $\frac{\text{Том}}{\text{Vol.}}$  2 • № 1

ADVANCED TARGETS  
IN BIOMEDICINE

Научное электронное издание

Редактор *Е. Т. Иванова*  
Компьютерная верстка *Е. В. Денисенко*

Дата выхода в свет 09.09.2026 г.  
Формат 60×90 1/8. Усл. печ. л. 17,1

