

УДК 616-002-008.953-091

DOI: 10.35693/2500-1388-2022-7-4-250-257

Донор-специфичная продукция цитокинов клетками крови под влиянием иммуномодуляторов: новые аспекты персонализированного подхода в медицине

Л.Т. Волова¹, Н.К. Осина¹, С.И. Кузнецов¹, О.А. Гусякова¹, Д.Г. Алексеев¹,
Е.И. Пугачев¹, С.А. Гончаренко²

¹ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России (Самара, Россия)

²ФГБОУ ВО «Самарский государственный технический университет» (Самара, Россия)

Аннотация

Цель – изучить индуцированную иммуномодуляторами индивидуальную продукцию цитокинов клетками – мононуклеарами периферической крови и оценить потенциал использования данного подхода в качестве универсальной клеточной тест-системы в персонализированной медицине.

Материал и методы. Мононуклеары, изолированные из периферической крови доноров, культивировали *in vitro* в присутствии иммуномодуляторов имунофан и полиоксидоний. После инкубации был проведен иммуоферментный анализ культуральной среды на присутствие провоспалительных цитокинов IL-6, IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 и IFN- α .

Результаты. По итогам проведенного эксперимента было продемонстрировано отсутствие спонтанной или индуцированной иммуномодуляторами продукции IFN- α PBMC-клетками. Эти данные соответствуют сведениям, представленным ранее в медицинской литературе. Также наблюдали четко выраженный ингибирующий эффект обоих иммуномодуляторов на продукцию PBMC-клетками цитокинов MCP-1/CCL2, IL-6, IL-8/CXCL8, наряду с индивидуальной вариабельностью их продукции и накопительным эффектом продукции во времени.

Выводы. Выявленные посредством *in vitro* скрининга особенности продукции провоспалительных цитокинов в питательную среду PBMC-клетками в присутствии иммуномодуляторов могут быть использованы при создании универсальных клеточных тест-систем *in vitro* для персонализированной диагностики ряда социально значимых заболеваний воспалительного и аутоиммунного характера.

Ключевые слова: клеточная биология, мононуклеарные клетки периферической крови, цитокины, иммуномодуляторы, персонализированная медицина.

Конфликт интересов: не заявлен.

Для цитирования:

Волова Л.Т., Осина Н.К., Кузнецов С.И., Гусякова О.А., Алексеев Д.Г., Пугачев Е.И., Гончаренко С.А. **Донор-специфичная продукция цитокинов клетками крови под влиянием иммуномодуляторов: новые аспекты персонализированного подхода в медицине.** *Наука и инновации в медицине.* 2022;7(4):250-257. doi: 10.35693/2500-1388-2022-7-4-250-257

Сведения об авторах

Волова Л.Т. – д-р мед. наук, профессор, директор НИИ «БиоТех».

ORCID: 0000-0002-8510-3118 E-mail: l.t.volova@samsmu.ru

Осина Н.К. – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник НИИ «БиоТех».

ORCID: 0000-0002-0444-8174 E-mail: n.k.osina@samsmu.ru

Кузнецов С.И. – канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник НИИ «БиоТех».

ORCID: 0000-0003-4302-8946 E-mail: s.i.kuznecov@samsmu.ru

Гусякова О.А. – д-р мед. наук, заведующая кафедрой фундаментальной и

клинической биохимии с лабораторной диагностикой.

ORCID: 0000-0001-8140-4135 E-mail: o.a.gusyakova@samsmu.ru

Алексеев Д.Г. – канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник НИИ «БиоТех»,

доцент кафедры общей хирургии.

ORCID: 0000-0003-4185-0709 E-mail: d.g.alekseev@samsmu.ru

Пугачев Е.И. – научный сотрудник НИИ «БиоТех».

ORCID: 0000-0002-3594-0874 E-mail: evgenius@mail.ru

Гончаренко С.А. – студент. ORCID: 0000-0002-8460-9053

E-mail: S.A.Goncharenko@samsmu.ru

Автор для переписки

Осина Наталья Константиновна

Адрес: Самарский государственный медицинский университет,

ул. Чапаевская, 89, г. Самара, Россия, 443099.

E-mail: n.k.osina@samsmu.ru

PBMC – Peripheral Blood Mononuclear Cells – мононуклеарные клетки периферической крови; НК-клетки – клетки натуральные киллеры; E. coli LPS / LPS – бактериальный липосахарид кишечной палочки; IL-8/CXCL8 – интерлейкин 8; IL-6 – интерлейкин 6; TNF- α – фактор некроза опухоли-альфа; IFN- α – интерферон-альфа; СОКСПК – Самарская областная клиническая станция переливания крови; MCP-1/CCL2 – моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1.

Рукопись получена: 14.10.2022

Рецензия получена: 28.10.2022

Решение о публикации принято: 07.11.2022

Donor-specific production of cytokines by blood cells under the influence of immunomodulators: New aspects of a personalized approach in medicine

Larisa T. Volova¹, Natalya K. Osina¹, Sergei I. Kuznetsov¹, Oksana A. Gussyakova¹, Denis G. Alekseev¹,
Evgenii I. Pugachev¹, Sergei A. Goncharenko²

¹Samara State Medical University (Samara, Russia)

²Samara State Technical University (Samara, Russia)

Abstract

Aim – to study the immunomodulator-induced individual cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and to evaluate the potential of using this approach as a universal cellular test system in personalized medicine.

Material and methods. The peripheral blood mononuclear cells given by donors were cultured *in vitro* in the presence of immunomodulators Imunofan and Polyoxidonium. After incubation, the enzyme-linked

immunosorbent assay (ELISA) of the culture medium for the presence of pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, and IFN- α cytokines was performed.

Results. The results of the experiment have demonstrated the absence of spontaneous or immunomodulator-induced production of IFN- α by PBMCs. These data correspond to the information presented earlier in the scientific literature. We also observed a pronounced inhibitory effect of both immunomodulators on the production of cytokines MCP-1/CCL2,

IL-6, IL-8/CXCL8 by PBMCs, along with the individual variability of their production and the cumulative effect of production over time.

Conclusion. The features of the production of pro-inflammatory cytokines by PBMCs into the medium in the presence of immunomodulators, revealed by the *in vitro* screening, can be used to develop universal *in vitro* cellular test systems for personalized diagnosis of a number of socially significant inflammatory and autoimmune diseases.

Keywords: cell biology, peripheral blood mononuclear cells, cytokines, immunomodulators, personalized medicine.

Conflict of interest: nothing to disclose.

Citation

Volova LT, Osina NK, Kuznetsov SI, Gusyakova OA, Alekseev DG, Pugachev EI, Goncharenko SA. Donor-specific production of cytokines by blood cells under the influence of immunomodulators: New aspects of a personalized approach in medicine. *Science & Innovations in Medicine*. 2022;7(4):250-257. doi: 10.35693/2500-1388-2022-7-4-250-257

Information about authors

Larisa T. Volova – PhD, Professor, Director of the RDC "BioTech".

ORCID: 0000-0002-8510-3118 E-mail: l.t.volova@samsmu.ru

Natalya K. Osina – PhD, Leading researcher at the RDC "BioTech".

ORCID: 0000-0002-0444-8174 E-mail: n.k.osina@samsmu.ru

Sergei I. Kuznetsov – PhD, Leading researcher at the RDC "BioTech".

ORCID: 0000-0003-4302-8946 E-mail: s.i.kuznecov@samsmu.ru

Oksana A. Gusyakova – PhD, Head of the Department of Fundamental and Clinical Biochemistry with Laboratory Diagnostics.

ORCID: 0000-0001-8140-4135

E-mail: o.a.gusyakova@samsmu.ru

Denis G. Alekseev – PhD, Leading researcher at the RDC "BioTech", Associate professor, Department of General Surgery.

ORCID: 0000-0003-4185-0709

E-mail: d.g.alekseev@samsmu.ru

Evgenii I. Pugachev – researcher at the RDC "BioTech".

ORCID: 0000-0002-3594-0874

E-mail: evgenesius@mail.ru

Sergei A. Goncharenko – student.

ORCID: 0000-0002-8460-9053

E-mail: S.A.Goncharenko@samsmu.ru

Corresponding Author

Natalya K. Osina

Address: Samara State Medical University, 89 Chapayevskaya st., Samara, Russia, 443099.

E-mail: n.k.osina@samsmu.ru

Received: 14.10.2022

Revision Received: 28.10.2022

Accepted: 07.11.2022

ВВЕДЕНИЕ

Иммунная система играет решающую роль в распознавании как чужеродных агентов, так и патологических изменений собственных клеток. Контроль со стороны иммунной системы выражается в том числе в изменении баланса цитокинов крови, что широко и активно используют при диагностике аутоиммунных и воспалительных социально значимых заболеваний. Однако индивидуальный уровень цитокинов в крови зависит от многих факторов, напрямую не связанных с заболеванием. Сюда можно отнести гипо- (в т.ч. генетически) и гипериммунный статус, возраст и пол пациента, а также время года, окружающую среду и другие факторы [1].

Поэтому при проведении диагностики заболеваний воспалительного и аутоиммунного характера, мониторинге их течения и ответа на лечение более корректно использовать модель, базирующуюся на изучении особенностей секреции цитокинов стимулированными мононуклеарами периферической крови (Peripheral Blood Mononuclear Cells, далее – PBMC). PBMC-клетки легко могут быть выделены из периферической крови с помощью фиколла и представляют собой мононуклеары, состоящие в основном из лимфоцитов (Т-клеток, В-клеток, NK-клеток) и моноцитов. Градиентное центрифугирование в фиколле позволяет отделить их от безъядерных (эритроциты и тромбоциты) и полиморфноядерных (нейтрофилы, базофилы и эозинофилы) клеток.

Ряд исследований последних лет продемонстрировал, что стимулированные PBMC-клетки от доноров с патологией вырабатывают иной профиль цитокинов/хемокинов, нежели стимулированные PBMC от здоровых доноров [2–4]. В частности, PBMC-клетки от здоровых доноров, стимулированные бактериальным липосахаридом (*E. coli* LPS / LPS), вырабатывали больше интерлейкина 8 (IL-8) и меньше интерлейкина 6 (IL-6) и фактора некроза опухоли-альфа (TNF- α), чем LPS-стимулированные PBMC-клетки от больных с хроническим периодонтитом [2].

В рамках разработки персонализированных подходов в диагностике и прогнозировании различных

патологий было проведено исследование (включено 500 участников) по изучению возможного влияния микрофлоры кишечника на выработку цитокинов PBMC-клетками, которые получали от здоровых доноров. Результаты исследования показали наличие корреляции между донор-специфичной вариативностью индукции выработки цитокинов при воздействии на PBMC различными патогенами – представителями микрофлоры кишечника. Также была продемонстрирована высокая индивидуальная вариативность интенсивности продукции цитокинов при индукции PBMC-клеток одним и тем же видом патогена. В то же время патоген-специфичной стимуляции выработки разных видов воспалительных цитокинов PBMC-клетками выявлено не было [5].

Также исследователи обнаружили корреляцию между тяжестью протекания сепсиса с развитием неблагоприятного исхода и сниженной продукцией TNF- α LPS-стимулированными PBMC-клетками у этих пациентов [6]. С учетом результатов данного исследования был предложен персонализированный подход к прогнозированию сепсиса, а именно: течение патологического процесса потенциально может быть более благоприятным, если PBMC-клетки таких пациентов в ответ на стимуляцию LPS будут продуцировать >250 пг/мл TNF- α [3]. Использование подобной прогнозной модели позволит врачам подбирать наиболее эффективную персонализированную схему лечения.

В рамках проведения научно-исследовательских работ по разработке новых методов прогнозирования развития и течения социально значимых воспалительных и аутоиммунных заболеваний мы предположили, что PBMC-клетки могут быть использованы и в качестве персонализированной клеточной тест-системы для выявления индивидуальной картины продукции цитокинов под влиянием различных иммуномодуляторов. Иммуномодуляторы представляют собой лекарственные препараты, способные оказывать стимулирующее или ингибирующее воздействие на гуморальное и/или клеточное звено иммунитета в зависимости от его текущего функционального

состояния. Для проверки гипотезы мы провели исследование по изучению влияния иммуномодуляторов полиоксидония и имунофана на продукцию воспалительных цитокинов РВМС-клетками, культивируемыми *in vitro*.

Полиоксидоний (сополимер N-окиси 1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксиэтил)-1,4-этиленпиперазиния бромид) с молекулярной массой 80 кДа является представителем препаратов с иммуномодулирующим действием, обусловленным стимуляцией антителообразования, а также воздействием на фагоцитирующие и NK-клетки. В определенных дозах полиоксидоний обладает способностью модулировать синтез цитокинов IL-1 β , IL-6, TNF- α . При этом он ведет себя как истинный иммуномодулятор, усиливая образование TNF- α у лиц с исходно пониженным синтезом цитокинов, и не оказывает влияния или даже несколько понижает продукцию TNF- α у лиц с исходно повышенной интенсивностью синтеза цитокинов [7]. Полиоксидоний используют как адъювант в составе противогриппозных вакцин. Установлено, что адъювантная вакцина, содержащая препарат, более активно стимулирует выработку цитокинов Th-1 (IL-12, IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-1 β , TNF- α) [8]. Как адъювант иммунотерапии рака молочной железы, полиоксидоний способствует регрессу патологических изменений у 6 из 20 пациенток, включая эпизоды с трижды негативным вариантом заболевания [9].

Полиоксидоний обладает также антиоксидантным, детоксицирующим, мембранопротекторным и хелатирующим эффектами [10]. Его антиоксидантные свойства связаны со способностью к перехвату в водной среде активных форм кислорода, супероксидного аниона, перекиси водорода, гидроксильного радикала; также к снижению концентрации каталитически активного двухвалентного железа, ингибированию перекисного окисления липидов, подавлению спонтанной и индуцированной люминол- и люцегенинзависимой хемилуминесценции. В эксперименте при совместном введении полиоксидония и сульфата меди первый обеспечивает 100% защиту животных от ядовитого действия второго при 100% гибели контрольных животных [7]. Мембранопротекторные свойства препарата обеспечивают защиту клеток от повреждающего воздействия ряда токсических веществ. Сочетание иммуномодулирующих, антиоксидантных и детоксицирующих свойств делает полиоксидоний одним из эффективных иммуномодулирующих средств с противовоспалительной активностью [11–15].

Имунофан (синтетический гексапептид аргинил-альфа-аспартил-лизил-валин-тирозил-аргинин) с молекулярной массой 836 Да обладает иммунорегулирующим, детоксикационным, гепатопротективным действием и находит применение при лечении ряда заболеваний [16]. Препарат стимулирует процессы созревания T-лимфоцитов, кооперативные взаимодействия CD4⁺-клеток и клеток костного мозга, повышает активность NK-клеток и кислородзависимой системы бактерицидности нейтрофилов, активирует

ранние этапы антителогенеза, синтез иммуноглобулинов классов M, G, A; стимулирует нарушенную продукцию тимических гормонов, в том числе сывороточного тимического фактора, а также интерлейкина-2 (IL-2), интерферона- α (IFN- α) [17]. Имунофан применяют в качестве адъюванта базисной противоязвенной терапии [18], как средство иммунокоррекции в комплексном лечении онкобольных, которое снижает вероятность возникновения местных и системных осложнений во время лучевой терапии и тем самым помогает обеспечить непрерывность лечения [16, 19]. Была показана эффективность имунофана при нарушениях иммунного статуса у пациентов с хронической интоксикацией фосforoорганическими соединениями: препарат, вводимый в течение 5 дней, способствовал восстановлению клеточного и гуморального звеньев иммунитета и регулировал содержание цитокинов в крови пациентов [20].

Воздействуя иммуномодуляторами на РВМС-клетки и оценивая ответную индуцированную выработку цитокинов, варьирующую в зависимости от особенностей организма пациента, можно будет подобрать максимально эффективный индивидуальный план лечения, что в полной мере соответствует критерию персонифицированного подхода в медицине.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить индуцированную иммуномодуляторами индивидуальную продукцию цитокинов РВМС-клетками и оценить потенциал использования данного подхода в качестве универсальной клеточной тест-системы в персонифицированной медицине.

■ МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили образцы крови потенциально здоровых лиц, а именно доноров крови из реестра Самарской областной клинической станции переливания крови (далее – ГБУЗ «СОКСПК»). В рамках проведения исследования была оформлена разрешительная документация Биоэтического комитета СамГМУ (протокол №215 от 20.01.2021 г.). Общее количество участников исследования составило 7 человек. В 100% эпизодов это были лица мужского пола, средний возраст которых составил 31,4 \pm 4,0 года. Отбор участников исследования из реестра доноров ГБУЗ «СОКСПК» производили рандомизированно. Каждый участник подписал добровольное информированное согласие на обработку персональных данных и передачу сведений, составляющих врачебную тайну, а также на передачу биологического материала (венозной крови) в рамках проводимого исследования. Венозную кровь забирали в вакуумные пробирки с гепарином натрия (Welhai Hongyu, Medical devices Co., Ltd., Китай) из вен в области локтевой ямки. Процедуру проводили утром, в 09.00 часов, натощак.

Дизайн исследования. В ходе работы изучали продукцию ряда цитокинов (MCP-1/CCL2, IL-6, IL-8/CXCL8 и IFN- α) РВМС-клетками, полученными от здоровых доноров и стимулированными

иммуномодуляторами имунофан и полиоксидоний. Для этого проводили выделение РВМС-клеток, их культивирование, добавление иммуномодуляторов с последующей оценкой продукции цитокинов методом ИФА. Было проведено три серии экспериментов.

Первая серия экспериментов позволяла оценить, какие из анализируемых цитокинов (MCP-1/CCL2, IL-6, IL-8/CXCL8, IFN- α) продуцируются РВМС-клетками в условиях *in vitro*. Для этой цели клетки из цельной крови от 5 доноров были объединены в один лот. Во второй серии экспериментов оценивали индивидуальную картину индуцированной иммуномодуляторами экспрессии цитокинов, поэтому использовали РВМС-клетки, выделенные от индивидуальных доноров (№72219 (30 лет) и №16427 (32 года)), которые не объединяли в один лот. Третья серия экспериментов была необходима для подтверждения или опровержения феномена накопительного эффекта продукции цитокинов во времени.

Полученные по итогам исследования данные сводили в таблицы с расчетом средних арифметических значений и стандартных ошибок средних арифметических значений. Вычисление достоверности различий между двумя средними арифметическими значениями производили с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверным при $p \leq 0,05$.

Выделение РВМС-клеток из крови доноров.

Выделение РВМС-клеток из периферической гепаринизированной венозной крови доноров осуществляли методом седиментации в градиенте плотности ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$) фиколл-верографин (ООО «БиолоТ», Россия), по методике А. Воуит, 1968 г. [21]. После градиентного центрифугирования клетки дважды отмывали в стерильной питательной среде RPMI-1640 с L-глутамином (Sigma-Aldrich, США). Для проведения экспериментов РВМС-клетки сохраняли в среде RPMI-1640 с L-глутамином с добавлением 80 мкг/мл гентамицина (ОАО «Дальхимфарм», Россия), 50 Ед/мл пенициллина (ООО «БиолоТ», Россия) и 50 мкг/мл стрептомицина (ООО «БиолоТ», Россия). Жизнеспособность клеток определяли с помощью окрашивания трипановым синим (ООО «БиолоТ», Россия).

Стимуляция РВМС-клеток иммуномодуляторами. Для изучения индуцированной продукции цитокинов РВМС-клетками мы использовали официальные лекарственные формы следующих иммуномодуляторов: полиоксидоний в форме раствора, с содержанием активного вещества 6 мг/мл (НПО «Петровакс Фарм», Россия); имунофан в форме раствора, с содержанием активного вещества 45 мкг/мл (ООО НПП «Бионокс», Россия).

Официальные формы обоих иммуномодуляторов путем разведения переводили в экстемпоральные растворы следующих концентраций (по активному веществу): 50, 25 и 12.5 нг/мл для первой серии экспериментов; 200 нг/мл для второй и третьей серии экспериментов.

В каждой серии экспериментов питательную среду с содержанием РВМС 2×10^6 клеток/мл, помещали в лунки 96-луночного планшета (TPP, Швейцария), в объеме 100 мкл на лунку. Итоговое содержание РВМС в лунках составляло 2×10^5 клеток/лунку. В первой серии экспериментов РВМС-клетками объединенного лота заполняли 2 ряда лунок по 3 лунки в каждом ряду. В лунки первого ряда добавляли по 100 мкл экстемпорального раствора полиоксидония в концентрациях 50, 25 и 12.5 нг/мл, в лунки второго ряда – 100 мкл экстемпорального раствора имунофана в концентрациях 50, 25 и 12.5 нг/мл. Итоговое содержание иммуномодуляторов в лунках каждого ряда составляло 25, 12.5 и 6.25 нг/лунку.

Во второй и третьей сериях экспериментов использовали РВМС-клетки отдельных доноров. Для каждого донора заполняли 2 ряда лунок по 1 лунке в каждом ряду. В лунку первого ряда к РВМС добавляли 100 мкл экстемпорального раствора иммуномодулятора полиоксидония в концентрации 200 нг/мл; в лунку второго ряда – 100 мкл экстемпорального раствора иммуномодулятора имунофана в концентрации 200 нг/мл. Итоговое содержание иммуномодуляторов в лунках составляло 100 нг/лунку.

В первой серии экспериментов иммуномодуляторы добавляли в лунки планшета со свежесодержимыми РВМС-клетками в питательной среде. Далее осуществляли 20-часовую инкубацию планшета в CO_2 -инкубаторе (Binder, Германия) при 37°C и 5% CO_2 . Во второй серии экспериментов планшеты с РВМС-клетками в питательной среде первоначально инкубировали в CO_2 -инкубаторе в течение 18 часов при 37°C и 5% CO_2 , затем меняли питательную среду на свежую, добавляли в лунки иммуномодуляторы и снова помещали в CO_2 -инкубатор на 20 часов при 37°C и 5% CO_2 . В третьей серии экспериментов так же, как и во второй, производили первичное инкубирование планшета с РВМС-клетками в питательной среде в CO_2 -инкубаторе в течение 18 часов при 37°C и 5% CO_2 . Затем добавляли иммуномодуляторы в лунки, но без замены питательной среды на свежую и снова помещали в CO_2 -инкубатор на 48 часов при 37°C и 5% CO_2 .

Имуноферментный анализ. После добавления иммуномодуляторов в лунки планшета к РВМС-клеткам с питательной средой и окончания инкубирования мы подвергали содержимое лунок имуноферментному анализу (далее – ИФА) применительно ко всем сериям экспериментов. При этом процесс проведения ИФА полностью соответствовал описанному в инструкции, приложенной производителем (ООО «Вектор», РФ) к диагностическому набору. Чувствительность ИФА составляла 0.5; 2; 15 и 5 пг/мл для IL-6, IL-8, MCP-1 и IFN- α соответственно.

Методы статистической обработки результатов исследования. Данные по результатам исследования были сведены в таблицу и графики диаграмм с помощью программы Microsoft Excel. При этом вычисляли средние величины (M) и ошибки средних величин (m). Далее производили оценку

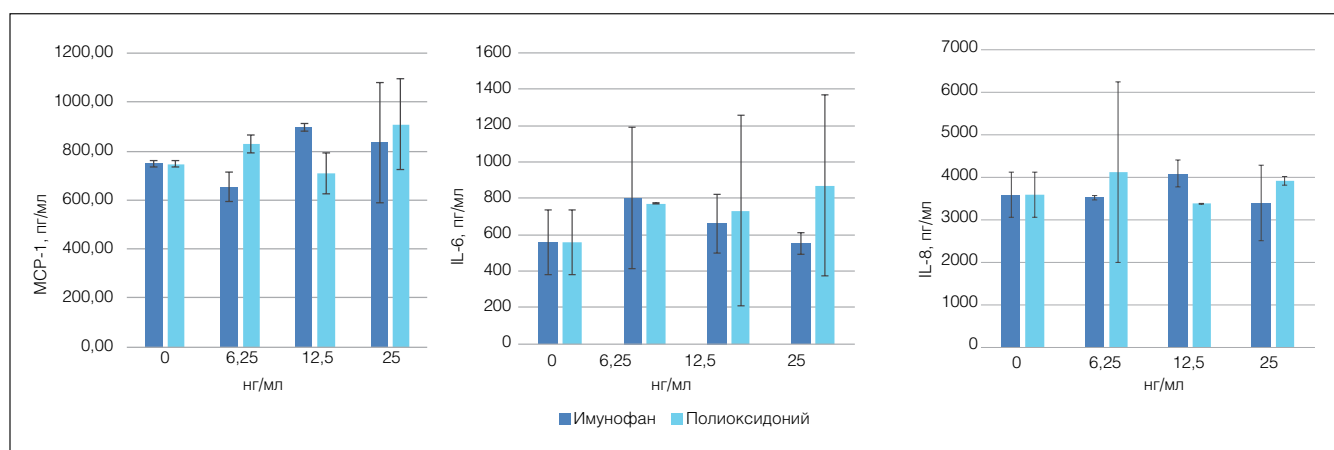


Рисунок 1. *In vitro* скрининг продукции цитокинов MCP-1/CCL2 (A), IL-6 (B), IL-8/CXCL8 (C) РВМС-клетками от 5 здоровых доноров (объединенный лот).

Figure 1. *In vitro* screening of cytokines MCP-1/CCL2 (A), IL-6 (B), IL-8/CXCL8 (C) production by PBMCs obtained from 5 healthy donors (joined lot).

достоверности средних величин, различий между средними величинами. С этой целью определяли экспериментальный критерий нормированного отклонения $t_{\text{эксп}}$ для разности средней величины выборки и средних величин двух выборок. Затем сравнивали полученный экспериментальный критерий $t_{\text{эксп}}$ с $t_{\text{табл}}$ для доверительной вероятности $P=0.95$. Если $t_{\text{эксп}}$ был больше либо равен $t_{\text{табл}}$, то считали, что средняя величина выборки достоверно отражает генеральную среднюю, или две выборки отличаются с вероятностью, большей либо равной 0.95 (значимость 95%, вероятность ошибки 5%).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В первой серии экспериментов анализ экспрессии РВМС-клетками цитокинов (MCP-1/CCL2, IL-6, IL-8/CXCL8, IFN-α) в питательную среду показал следующие результаты. Спонтанная продукция цитокинов (т.е. без добавления иммуномодуляторов) РВМС-клетками была достаточно высокой: 500–3500 пг/мл (рисунк 1). При этом в количественном соотношении экспрессия IL-8/CXCL8 достоверно превышала экспрессию IL-6 и MCP-1/CCL2. Различия статистически значимы ($p \leq 0.05$) в обоих случаях. При добавлении иммуномодуляторов уровни продукции цитокинов IL-6, IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 изменялись согласно динамике диаграмм на рисунке 1 с отражением достоверности различий между спонтанным (исходным) и индуцированными уровнями секреции цитокинов РВМС-клетками.

В то же время результаты ИФА показали отсутствие экспрессии IFN-α РВМС-клетками как до, так и после добавления иммуномодуляторов. Показатели оптической плотности (далее – ОП) между образцами в лунках, содержащими питательную среду и РВМС-клетки, стимулированные иммуномодуляторами имунофан и полиоксидоний (в различных концентрациях), достоверно не отличались от значений показателей ОП в лунках с контрольной средой RPMI

(бланк) или стандартной пробой с нулевой концентрацией IFN-α (0 пг/мл) (таблица 1). Различия статистически не значимы ($p \geq 0,05$). Поэтому оценку экспрессии IFN-α во второй и третьей сериях экспериментов не производили.

Во второй серии экспериментов уровни спонтанной продукции цитокинов (MCP-1/CCL2, IL-6, IL-8/CXCL8) были сопоставимы с таковыми в первой серии (рисунки 1–4). Различия между результатами первой и второй серий экспериментов по данному параметру статистически не значимы ($p \geq 0.05$) применительно ко всем трем анализируемым цитокинам. Количественное соотношение цитокинов при их спонтанной продукции во второй серии экспериментов было аналогичным таковому в первой серии. Экспрессия IL-8/CXCL8 (рисунк 3) достоверно превосходила экспрессию IL-6 (рисунк 4) и MCP-1/CCL2 (рисунк 2). Различия статистически значимы ($p \leq 0.05$) в обоих случаях.

В целом во второй серии экспериментов при сравнении спонтанной и индуцированной экспрессии цитокинов РВМС-клетками было выявлено достоверное ингибирующее влияние иммуномодуляторов (рисунк 4). Различия между спонтанной и индуцированной экспрессией в данной серии экспериментов статистически значимы применительно ко всем трем анализируемым цитокинам ($p \leq 0.05$).

Также мы наблюдали индивидуальные различия в продукции цитокинов РВМС-клетками доноров на фоне воздействия иммуномодуляторов (рисунки 2–4). При равных экспериментальных условиях продукция

№ п/п	Описание пробы	ОП
1	Среда RPMI только (бланк)	0,0149
2	0 нг/мл иммуномодуляторов	0,0117
3	Имунофан 6,25 нг/мл	0,0121
4	Имунофан 12,5 нг/мл	0,0154
5	Имунофан 25 нг/мл	0,0116
6	Полиоксидоний 6,25 нг/мл	0,0136
7	Полиоксидоний 12,5 нг/мл	0,0166
8	Полиоксидоний 25 нг/мл	0,0114

Таблица 1. *In vitro* скрининг продукции цитокина IFN-α РВМС-клетками

Table 1. *In vitro* screening of cytokine IFN-α production by PBMCs

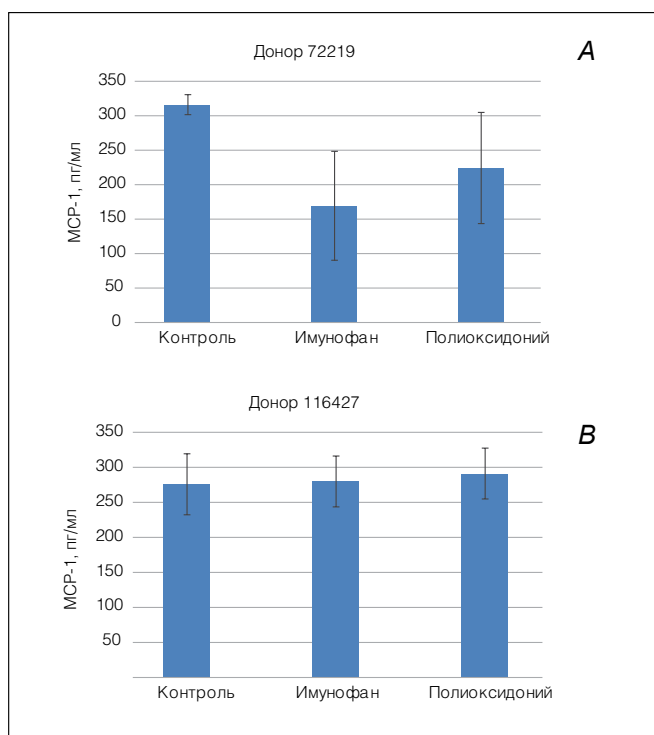


Рисунок 2. Сравнение продукции MCP-1 PBMC-клетками от индивидуальных доноров №72219 (А) и №116427 (В) в ответ на стимуляцию иммуномодуляторами.

Figure 2. Comparison of MCP-1 production by PBMCs from individual donors No. 72219 (A) and No. 116427 (B) in response to stimulation with immunomodulators.

MCP-1 клетками донора 116427 оставалась неизменной после добавления иммуномодуляторов (**рисунок 2Б**). Различия между спонтанной и индуцированной экспрессией MCP-1 у данного донора статистически не значимы ($p \geq 0.05$). В аналогичной ситуации у донора 72219 наблюдали достоверный ингибирующий эффект иммуномодуляторов (**рисунок 2А**). Различия со спонтанной секрецией MCP-1 у донора 72219 статистически значимы ($p \leq 0.05$).

В плане продукции IL-8/CXCL8 у обоих доноров наблюдали ингибирующий эффект как от использования полиоксидония, так и от применения имунофана. Различия со спонтанной экспрессией в данном эпизоде статистически значимы ($p \leq 0.05$). Однако у донора 72219 различия между индуцированной и спонтанной экспрессией IL-8/CXCL8 носили достоверно ($p \leq 0,05$) более выраженный характер по сравнению с таковыми у донора 116427 (**рисунок 3**). По уровню продукции IL-6 также отмечали достоверный ингибирующий эффект у обоих доноров от применения как полиоксидония, так и имунофана. Различия со спонтанным уровнем экспрессии статистически значимы у обоих доноров ($p \leq 0,05$). Но в данном эпизоде степень выявленных различий была достоверно ($p \leq 0,05$) более значимой у донора 116427 (**рисунок 4**).

Как видно из рисунка 5, концентрация MCP-1 в питательной среде с PBMC-клетками была достоверно выше при инкубации с иммуномодуляторами в течение 48 часов. Различие аналогичным параметром при 20-часовой инкубации статистически значимо.

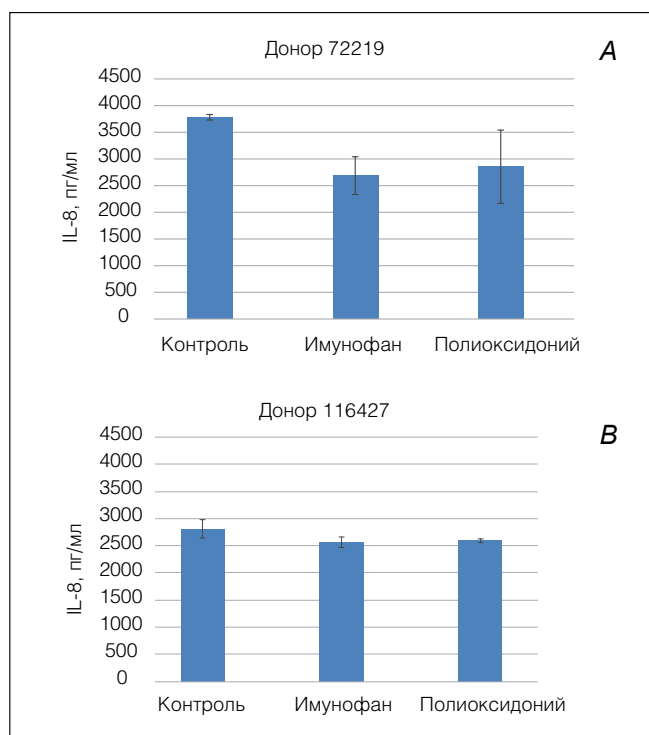


Рисунок 3. Сравнение продукции IL-8 PBMC-клетками от индивидуальных доноров №72219 (А) и №116427 (В) в ответ на стимуляцию иммуномодуляторами.

Figure 3. Comparison of IL-8 production by PBMCs from individual donors No. 72219 (A) and No. 116427 (B) in response to stimulation with immunomodulators.

■ ОБСУЖДЕНИЕ

Развитие биотехнологий в условиях форсирования персонализированного подхода в медицине подразумевает особое внимание к возможности применения стимулированных клеток крови. В ответ на внешнюю стимуляцию эти клетки вырабатывают цитокины в донор-специфической манере и поэтому являются перспективным материалом для разработки универсальных клеточных тест-систем по диагностике социально значимых заболеваний воспалительного и аутоиммунного характера. В связи с этим мы провели пилотные эксперименты по оценке продукции ряда цитокинов (MCP-1/CCL2, IL-6, IL-8/CXCL8 и IFN- α) PBMC-клетками, полученными от здоровых доноров и стимулированными иммуномодуляторами имунофан и полиоксидоний.

По итогам первой серии экспериментов наиболее отчетливо было продемонстрировано отсутствие спонтанной или индуцированной иммуномодуляторами продукции IFN- α . Эти данные соответствуют ранее опубликованным в литературе сведениям, в частности, о том, что полиоксидоний-стимулированные клетки крови не способны индуцировать синтез IFN- α , но обладают модулирующей активностью в плане продукции цитокинов: IL-1 β , IL-6, TNF α [7]. Нами было показано, что имунофан также не стимулирует выработку IFN- α PBMC-клетками от здоровых доноров. В случае MCP-1/CCL2, IL-6, IL-8/CXCL8 оценка их продукции PBMC-клетками от 5 здоровых доноров продемонстрировала количественно определяемую (достоверно выше барьера

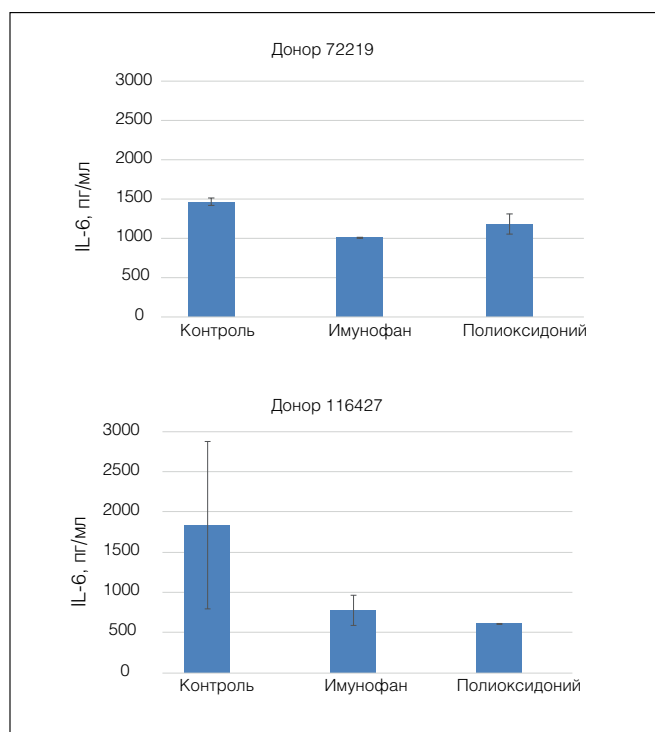


Рисунок 4. Сравнение продукции IL-6 PBMC-клетками от индивидуальных доноров №72219 (А) и №116427 (В) в ответ на стимуляцию иммуномодуляторами.

Figure 4. Comparison of the IL-6 production by PBMCs from individual donors No. 72219 (A) and No. 116427 (B) in response to stimulation with immunomodulators.

чувствительности ИФА) секрецию данных цитокинов в питательную среду.

В экспериментах с клетками индивидуальных доноров в большинстве случаев наблюдали четко выраженный ингибирующий эффект обоих иммуномодуляторов на продукцию цитокинов MCP-1/CCL2, IL-6, IL-8/CXCL8. Данные цитокины принимают участие в патогенезе различных заболеваний: IL-6 – это многофункциональный цитокин, содержание которого в крови повышено на фоне острых и хронических форм воспаления и аутоиммунных процессов. Последние имеют место при таких социально значимых патологиях, как ревматоидный артрит, псориаз, болезнь Кастлемана и др. [22–24]. MCP-1/CCL2 и IL-8/CXCL8 являются мощными медиаторами воспаления, относящимися к группе хемокинов, основная функция которых состоит в стимуляции передвижения иммунных клеток к очагу воспаления [25–27]. Представленные в данном исследовании цитокины MCP-1/CCL2, IL-6, IL-8/CXCL8 уже служат диагностическими маркерами некоторых нозологий, и их применение в диагностике вышеперечисленных социально значимых заболеваний несомненно растет с каждым годом [28–29]. Обнаружение индивидуальной вариабельности продукции цитокинов MCP-1/CCL2, IL-6, IL-8/CXCL8 PBMC-клетками крови от разных доноров в ответ на стимуляцию иммуномодуляторами является важной предпосылкой для развития персонализированных диагностических тестов с использованием клеток крови пациентов.

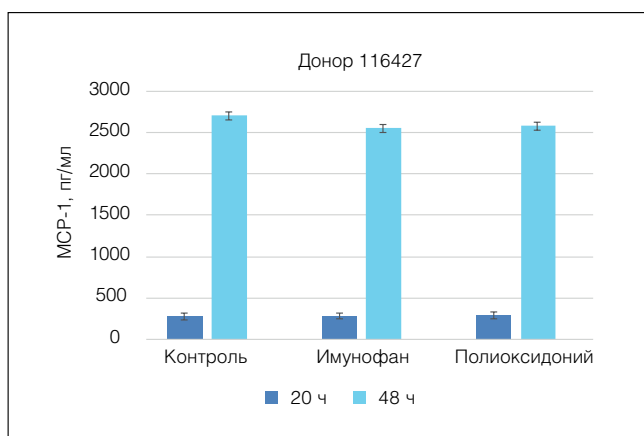


Рисунок 5. Сравнение продукции MCP-1 в питательную среду PBMC-клетками донора №116427 с инкубацией в присутствии иммуномодуляторов в течение 20 и 48 часов.

Figure 5. Comparison of MCP-1 production into the breeding ground by PBMCs obtained from donor No. 116427 after incubation with immunomodulators during 20 and 48 hours.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Первая серия экспериментов позволила оценить, какие из анализируемых цитокинов (MCP-1/CCL2, IL-6, IL-8/CXCL8, IFN- α) продуцируются PBMC-клетками в питательную среду в условиях *in vitro*. Результаты этой серии указывают на отсутствие продукции IFN- α PBMC-клетками крови и на их способность продуцировать IL-6, IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 при данных экспериментальных условиях. Существенный разброс в стандартных отклонениях значений в первой серии экспериментов, когда клетки от 5 доноров были объединены в один лот, вероятно, связан с донор-специфичной вариабельностью продукции отдельных цитокинов. Для подтверждения данной гипотезы мы провели вторую серию экспериментов.

Вторая серия экспериментов была проведена с PBMC-клетками, выделенными от индивидуальных доноров. Следует отметить, что в данной серии экспериментов PBMC были предварительно проинкубированы в бессывороточной среде в течение ночи и на следующий день, перед добавлением иммуномодуляторов, были отмыты от питательной среды. Таким образом, накопленные за ночь цитокины были удалены, что давало возможность после инкубации в течение 20 часов более точно оценить влияние иммуномодуляторов на синтез цитокинов. Данная серия экспериментов достоверно продемонстрировала индивидуальную вариабельность в продукции отдельных цитокинов и подтвердила нашу гипотезу.

Чтобы убедиться, что существует накопительный эффект продукции цитокинов во времени, была проведена третья серия экспериментов: к предварительно проинкубированным PBMC-клеткам донора 116427 были добавлены иммуномодуляторы без смены питательной среды с последующей инкубацией в течение 48 часов. Содержание цитокина MCP-1/CCL2 в данной серии экспериментов было достоверно (на порядок) выше, чем во второй серии, подтвердив наличие накопительного эффекта.

В целом проведенный *in vitro* скрининг продукции цитокинов в питательную среду РВМС-клетками в присутствии иммуномодуляторов имунофан и полиоксидоний продемонстрировал отсутствие продукции IFN- α наряду с индивидуальной вариабельностью продукции IL-6, IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, что может быть использовано при создании

универсальных клеточных тест-систем *in vitro* для персонифицированной диагностики ряда социально значимых заболеваний воспалительного и аутоиммунного характера. ■

Конфликт интересов: все авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ter Horst R, Jaeger M, Smeekens SP, et al. Host and Environmental Factors Influencing Individual Human Cytokine Responses. *Cell*. 2016;167(4):1111-1124.e13. doi: 10.1016/j.cell.2016.10.018
2. Goncalves TO, Costa D, Brodskyn CI, et al. Release of cytokines by stimulated peripheral blood mononuclear cells in chronic periodontitis. *Arch Oral Biol*. 2010;55(12):975-980. doi: 10.1016/j.archoralbio.2010.08.002
3. Antonakos N, Tsaganos T, Oberle V, et al. Decreased cytokine production by mononuclear cells after severe gram-negative infections: Early clinical signs and association with final outcome. *Critical Care*. 2017;1(21):1-10. doi: 10.1186/s13054-017-1625-1
4. Schirmer M, Smeekens SP, Vlamakis H, et al. Linking the Human Gut Microbiome to Inflammatory Cytokine Production Capacity. *Cell*. 2016;167(7):1897. doi: 10.1016/j.cell.2016.11.04
5. Li Y, Oosting M, Smeekens SP, et al. A Functional Genomics Approach to Understand Variation in Cytokine Production in Humans. *Cell*. 2016;167(4):1099-1110.e14. doi: 10.1016/j.cell.2016.10.017
6. De Werra I, Zanetti G, Faccard C, et al. CD14 expression on monocytes and TNF α production in patients with septic shock, cardiogenic shock or bacterial pneumonia. *Swiss Med Wkly*. 2001;131(3-4):35-40. doi: 2001/03/smw-05883
7. Pinegin BV, Nekrasov AV, Haitov RM, et al. Immunomodulator polyoxidonium: mechanisms of action and aspects of clinical application. *Cytokines and inflammation*. 2004;3:41-47. (In Russ.). [Пинегин Б.В., Некрасов А.В., Хаитов Р.М., и др. Иммуномодулятор полиоксидоний: механизмы действия и аспекты клинического применения. *Цитокины и воспаление*. 2004;3:41-47].
8. Kostinov MP, Akhmatova NK, Khromova EA, Kostinova AM. Cytokine Profile in Human Peripheral Blood Mononuclear Leukocytes Exposed to Immuno-Adjuvant and Adjuvant-Free Vaccines Against Influenza. *Front Immunol*. 2020;11:1-10. doi: 10.3389/fimmu.2020.01351
9. Alexia C, Cren M, Louis-Pence P, et al. Polyoxidonium® Activates Cytotoxic Lymphocyte Responses Through Dendritic Cell Maturation: Clinical Effects in Breast Cancer. *Front Immunol*. 2019;10:1-15. doi: 10.3389/fimmu.2019.02693
10. Petrov RV, Haitov RM, Nekrasov AV, et al. Polyoxidonium: Mechanism of Action and Clinical Application. *Medical Immunology*. 2000;3:271-278. (In Russ.). [Петров Р.В., Хаитов Р.М., Некрасов А.В., и др. Полиоксидоний: механизм действия и клиническое применение. *Медицинская иммунология*. 2000;3:271-278].
11. Kolosova NG. Acute respiratory infections in frequently ill children: rational etiotropic therapy. *Russian Medical Journal*. 2014;3:204-207. (In Russ.). [Колосова Н.Г. Острые респираторные инфекции у часто болеющих детей: рациональная этиотропная терапия. *Русский медицинский журнал*. 2014;3:204-207].
12. Kharlamova FS, Uchaikin VF, Kuz'menko LV, et al. Experience of using the Polyoxidonium immunomodulator for the treatment of acute respiratory infections in children. *Effective Pharmacotherapy*. 2013;11:12-20. (In Russ.). [Харламова Ф.С., Учайкин В.Ф., Кузьменко Л.В., и др. Опыт применения иммуномодулятора Полиоксидоний для лечения ОРВИ у детей. *Эффективная фармакотерапия*. 2013;11:12-20].
13. Varfolomeeva MI, Setdikova NK. Modern possibilities of immunomodulatory therapies in the prevention and treatment of ARI. *Consilium Medicum*. 2015;17(3):63-69. (In Russ.). [Варфоломеева М.И., Сетдикова Н.Х. Современные возможности иммуномодулирующей терапии в профилактике и лечении острых респираторных инфекций. *Consilium Medicum*. 2015;17(3):63-69].
14. Ivardava MI. Use of immunomodulators in acute respiratory infection treatment in frequently ill children. *Current Pediatrics*. 2011;10(3):103-107. (In Russ.). [Ивардава М.И. Место иммуномодуляторов в лечении острой респираторной инфекции у часто болеющих детей. *Вопросы современной педиатрии*. 2011;10(3):103-107].
15. Vavilova VP, Perevoshchikova NK, Rizo AA, et al. The use of the domestic immunomodulator Polyoxidonium in the practice of treating children with pathology of the lymphopharyngeal ring. *Allergology and Immunology in Paediatrics*. 2005;1(4):47-53. (In Russ.). [Вавилова В.П., Перевощикова Н.К., Ризо А.А., и др. Применение отечественного иммуномодулятора Полиоксидоний в практике
16. Lebedev VV, Pokrovskij VI. Imunofan: new generation synthetic peptide agent. *Vestnik Rossijskoj akademii nauk*. 1999;4:56-61. (In Russ.). [Лебедев В.В., Покровский В.И. Имунофан: синтетический пептидный агент нового поколения. *Вестник Российской академии наук*. 1999;4:56-61].
17. Markova TP, Chuvirov DG. Immunotherapy with Imunofan to the treatment of children with recurrent respiratory disease and mycoplasma pneumoniae infection. *Effective Pharmacotherapy*. 2022;18(12):12-18. (In Russ.). [Маркова Т.П., Чувиров Д.Г. Имунофан в комплексном лечении детей с повторными респираторными заболеваниями микоплазменной инфекцией. *Эффективная фармакотерапия*. 2022;18(12):12-18].
18. Butorov IV, Osojanu JuP, Butorov SI, Maksimov VV. Immunological and pathogenetic aspects of imunofan administration in aged patients with duodenal ulcer. *Vestnik Rossijskoj akademii nauk*. 2007;79(2):18-22. (In Russ.). [Бутуров И.В., Осоян Ю.П., Бутуров С.И., Максимов В.В. Иммунологические и патогенетические аспекты введения имунофана у пациентов пожилого возраста с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки. *Вестник Российской академии наук*. 2007;79(2):18-22]. PMID: 17460962
19. Venediktova MA. Use of tactivin and imunofan for the treatment of patients with endometrial carcinoma. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2001;64(5):46-9. (In Russ.). [Венедиктова М.А. Применение активина и имунофана для лечения пациенток с карциномой эндометрия. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2001;64(5):46-9. PMID: 11764501
20. Zabrodskij PF, Lim VG, Strel'tsova EV. Disturbances of immune status and cytokine profile caused by chronic intoxication with organophosphorus compounds and their correction by administration of imunofan. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2012;75(2):35-37. (In Russ.). [Забродский П.Ф., Лим В.Г., Стрельцова Е.В. Нарушения иммунного статуса и цитокинового профиля, вызванные хронической интоксикацией фосфорорганическими соединениями и их коррекция введением имунофана. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2012;75(2):35-37]. doi: 10.30906/0869-2092-2012-75-2-35-37
21. Bøyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest*. 1968;21:77-89.
22. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Interleukin (IL-6) Immunotherapy. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(8):1-15. doi: 10.1101/cshperspect.a028456
23. Dispenzieri A, Fajgenbaum DC. Overview of castleman disease. *Blood*. 2020;135(16):1353-1364. doi: 10.1182/BLOOD.2019000931
24. Osina NK, Pugachev EI, Kolyadenko IA, et al. Test-system *in vitro* for screening of therapeutic drugs with IL-17A inhibitory activity. *Genes and Cells*. 2021;16(1):43-48. (In Russ.). [Осина Н.К., Пугачев Е.И., Коляденко И.А., и др. Тест-система *in vitro* для скрининга лекарственных препаратов с IL-17a ингибирующей активностью. *Гены & Клетки*. 2021;16(1):43-48]. doi: 10.23868/202104006
25. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. *J Interf Cytokine Res*. 2009;29(6):313-325. doi: 10.1089/jir.2008.0027
26. Moore BB, Kunkel SL. Attracting Attention: Discovery of IL-8/CXCL8 and the Birth of the Chemokine Field. *J Immunol*. 2019;202(1):3-4. doi: 10.4049/jimmunol.1801485
27. Singh S, Anshita D, Ravichandiran V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. *Int Immunopharmacol*. 2021;101(Pt B):107598. doi: 10.1016/j.intimp.2021.107598
28. Lee YH, Song GG. Urinary MCP-1 as a biomarker for lupus nephritis: a meta-analysis. *Z Rheumatol*. 2017;76(4):357-363. doi: 10.1007/s00393-016-0109-z
29. Chase KA, Cone JJ, Rosen C, Sharma RP. The value of interleukin 6 as a peripheral diagnostic marker in schizophrenia. *BMC Psychiatry*. 2016;16(1):1-7. doi: 10.1186/s12888-016-0866-x