

Министерство науки и высшего образования
Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Пермский федеральный исследовательский центр
Уральского отделения Российской академии наук

Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук

На правах рукописи

Шардина Ксения Юрьевна

**РОЛЬ ФЕТОПЛАЦЕНТАРНЫХ БЕЛКОВ В РЕГУЛЯЦИИ
ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ
МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК**

3.2.7. Иммунология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Заморина Светлана Анатольевна

доктор биологических наук, доцент

Пермь – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

	С.
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1 – ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 – Миелоидны супрессорные клетки	13
1.1.1 – Общая характеристика миелоидных супрессорных клеток	13
1.1.2 –Фенотип миелоидных супрессорных клеток	18
1.1.3 – Механизмы, при помощи которых миелоидные супрессорные клетки реализуют свою активность	20
1.1.4 – Роль миелоидных супрессорных клеток в формировании иммунной толерантности в период беременности	25
1.2 – Белки, ассоциированные с беременностью	28
1.2.1 – Белки беременности в формировании иммунной толерантности	28
1.2.2 – Альфа-фетопротеин	28
1.2.3 – Гликоделин	32
1.2.4 – Хорионический гонадотропин	35
ГЛАВА 2 – МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	40
2.1 – Объекты исследования	40
2.2 – Белки и их разведения	40
2.3 – Методы	41

2.3.1 – Фракционирование мононуклеарных клеток периферической крови	41
2.3.2 – Иммуномагнитная сепарация CD33 ⁺ - и CD11b ⁺ - клеток	41
2.4 – Экспериментальные модели культивирования MDSC <i>in vitro</i>	42
2.4.1 – Схема культивирования миелоидных супрессорных клеток из CD33 ⁺ - клеток периферической крови	42
2.4.2 – Схема культивирования миелоидных супрессорных клеток из CD11b ⁺ - клеток периферической крови	44
2.4.3 – Определение иммунофенотипа миелоидных супрессорных клеток в культурах методом проточной цитометрии	45
2.5 – Оценка внутриклеточного уровня индоламин-2,3-диоксигеназы и аргиназы-1	47
2.6 – Оценка цитокинового профиля в супернатантах культур миелоидных супрессорных клеток	49
2.7 – Статистический анализ результатов	50
ГЛАВА 3 – РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	51
3.1 – Разработка модели получения миелоидных супрессорных клеток из периферической крови человека в системе <i>in vitro</i>	51
3.1.1 – Генерация миелоидных супрессорных клеток из CD33 ⁺ - клеток	51
3.1.2 – Генерация миелоидных супрессорных клеток из CD11b ⁺ - клеток	52

3.2 – Роль фетоплацентарных белков в регуляции дифференцировки миелоидных супрессорных клеток	55
3.2.1 – Влияние альфа-фетопротеина, гликоделина и хорионического гонадотропина человека на конверсию выделенных CD33 ⁺ -клеток в фенотип MDSC	55
3.2.2 – Влияние альфа-фетопротеина, гликоделина и хорионического гонадотропина человека на дифференцировку CD33 ⁺ -клеток в субпопуляции MDSC	58
3.2.3 – Влияние альфа-фетопротеина, гликоделина и хорионического гонадотропина человека на конверсию выделенных CD11b ⁺ -клеток в фенотип MDSC	60
3.2.4 – Влияние альфа-фетопротеина, гликоделина и хорионического гонадотропина человека на дифференцировку CD11b ⁺ -клеток в субпопуляции MDSC	62
3.2.5 – Оценка внутриклеточного уровня аргиназы-1 и индоламин-2,3-диоксигеназы в культурах CD11b ⁺ -клеток после культивирования с фетоплацентарными белками	64
3.3 – Роль фетоплацентарных белков в регуляции продукции цитокинов клетками, индуцированными в фенотип MDSC	66
3.3.1 – Анализ цитокинов супернатантов культур CD33 ⁺ -клеток	67
3.3.2 – Анализ цитокинов супернатантов культур CD11b ⁺ -клеток	68
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	74
ВЫВОДЫ	83

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	85
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	86
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	89
Приложение А	112
Приложение Б	113
Приложение В	117

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Миелоидные супрессорные клетки (myeloid-derived suppressor cells, MDSC) - гетерогенная популяция клеток, обладающих мощной подавляющей активностью в отношении врожденного и адаптивного иммунитета. У здоровых людей MDSC составляют менее 0,5 % среди всех мононуклеарных клеток периферической крови (МПК) [4], однако, уровень этой популяции увеличивается при многих патологических состояниях, включая воспаление, сепсис, травматический шок, аутоиммунные расстройства, онкологические заболевания, а также беременность.

Большая часть информации об иммуносупрессивной популяции MDSC была получена из исследований на моделях опухолей и онкологических больных. Несмотря на это, постоянный интерес ученых также нацелен на значимость этих клеток при различных патологических, а также физиологических нераковых состояниях. Известно, что MDSC играют двойственную роль в организме. С одной стороны индуцируют рост опухоли, стимулируя инвазию и метастазирование, с другой – имеют решающее значение в течение 1 триместра беременности. Предполагается, что MDSC могут быть объединяющим звеном, способствующим формированию иммунной толерантности, а их индукция способствует успешной беременности у женщин, склонных к рекуррентным абортам или невынашиванию беременности [121].

Поскольку формирование иммунной толерантности во время беременности не ограничивается клетками и тканями, одним из подходов изучения этого феномена является понимание функционирования регуляторного континуума, формируемого белками беременности [6]. Важность участия фетоплацентарных белков в формировании иммунной толерантности подтверждается, тем, что продукция компонентов белкового комплекса возрастает в динамике беременности. Белково-пептидные гормоны плаценты присутствуют на всех этапах гестации и выполняют разнообразные биологические функции, включая

иммуномодулирующую. В основе действия гормонов лежит трансдукция сигналов внутрь иммунных клеток через наличие на их поверхности рецепторов к этим пептидным гормонам.

Концепция настоящей работы заключается в установлении взаимодействия важных белков беременности - альфа-фетопротеина (АФП), гликоделина (ГД) и хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) с MDSC, поскольку этот вопрос на данный момент не исследован. Рабочая гипотеза заключается в том, что белки беременности должны стимулировать развитие и функциональную активность этих клеток, поскольку в период беременности возникает необходимость подавлять иммунный ответ материнского организма на эмбриональные антигены. Важно отметить, что иммуносупрессивное действие этих белков уже продемонстрировано на разных клеточных звеньях иммунитета, включая регуляторные клетки.

Актуальность выбранной темы имеет несколько уровней – фундаментальный аспект заключается в исследовании вклада конкретных белков беременности (АФП, ГД и ХГЧ) в формирование иммунной толерантности к полуаллогенному эмбриону посредством их влияния на дифференцировку «истинных» супрессоров иммунитета – MDSC. Прикладной аспект исследования заключается в потенциальной возможности применять белки беременности в направленной модуляции иммунной толерантности в виде фармакологического препарата. В целом, манипулирование MDSC перспективно для терапии как аутоиммунных, так и онкологических заболеваний [46]. Известно, что MDSC уже используют в качестве мишени для терапевтического воздействия – так, обнаружены агенты, способствующие дифференцировке MDSC в зрелые миелоидные клетки - транс-ретиноевая кислота и витамин D3 [4]. Кроме этого, удаление этих клеток из микроокружения опухоли при помощи токсических агентов в настоящее время служит одной из стратегий противораковой терапии [43].

Цель работы - оценка роли белков беременности альфа-фетопротеина, гликоделина и хорионического гонадотропина человека в регуляции дифференцировки и функциональной активности миелоидных супрессорных клеток человека путем иммунофенотипирования, измерения внутриклеточной

продукции индоламин-2,3-диоксигеназы и аргиназы-1 с одновременной оценкой цитокинового профиля.

Задачи исследования

1. Разработать схему генерации миелоидных супрессорных клеток в условиях *in vitro* методом направленной цитокиновой индукции CD33⁺-клеток периферической крови человека.

2. Разработать схему генерации миелоидных супрессорных клеток в условиях *in vitro* методом направленной цитокиновой индукции CD11b⁺-клеток периферической крови человека.

3. Оценить влияние альфа-фетопротеина, гликоделина и хорионического гонадотропина человека на дифференцировку CD33⁺-клеток в фенотип миелоидных супрессорных клеток, учитывая полиморфноядерные и моноцитарные субпопуляции миелоидных супрессорных клеток.

4. Проанализировать влияние альфа-фетопротеина, гликоделина и хорионического гонадотропина человека на дифференцировку CD11b⁺-клеток в фенотип миелоидных супрессорных клеток, учитывая полиморфноядерные и моноцитарные субпопуляции миелоидных супрессорных клеток.

5. Оценить влияние альфа-фетопротеина, гликоделина, хорионического гонадотропина человека на внутриклеточную продукцию ферментов аргиназы-1 и индоламин-2,3-диоксигеназы миелоидными супрессорными клетками, сгенерированными в результате культивирования CD11b⁺-клеток *in vitro*.

6. Измерить цитокиновый профиль супернатантов культур в обеих разработанных экспериментальных схемах – из CD33⁺-клеток и из CD11b⁺-клеток.

Методология и методы исследования. Работа выполнена с использованием методов культивирования *in vitro*, а также иммунологических и статистических методов культивирования. Для достижения цели и выполнения поставленных задач были осуществлены: теоретический анализ литературы, лабораторные исследования и статистическая обработка данных. Объектами исследования были белки беременности – альфа-фетопротеин, гликоделин и хорионический гонадотропин человека, а также MDSC.

Методы исследования

1. Культивирование в системе *in vitro*

В работе были использованы 2 схемы получения MDSC:

1) Культивирование CD33⁺-клеток с дальнейшей цитокиновой индукцией (GM-CSF и IL-6) в течение 7 суток;

2) Культивирование CD11b⁺-клеток с дальнейшей двухэтапной цитокиновой индукцией (GM-CSF, IL-1 β и ЛПС) в течение 7 суток.

2. Иммунологические методы:

- определение иммунофенотипа полученных культур с использованием моноклональных антител (к CD3, CD56, CD19, CD33, CD11b, HLA-DR, CD14, CD66b (R&D Systems, США)) методом проточной цитофлуориметрии (Cytotflex S, США);

- внутриклеточное определение уровня ферментов аргиназы-1 (Arg 1) и индоламин-2,3- диоксигеназы (ИДО) с помощью фиксации и пермеабиллизации клеток методом проточной цитофлуориметрии;

- определение цитокинов (APRIL / TNFSF13, BAFF / TNFSF13B, sCD30 / TNFRSF8, sCD163, Chitinase-3-like 1, gp130 / sIL-6R β , IFN- α 2, IFN- β , IFN- γ , IL-2, sIL-6R α , IL-8, IL-10, IL-11, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-19, IL-20, IL-22, IL-26, IL-27 (p28), IL-28A / IFN- λ 2, IL-29/IFN- λ 1, IL-32, IL-34, IL-35, LIGHT / TNFSF14, MMP-1, MMP-2, MMP-3, Osteocalcin, Osteopontin, Pentraxin-3, sTNF-R1, sTNF-R2, TSLP, TWEAK / TNFSF12) супернатантов культур методом мультиплексного анализа по технологии Luminex xMAP.

3. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку осуществляли в программе «GraphPad Prism 8.0» с использованием непараметрического критерия (two-way ANOVA), а именно дисперсионного анализа – критерия Фридмана.

Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора.

Достоверность результатов подтверждается проведением всех этапов работы с современными методами исследования и с использованием сертифицированного оборудования. Сформулированные в тексте диссертации выводы основаны на

фактических результатах, которые проиллюстрированы рисунками и сопровождаются таблицами. Статистический анализ данных проведен с использованием современных методик обработки данных с помощью прикладных компьютерных программ MS Office Excel, Microsoft (США), GraphPad Prism (GraphPad Software, США).

Основные положения диссертационной работы представлены и обсуждены на следующих конференциях: 24-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых учёных "Биология - наука 21 века» (Пушино, 2020 г.); XII Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов с международным участием Симбиоз-Россия (Пермь, 2020 г.); Российской конференции с международным участием «Экспериментальная и компьютерная биомедицина» (Екатеринбург, 2021 год); IX Всероссийской конференции «Иммунология репродукции» (Красногорск, 2021); Всероссийской научной конференции с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты биоинформатики, биотехнологии и недропользования» (Пермь, 2021), XIII Международной конференции ученых-биологов «СИМБИОЗ-РОССИЯ 2022» (Пермь, 2022); 12-ая международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2023 г.).

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования. Основная идея, планирование научной работы, включая формулировку рабочей гипотезы, определение методологии и общей концепции диссертационного исследования проводились совместно с научным руководителем – ведущим научным сотрудником ИЭГМ УрО РАН, доцентом Замориной Светланой Анатольевной.

Цель и задачи сформулированы совместно с научным руководителем. Дизайн исследования разработан лично диссертантом. Анализ современной отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме проведен диссертантом совместно с научным руководителем.

Получение и интерпретация данных осуществлялись лично диссертантом.

Лабораторные исследования осуществлялись совместно с Лабораторией клеточной иммунологии и нанобиотехнологии на базе Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН.

Статистическая обработка первичных данных, интерпретация и анализ полученных результатов, написания и оформление рукописи диссертации, представление результатов работы в научных публикациях осуществлялись соискателем лично.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработка двух схем дифференцировки миелоидных супрессорных клеток человека в системе *in vitro* позволила достигнуть среднем 52,3 % популяции миелоидных супрессорных при дифференцировке CD33⁺-клеток и 44,8 % - при дифференцировке CD11b⁺-клеток среди всех клеток культуры.

2. Гликоделин угнетает дифференцировку CD33⁺-клеток, а хорионический гонадотропин человека, наоборот, усиливает дифференцировку CD11b⁺ в фенотип общего пула миелоидных супрессорных клеток; гликоделин и альфа-фетопротеин стимулируют дифференцировку CD33⁺- и CD11b⁺-клеток, а альфа-фетопротеин только CD33⁺-клеток в фенотип моноцитарной субпопуляции миелоидных супрессорных клеток в системе *in vitro*.

3. Альфа-фетопротеин и хорионический гонадотропин человека не влияют, а гликоделин усиливает продукцию индоламин-2,3- диоксигеназы миелоидными супрессорными клетками в культуре *in vitro*; созданные экспериментальные условия не способствуют внутриклеточной продукции аргиназы-1 в миелоидных супрессорных клетках человека.

4. Гликоделин стимулирует синтез IL-20 клеточной культурой CD33⁺-клеток; альфа-фетопротеин угнетает синтез IL-19, а гликоделин снижает уровни IL-26, IL-19, TWEAK и IFN- α 2 в культуре CD11b⁺-клеток.

Научная новизна. В рамках диссертационного исследования разработаны две собственные схемы получения MDSC из клеток периферической крови здорового человека при помощи направленной цитокиновой индукции. Первый

метод основан на дифференцировке CD33⁺-клеток, а второй на - CD11b⁺-клеток. Впервые исследовано влияние белков беременности - альфа-фетопротеина, гликоделина и хорионического гонадотропина на дифференцировку общего пула MDSC и его субпопуляций M-MDSC и PMN-MDSC, а также проведена оценка влияния фетоплацентарных белков на функциональное состояние MDSC с помощью измерения внутриклеточной экспрессии ферментов Арг 1 и ИДО. Используемые экспериментальные подходы позволили впервые продемонстрировать модулирующее влияние фетоплацентарных белков на цитокиновый профиль в культурах клеток, индуцированных в фенотип MDSC.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость настоящей работы состоит в оценке влияния белков фетоплацентарного комплекса на иммуносупрессорную популяцию MDSC. Полученные данные позволят глубже оценить вклад фетоплацентарных белков в формирование толерантности при беременности и изучить механизмы их взаимодействия с MDSC. Прикладной аспект исследования заключается в потенциальной возможности использовать белки фетоплацентарного комплекса в качестве иммунофармакологических препаратов. Разработка собственной модели получения MDSC путем последовательной цитокиновой стимуляции также имеет теоретическую значимость, фиксируя особенности генерации этих клеток из периферической крови здорового человека. Прикладное значение данной модели заключается в потенциальном использовании MDSC в клеточной терапии. Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс на кафедре микробиологии и иммунологии Пермского государственного национального исследовательского университета в курс «Иммунология». Использование модели генерации MDSC внедрено в деятельность ИЭГМ УрО РАН для реализации темы ГЗ АААА-А19-119112290007-7 и гранта РФФИ № 22-25-00378.

Публикации. По результатам диссертационной работы опубликовано 15 статей, из них 6 статей – в журналах, включенных в Перечень ВАК для публикации результатов диссертационных исследований по специальности 3.2.7. Иммунология и/или индексируемых в МБД Scopus, WoS и RSCI.

Объем и структура работы. Работа изложена на 120 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения результатов исследования, выводов, списка сокращений и списка литературы и приложений. Список литературы включает 190 источников. Работа проиллюстрирована 14 рисунками и 5 таблицами.

ГЛАВА 1 – ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Миелоидные супрессорные клетки

1.1.1 – Общая характеристика миелоидных супрессорных клеток

Клетки миелоидного происхождения являются наиболее многочисленными ядерными гемопоэтическими клетками в организме человека. Миелоидные клетки представляют собой довольно разнородную популяцию клеток, которая включает как моноцитарные клетки, такие как моноциты, терминально дифференцированные макрофаги и дендритные клетки, так и гранулоцитарные - по большей части нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, тучные клетки. Биологическая роль миелоидных клеток эволюционно сведена к защите организма от патогенов и поддержании гомеостаза. Миелопоэз, возникающий в ответ на чужеродные раздражители, является нормальной защитной реакцией организма. В данном случае активация клеток миелоидного ряда возникает в ответ на довольно сильные сигналы, как правило, на макромолекулы, находящиеся на поверхности патогенов - PAMP (pathogen molecular complex, патоген-ассоциированные молекулярные паттерны) или на эндогенные факторы – DAMP (distress- associated molecular patterns, дистресс - ассоциированные молекулярные паттерны), а также в форме лигандов toll-подобных рецепторов (TLR) [114]. В данном случае происходит активная мобилизация клеток из костного мозга, увеличение фагоцитоза, ассоциированного с ним респираторного взрыва, высвобождение, главным образом, провоспалительных цитокинов, а прекращаются эти процессы при элиминации раздражителя. Наоборот, при хронических заболеваниях, аутоиммунных расстройствах, а также при раке, клеткам поступает стойкий, но слабый по силе сигнал. Именно такая природа сигнала приводит к умеренному, длительному миелопоэзу, характеризующемуся накоплением незрелых миелоидных клеток, которые отклоняются от стандартного пути дифференцировки. Образующиеся клетки отличаются от классических

гранулоцитов и моноцитов по геномным и биохимическим профилям, функциональной активности, а также по программе клеточной активации. Основная важная отличительная особенность этих клеток- мощное подавление различных иммунных ответов в организме [57].

История изучения клеток, подавляющих иммунный ответ при определенных патологических состояниях, началась еще в начале 20-го века. Тогда стало известно, что при онкологических заболеваниях происходит развитие внемедуллярного гемопоэза и нейтрофилии [159]. Оказалось, что образующиеся при этом лейкоциты обладают супрессорной активностью. Позже в 70-х годах сообщалось о клетках-супрессорах, которые после трансплантации костного мозга не специфически ингибировали МЛР (смешанная лейкоцитарная реакция) [158]. В это же время в исследованиях регуляторной роли костного мозга, ученые попытались охарактеризовать особые супрессорные клетки, которые ингибировали антителообразование в условиях *in vitro* [49]. При этом такие клетки не несли известных маркеров NK-, T- и B- клеток, тогда они получили название «нулевые клетки».

В 2007 году название «супрессорные клетки миелоидного происхождения» (MDSC) было введено в научную литературу [58]. Первоначально термин MDSC использовали для описания нечетко определенной группы миелоидных клеток с мощной регуляторной активностью. В последние годы биологическая роль MDSC стала более ясной.

Миелоидные супрессорные клетки (MDSC, myeloid - derived suppressor cell) представляют собой гетерогенную популяцию клеток, обладающих мощной подавляющей активностью в отношении врожденного и адаптивного звеньев иммунитета. Миелоидные супрессорные клетки считаются малочисленной клеточной популяцией. У здоровых людей MDSC составляют менее 0,5 % среди всех мононуклеарных клеток периферической крови [4]. Открытым остается вопрос о том, какое функциональное значение несут MDSC у здоровых людей. На сегодняшний день большинство исследований, посвященных миелоидным супрессорным клеткам, ассоциировано с онкологическими заболеваниями. Дело в

том, что многочисленные исследования показали тесную связь между накоплением MDSC и прогрессирующим онкологическими заболеваниями.

При раке иммуносупрессивное действие MDSC способствует прогрессированию опухоли за счет ингибирования противоопухолевого иммунного ответа [28]. Уровень циркулирующих MDSC растет на поздних стадиях рака, что говорит о прогрессировании заболевания и образовании метастазов [173, 25, 186]. Тем не менее, относительно недавно было показано, что уровень MDSC в кровотоке увеличивается так же при предраковых состояниях [94]. Исторически считалось, что основной мишенью MDSC при онкологиях служат Т-клетки, однако на данный момент ясно, что MDSC также обладают дополнительными стратегиями прогрессирования и метастазирования опухоли, поддерживая благоприятное опухолевое микроокружение.

Большая часть информации о важной иммуносупрессивной популяции MDSC была получена из исследований на моделях опухолей и онкологических больных. Несмотря на это, постоянный интерес ученых также нацелен на значимость этих клеток в нераковых состояниях, при которых необходимо подавить чрезмерно активированную иммунную систему. В таких ситуациях MDSC показывают другую сторону своей активности, которая выражается в поддержании гомеостаза посредством иммунорегуляции. Такими патологическими состояниями являются аутоиммунные заболевания, ожирение, хронические инфекции, которые характеризуются стойкими иммунными ответами слабой силы.

Многочисленные исследования показали, что прогрессирование аутоиммунных расстройств на мышинных моделях, а также у людей сопровождается экспансией MDSC [115]. Несмотря на то, что MDSC, обладая подавляющей активностью, накапливаются при аутоиммунных расстройствах, их роль в течении данных заболеваний до сих пор не установлена. Дело в том, что разные исследования демонстрируют, то положительную, то отрицательную динамику в регуляции прогрессирования аутоиммунного заболевания. Например, было показано, что уровень MDSC в периферической крови растет у пациентов с

системной красной волчанкой (СКВ). Интересно, что частота MDSC коррелирует с Th17-ответами и тяжестью заболевания, что демонстрирует патогенную роль этой популяции клеток в развитии СКВ [178]. С другой стороны, фенотип и механизмы действия MDSC активно изучают на модели другого аутоиммунного заболевания – ревматоидного артрита. Ревматоидный артрит (РА) – это хроническое системное заболевание соединительной ткани, приводящее к воспалению суставов и дальнейшему разрушению хряща и эрозии кости. При изучении РА на модели индуцированного коллагеном артрита у мышей было продемонстрировано, что накопление супрессорных MDSC происходит в селезенке, а адоптивный перенос MDSC снижает тяжесть заболевания путем блокирования провоспалительного ответа CD4⁺- Т-клеток. С дальнейшим прогрессированием заболевания MDSC теряют свою супрессивную способность и теряют свойство контроля развития расстройства [187]. Безусловно, роли MDSC в развитии аутоиммунных заболеваний посвящено большое количество исследований по всему миру, но приведенные выше данные демонстрируют основное положение по данной тематике на сегодняшний день. В отличие от рака и инфекционных заболеваний, экспансия MDSC во время аутоиммунных расстройств менее выражена. Возможно, это противоречие связано с высокой гетерогенностью миелоидной популяции, большой вариабельностью MDSC, а также разной степенью тяжести и особенностями микроокружения аутоиммунных заболеваний [170].

Известно, что воспаление при наличии хронических инфекций в организме способствует патогенезу. Недавние исследования показали, что при различных хронических инфекциях, вызываемых бактериями, вирусами или грибами, уровень MDSC в организме растет. Экспансия MDSC происходит при инфекциях, вызванных грамположительными бактериями (*M. tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*), грамотрицательными бактериями (*Klebsiella pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*), а также вирусами (вирус гепатита В, растворимый антиген HBV, вирус гепатита С, вирус иммунодефицита человека, вирус гриппа А, вирус мышинного синдрома приобретенного иммунодефицита, вирус герпеса мышей [68]) [45]. Установлено, что прогрессирование заболевания при хронических инфекциях

прямо пропорционально увеличению уровня MDSC [28]. В данном случае при атаке патогенов разной природы MDSC обладают противовоспалительным действием, поддерживая иммунный гомеостаз.

Несмотря на двойственные данные о роли MDSC при вышеупомянутых патологиях, имеют место определенные состояния, при которых повышенный уровень MDSC несет положительные эффекты. Так, при ожирении MDSC способствуют снижению уровня глюкозы в крови [121], а также уменьшают толерантность к инсулину у людей с ожирением [180]. Другое очень важное состояние, при котором MDSC демонстрируют положительную динамику, – беременность. В случае беременности популяция MDSC поддерживает толерантное микроокружение материнского организма к полуаллогенному эмбриону. Основная парадигма – индукция MDSC способствует успешной беременности у женщин, предотвращая спонтанные аборты, невынашивание, а также аномалии плода. Учитывая, что MDSC поддерживает иммунную толерантность посредством большого разнообразия механизмов подавления иммунного ответа, становится понятным интерес исследователей в области потенциального применения свойств MDSC при трансплантации органов и тканей. Так, повышение уровня MDSC было впервые описано на крысиной модели пересадки почек [47]. Позже стало известно, что уровень MDSC повышается при трансплантации костного мозга, сердца и почек, а инфильтрация MDSC в трансплантат подавляет частоту или тяжесть болезни трансплантат против хозяина [179]. Исходя из данных многочисленных исследований в этой области, предполагается, что MDSC взаимодействует с сетью других иммунных клеток, что вкуче приводит к положительному исходу трансплантации органов.

MDSC играют двойственную роль в организме. С одной стороны, индуцируют рост опухоли, стимулируя инвазию и метастазирование, с другой – имеют решающее значение в течение 1-го триместра беременности. Несмотря на активный научный поиск, до сих пор нет четкого понимания того, где заканчивается отрицательное влияние MDSC на организм и начинается положительное. Экспансия, активация и миграция этих клеток должны быть

синхронизированы, поскольку очевидно, что MDSC могут иметь положительный эффект при одних условиях и отрицательный при других.

Из-за фенотипической и функциональной гетерогенности, точный механизм того, как MDSC развиваются, накапливаются и функционируют все еще не раскрыт. Именно поэтому особый интерес ученых сосредоточен на эпигенетической сигнатуре MDSC, которая может дать ответы на проблематичные на сегодняшний день вопросы идентификации фенотипа MDSC.

1.1.2 – Фенотип миелоидных супрессорных клеток

Одним из важных стадий описания клеточных популяций является фенотипирование. Сложность состоит в том, что зачастую невозможно определить набор уникальных маркеров популяции, поскольку экспрессия поверхностных молекул может быть схожей с другими типами клеток. В данном случае имеет место понимание плотности экспрессии поверхностных маркеров.

Характеристика клеточных популяций миелоидной линии, которые появляются при различных патологиях, представляет собой большой объем данных, касающийся маркеров для их выделения и изучения. Из-за обилия различных способов выделения MDSC и выбора отличающихся наборов поверхностных маркеров, информация, которая характеризует миелоидные супрессорные клетки, достаточно противоречива. В настоящее время до сих пор ведутся дискуссии по поводу определения фенотипа MDSC, поскольку это очень важная область для идентификации клеток, которая позволит стандартизировать MDSC.

MDSC принято делить на две большие субпопуляции клеток: полиморфноядерные или гранулоцитарные (PMN-MDSC, G-MDSC) и моноцитарные (M-MDSC). Проблема идентификации этих популяций заключена в том, что фенотипически MDSC схожи с нейтрофилами и моноцитами. Несмотря на это, существуют определенные способы их различия. Например, M-MDSC отличается от моноцитов на основе экспрессии молекулы HLA-DR. PMN-MDSC отделяют от нейтрофилов, используя градиентное центрифугирование с помощью

фиколл-урографина. Дело в том, что PMN-MDSC представляют фракцию низкой плотности, тогда как нейтрофилы являются клетками высокой плотности, поэтому после центрифугирования PMN-MDSC останутся в полученной фракции МПК [48]. В 2016 году было предложено идентифицировать PMN-MDSC с помощью рецептора 1 окисленных липопротеинов низкой плотности лектинового типа (LOX-1) [37].

Фенотипическая характеристика MDSC с помощью проточной цитометрии в настоящее время относительно унифицирована. Среди мононуклеаров периферической крови PMN-MDSC определяются как $CD33^{low} CD11b^{+} CD14^{-} CD15^{+} / CD66b^{+}$, M-MDSC, как $CD33^{+} CD11b^{+} CD14^{+} HLA-DR^{-} /^{low} CD15^{-} / CD66b^{-}$. При этом обе популяции MDSC характеризуются как Lin^{-} , то есть MDSC не экспрессируют основные маркеры NK-клеток (CD56), а также T- и B- лимфоцитов (CD3, CD19 соответственно).

CD33 (сиалогликопротеин, Siglec-3) – трансмембранный протеин, расположенный на поверхности миелоидных клеток. В костном мозге CD33 не экспрессирован на мультипотентных гемопоэтических стволовых клетках, но появляется уже у мультипотентных предшественников (MPP) и далее до более поздних стадий созревания миелоидных клеток [15]. CD33 несет на себе 2 иммунорецепторных ингибиторных мотива на основе тирозина (ITIM), которые передают ингибирующие сигналы в клетку. В процессе иммунного ответа CD33 может действовать как ингибирующий рецептор лигандов.

CD11b (интегрин αM)- мембранный гликопротеин, который участвует в различных адгезивных взаимодействиях моноцитов, макрофагов, гранулоцитов, а также в опосредовании поглощения молекул и патогенов, покрытых белками системы комплемента. Таким образом, CD11b – сигнальный рецептор, способствующий воспалению [149]. Функциональная роль CD11b для MDSC на сегодняшний день не исследована, но именно этот маркер для всех популяций MDSC является постоянным и высоко экспрессированным. Этот факт дает основание полагать, что CD11b является наиболее подходящим маркером для

выделения MDSC. Получение мышинных CD11b⁺-клеток с целью изучения MDSC показало, что супрессорные функции клеток при этом сохранялись [139].

CD14- GPI- заякоренный поверхностный белок, служащий корцептором TLR, опосредуя иммунный ответ на ЛПС [185]. CD14 использует MyD88, TIRAP и TRAF6, активируя сигнальный путь NF-κB, который способствует секреции цитокинов и воспалению [68]. CD14 связывает электроотрицательные ЛПНП (липопротеины низкой плотности) и тем самым опосредует высвобождение цитокинов [51]. CD14 является характерным маркером классических моноцитов человека [190]. Маркер CD14 используют для идентификации M-MDSC, а отсутствие маркера HLA-DR позволяет их отличать от моноцитов [27].

CD15 (Lewis или Lex) - тетрасахаридный эпитоп, молекула адгезии, которую в основном несут нейтрофилы, эозинофилы, моноциты, макрофаги, тучные клетки и миелоидные клетки- предшественники. CD15 способна опосредовать фагоцитоз и хемотаксис нейтрофилов [76].

CD66b (CEACAM 8) - гликопротеин клеточной поверхности, молекула адгезии. CD66b является специфическим маркером нейтрофилов [80].

Обе популяции MDSC – гранулоцитарные и моноцитарные, фенотипически схожи с нейтрофилами и моноцитами. Помимо этого, на данный момент не найдены маркеры MDSC, которые однозначно могли бы характеризовать эти клетки. Очевидно, что одних только поверхностных маркеров недостаточно для определения MDSC. Поэтому на сегодняшний день принято дополнительно определять функциональную составляющую MDSC, которая в купе с поверхностными маркерами может идентифицировать клетки.

1.1.3 - Механизмы, при помощи которых MDSC реализуют свою активность

Главная особенность MDSC – подавление иммунных реакций путем межклеточных взаимодействий и коротко живущих медиаторов [79]. Иммуносупрессия является основным признаком, с помощью которого MDSC можно отличить от моноцитов и нейтрофилов в периферической крови [170].

Известно, что супрессивное действие этих клеток затрагивает разные звенья клеточного иммунитета, однако в первую очередь они подавляют защитное действие Т-лимфоцитов (Рисунок 1).

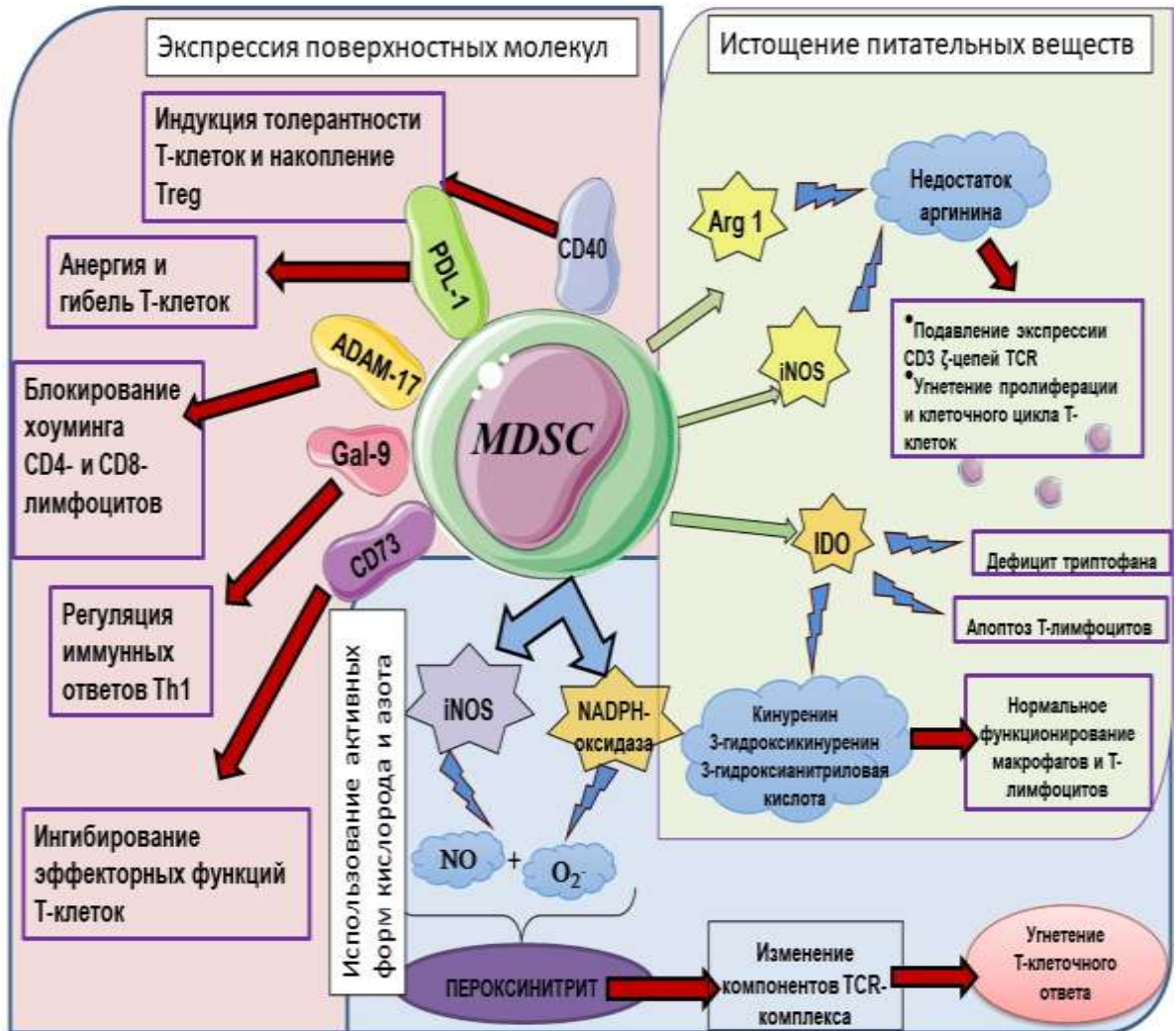


Рисунок 1 – Механизмы подавления Т-лимфоцитов, опосредованные MDSC

MDSC для реализации своих иммуносупрессорных функций используют большой спектр механизмов подавления: истощение питательных веществ, использование активных форм кислорода и азота, экспрессия ингибирующих молекул, продукции супрессорных цитокинов и т.д.

Истощение питательных веществ. Одним из самых главных механизмов иммуносупрессии для MDSC служит нарушение метаболизма аргинина и триптофана. Для этого MDSC используют Арг 1 и индуцибельную NO - синтазу (iNOS, NOS2). Арг 1- фермент, участвующий в последнем цикле мочевины, который превращает L- аргинин в L- орнитин и мочевины. iNOS – фермент, катализирующий образование оксида азота и цитрулина из аргинина, кислорода и NADPH. Избыточная концентрация этих ферментов в месте иммунного ответа приводит к недостатку важной аминокислоты – аргинина, что подавляет экспрессию CD-3 ζ -цепей TCR [141]. Помимо этого, недостаток L-аргинина приводит к блокированию пролиферации и нарушению клеточного цикла Т-лимфоцитов [54].

Аналогичным способом действует фермент ИДО. ИДО – фермент с молекулярной массой 42 кДа, участвующий в метаболизме L-триптофана, который катализирует его расщепление до N-формилкинуренина. Индукция ИДО происходит STAT-3-зависимым путем, а его избыточная продукция приводит к дефициту триптофана [99] и апоптозу Т-лимфоцитов [183]. Кроме того, активность ИДО приводит к продукции метаболитов триптофана (кинуренин, 3-гидроксикинуренин, 3-гидроксиантралиловая кислота), которые влияют на нормальное функционирование макрофагов и Т-лимфоцитов [52], а также могут привести к образованию Treg за счет связывания с арильными углеводородными рецепторами [102].

Так, за счет продукции трех ферментов – Арг 1, iNOS и ИДО, MDSC создают условия недостаточности питательной среды, что приводит к подавлению, в первую очередь, Т-клеточной активности, а также образованию супрессорной среды в месте иммунного ответа.

Использование активных форм кислорода и азота. Продукция активных форм кислорода и азота также является одним из основных механизмов подавления, который используют MDSC [40, 29]. Введение ингибиторов активных форм кислорода (АФК) противодействует подавляющему эффекту MDSC на Т-

клетки, что указывает на важность использования этого механизма для MDSC [175].

MDSC на своей поверхности содержат NADPH-оксидазу- ферментативный комплекс, который окисляя NADP^+ , образует на клеточной поверхности супероксид анион - радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$). iNOS в процессе окисления аргинина образует оксид азота (NO) с которым активно начинает взаимодействовать $\text{O}_2^{\cdot-}$, образуя пероксинитрит [122]. Пероксинитрит – сильнейший окислитель, способный вызывать повреждения разного рода молекул в клетке. Так, было продемонстрировано, что пероксинитрит способен модифицировать молекулы TCR-комплекса (T-cell receptor) посредством нитрования тирозина, меняя его взаимодействие с молекулами HLA. В результате происходит ингибирование T-клеточного ответа [112]. Помимо прочего, супероксид, который продуцируют MDSC, активно реагирует также с другими молекулами, такими как пероксид водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал (OH^{\cdot}), хлорноватистая кислота (HClO) с образованием АФК, которые затем повреждают белки, липиды, нуклеиновые кислоты. Это повреждение в итоге приводит к воспалению и способствует апоптозу [112].

Интересно, что механизм иммуносупрессии с помощью образования АФК миелоидными супрессорными клетками, нацелен не только на подавление T-клеточных иммунных ответов, а также на действие НК-клеток и В-лимфоцитов. PMN-MDSC за счет высвобождения АФК способны подавлять ответы НК-клеток на аденовирусные векторы и на инфекцию вирусов коровьей оспы [55, 189]. Также на модели СПИДа (ретровирусная инфекция LP-BM5) было показано, что популяция M-MDSC подавляла В-клеточный ответ в том числе за счет АФК [65, 136]. PMN-MDSC в свою очередь способны подавлять пролиферацию В-клеток и выработку антител путем клеточного контакта с помощью АФК, NO и Arg 1 [88].

Экспрессия поверхностных молекул. Для осуществления межклеточных взаимодействий и передачи сигнала из внешней среды внутрь клетки существуют трансмембранные рецепторы. Трансмембранные рецепторы – белки на поверхности мембраны, которые размещены на внешней стороне клетки, а

основную сигнальную функцию они выполняют внутри клетки. Трансмембранные рецепторы, взаимодействуя с сигнальной молекулой (лигандом), меняют свою конформацию или диссоциируют для передачи поступившего сигнала внутрь клетки нередко с помощью других вспомогательных молекул, например, вторичных мессенджеров. Проявление иммуносупрессивного действия MDSC также может происходить за счет экспрессии таких молекул на поверхности клеточной мембраны. Например, MDSC могут экспрессировать лиганд к TIM-3 - галектин-9 (Gal-9). TIM-3 в свою очередь присутствует на поверхности терминально дифференцированных Th1-клеток. Th1 продуцируют IFN- γ , повышающий экспрессию Gal-9. Ученые полагают, что таким образом MDSC способны регулировать Th1-иммунный ответ, используя сигнальный путь TIM-3/Gal-9 [145].

Также на поверхности MDSC экспрессирован домен 17 металлопептидазы ADAM (ADAM17). ADAM17 индуцирует расщепление мембранной молекулы адгезии CD62L на T-лимфоцитах. Вследствие этого CD4⁺ и CD8⁺- клетки теряют способность к миграции в зону воспаления или лимфатические узлы [67].

Также на MDSC содержится 5'-нуклеотидаза или CD73 – фермент, расщепляющий аденозинмонофосфат до аденозина. Аденозин способен ингибировать эффекторные функции T-клеток посредством его взаимодействия с аденозиновым рецептором (A2A, A2AR) [119].

CD40 – интегральный трансмембранный белок I типа, принадлежащий к надсемейству рецепторов фактора некроза опухоли (TNF). Эта молекула содержится на многих иммунных клетках, в том числе может содержаться и на MDSC. Это было выяснено в 2010 году в эксперименте, демонстрирующем способность MDSC индуцировать толерантность T-клеток и накопление T-регуляторных лимфоцитов (Treg) через экспрессию CD40 [123].

На сегодняшний день известно, что MDSC могут содержать на своей поверхности лиганд программируемой клеточной гибели- PD-L1 [116]. Известно, что PD-L1, связываясь со своим лигандом – PD-1, экспрессируемым на T-лимфоцитах, вызывает анергию и апоптоз этих клеток [116].

Экспрессия цитокинов. Помимо широко известных механизмов супрессии, MDSC способны воздействовать на иммунный ответ путем реципрокной регуляции MDSC и Treg. Это взаимодействие опосредовано выработкой цитокинов со стороны MDSC, которые способствуют активации регуляторных Т-лимфоцитов. Например, IFN- γ стимулирует MDSC на выработку IL-10 и TGF- β , необходимые для индукции Treg [123]. Это клеточное взаимодействие подтверждается также большим числом исследований рака [70, 154, 150].

MDSC опосредуют свои биологические функции, реализуя довольно широкий спектр механизмов, однако они не используют их одновременно. Выбор механизма супрессорного воздействия MDSC зависит от микроокружения, места, где происходит иммунная супрессия, а также от прогрессирования заболеваний. Известно, что разные типы MDSC используют разные механизмы подавления иммунного ответа. Так, PMN - MDSC чаще используют подавление Т-клеток антиген-специфическим образом, а M-MDSC используют механизмы, связанные с продукцией NO и супрессорных цитокинов.

1.1.4 – Роль миелоидных супрессорных клеток в формировании иммунной толерантности в период беременности

Фундаментальной концепцией иммунологии является различие своего и чужого, которое формировалось на протяжении длительного времени в процессе эволюции. Эта способность иммунитета включает в себя широкий спектр сложных молекулярных механизмов, которые слаженно работают в системе. Именно поэтому с иммунологической точки зрения беременность является парадоксальным состоянием, при котором наполовину чужеродный плод защищен от иммунной системы матери ее же иммунной системой. Дело в том, что в процессе беременности возникает так называемая иммунная толерантность. Иммунная толерантность при беременности – отсутствие у матери иммунной реакции на развивающийся плод и плаценту. Иммунную толерантность обеспечивает широкий спектр тканево-клеточных механизмов, в том числе и концепция «Th1/Th2/Th17/Treg», предполагающая доминирование Th2- и Treg-клеток над

Th1- и Th17-лимфоцитами [144]. Первоначально полагали, что материнско-фетальная толерантность основывается на иммунологии Т-клеток, однако на данный момент очевидно, что этот феномен намного сложнее и затрагивает разные звенья иммунитета.

Изначально было принято считать, что MDSC возникают при патологических состояниях, главным образом при раке, однако в 2011 году впервые было обнаружено, что они также образуются в процессе нормально протекающей беременности [98] (Рисунок 2).

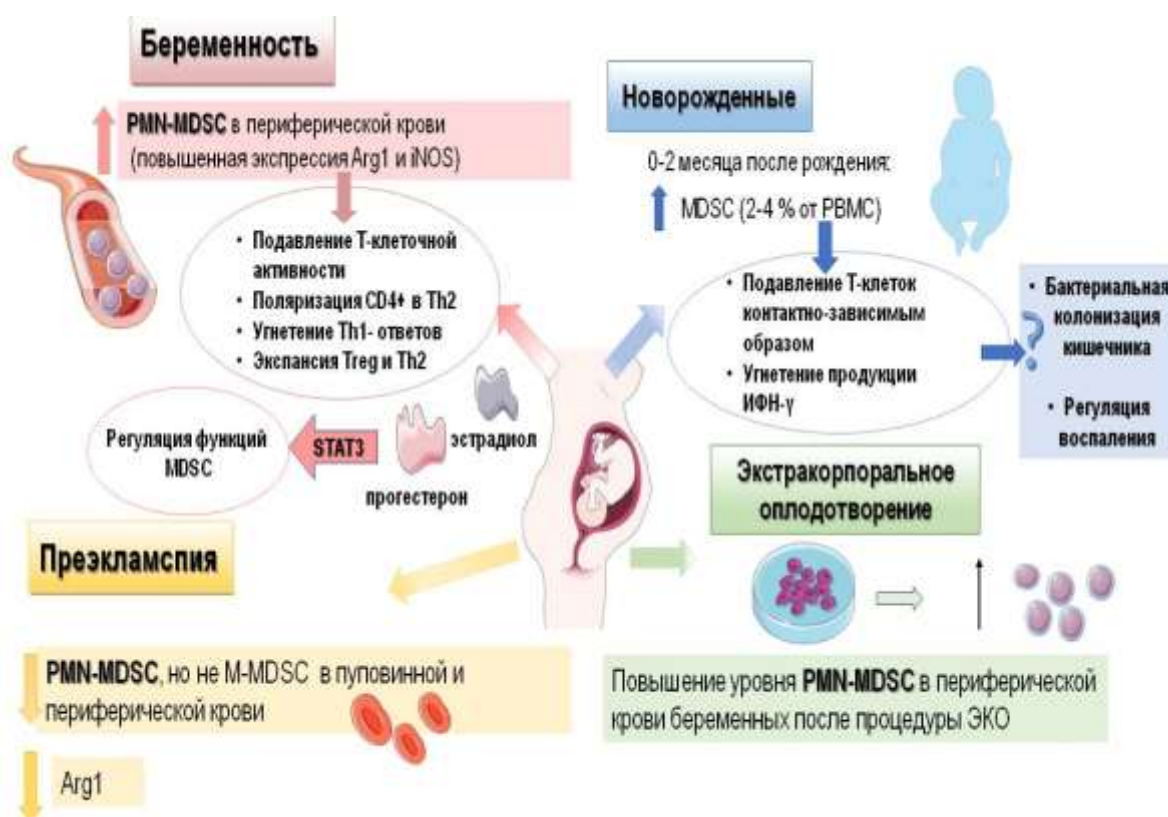


Рисунок 2 – Схематическое представление роли миелоидных супрессорных клеток (MDSC) во время беременности

Примечание: PBMC – моноциты периферической крови, PMN-MDSC – полиморфноядерные миелоидные супрессорные клетки, Arg1 – аргиназа 1, iNOS – индуцибельная NO-синтаза.

В физиологических условиях, в период нормально протекающей беременности происходит накопление PMN-MDSC в периферической крови женщин, при этом их уровень может повышаться в десять раз [77]. Самые высокие уровни PMN-MDSC наблюдаются на ранних сроках беременности. Снижение концентрации MDSC до уровня небеременных женщин происходит через несколько дней после родов [77]. Помимо того, что MDSC содержится в периферической крови, показано, что их концентрация увеличивается и в плаценте, а именно в децидуальной оболочке и межворсинчатом пространстве [78; 19]. При этом важно понимать, что MDSC во время беременности образуются из костного мозга матери, что подтверждено генетическим анализом [78]. В большей степени увеличение MDSC в организме матери происходит за счет субпопуляции PMN-MDSC, однако концентрация M-MDSC также возрастает, но менее значительно [124; 188].

Во время беременности иммунная система матери перенастраивается таким образом, чтобы одновременно защищать плод, проявляя иммунную толерантность, и при этом не ставить под угрозу защиту собственного организма от патогенов. Это состояние модуляции в том числе поддерживается MDSC, которые проявляют свои супрессивные эффекты во благо.

Феномен иммунной толерантности во время беременности обеспечивает не только организм матери, но и организм плода. Дело в том, что при гемохориальном типе плаценты, происходит тесный контакт плаценты и материнским кровообращением, за счет чего клетки плода и матери взаимно проникают друг в друга. При этом организм матери распознает чужеродные антигены плода, также, как и клетки плода, реагируют на проникающие антигены матери [107]. В связи с этим, можно утверждать, что иммунная толерантность поддерживается с двух сторон [6]. Очевидно, что формирование иммунной толерантности не ограничено клетками и тканями. Один из подходов изучения этого феномена – регуляторный континуум, формируемый белками.

1.2 – Белки, ассоциированные с беременностью

1.2.1 – Белки беременности в формировании иммунной толерантности

Одной из теорий, которая объясняет феномен вынашивания генетически чужеродного плода в организме матери – теория гестационной иммуносупрессии, которая основана на двух группах фактов [11]. Одна связана со снижением иммунологической реактивности материнского организма, а другая со свойствами иммунного подавления со стороны фетоплацентарного комплекса. Важность участия в формировании иммунной толерантности подтверждается, тем, что продукция компонентов фетоплацентарного комплекса растет с развитием гестации.

Во время беременности плод и плацента вырабатывают множество белков и гормонов, поступающих в кровоток матери. Белково-пептидные гормоны плаценты присутствуют на всех этапах гестации с целью контроля нормального протекания беременности. В область их надзора входит регулирование процессов созревания лимфоцитов с дальнейшей антигензависимой модуляцией [71]. При этом очевидно, что в основе действия гормонов лежит трансдукция сигналов внутрь иммунных клеток через наличие на поверхности клеток рецепторов к этим пептидным гормонам.

1.2.2 – Альфа-фетопротеин

Альфа-фетопротеин (АФП) - гликопротеин плода, с молекулярной массой до 75 кДа, который включает одну полипептидную цепь (около 600 аминокислот) и содержит от 3 до 5 % углеводов. Начиная с четвертой недели беременности, висцеральная энтодерма желточного мешка, а позже и печень плода начинают выработку АФП [21]. Функциональным аналогом АФП является сывороточный альбумин и сразу после рождения АФП заменяется им.

В процессе беременности АФП выполняет, в первую очередь, транспортную функцию. АФП способен связывать, а также переносить различные гидрофобные лиганды и ионы металлов [44]. Он переносит низкомолекулярные вещества, такие

как билирубин, полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), ретиноиды, стероиды, флавоноиды от материнского организма плоду [11, 164]. При этом АФП связывает ПНЖК сильнее, чем альбумин [125]. Связывание жирных кислот альфа-фетопроотеином в итоге приводит к проявлению механизмов иммуносупрессии АФП [110].

АФП проникает через плаценту, поэтому он обнаруживается в повышенных концентрациях в периферической крови матери, достигая максимума между 30-ой и 36-ой неделями беременности [11]. Касательно локализации АФП в организме плода, известно, что он обнаруживается во всех тканях и органах, что подтверждает важность этого белка в эмбриогенезе. Во время внутриутробного развития, уровень АФП в организме плода достигает значений 250 МЕ/ мл, а после рождения концентрация белка начинает постепенно уменьшаться, приравниваясь к концентрациям АФП взрослого уже к первому году.

В организме здорового взрослого человека АФП может обнаруживаться в минимальных количествах, не превышающих пределы нормы. Любое отклонение уровня АФП от нормальных значений указывает на наличие определенных патологических процессов в организме. Именно это свойство и позволяет использовать измерение уровня АФП в диагностике ряда патологий.

АФП – один из самых известных опухолевых маркеров, специфичных для первичного рака печени, тератокарциномы или половых желез [42]. Дело в том, что некоторые раковые новообразования приобретают свойства эмбриональных тканей, что и приводит к синтезу белков, характерных для эмбриогенеза. Интересно, что при онкологии характерно резкое повышение сывороточного АФП, а его незначительное увеличение скорее говорит о патологиях печени, не имеющих раковую природу [42].

Помимо диагностического значения АФП при обнаружении рака и других патологий печений, отклоненный от нормы уровень АФП указывает и на патологии беременности. Например, существует корреляция между сниженным АФП и наличием трисомии по 21-ой хромосоме, а также повышением риска преждевременных родов, спонтанных аборт и мертворождении [11].

Повышенные уровни АФП в амниотической жидкости, начиная с 16-ой недели внутриутробного развития могут свидетельствовать об аномалиях развития плода. Высокие концентрации АФП в крови матери могут указывать на гемолитическую болезнь плода, чаще всего при резус-конфликте [22].

АФП является одним из представителей семейства альбуминоидов. Помимо АФП в это семейство входят: альбумин, витамин D-связывающий протеин и афамин. Все эти белки объединены схожей белковой структурой, которая характеризуется наличием 3 петлеобразных доменов (Рисунок 3), стабилизированных дисульфидными связями [1]. Известно, что около 40 % его аминокислотной последовательности совпадает с последовательностью альбумина. АФП содержит большое количество сайтов связывания и функциональных последовательностей, что свидетельствует о широком спектре его функциональной активности [103].

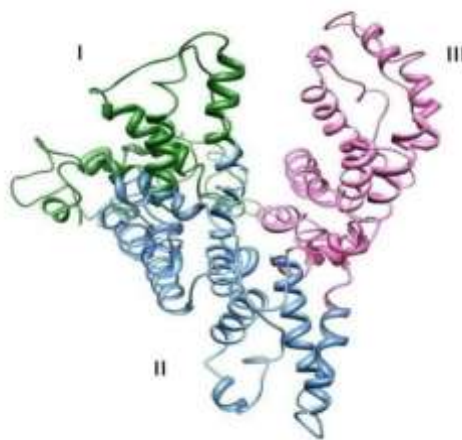


Рисунок 3 – Трехмерная структура АФП человека (I, II и III – глобулярные домены) [2]

Основной функцией АФП является перенос низкомолекулярных соединений от матери плоду. Преодолевая плаценту, АФП попадает в материнский кровоток и присоединяет гидрофобные вещества, которые необходимы эмбриону для нормального роста и развития. Вернувшись в кровоток плода, АФП вместе с

питательными веществами начинает циркулировать до тех пор, пока не обнаружит рецептор к АФП, который присутствует на всех клетках эмбриона. Помимо эмбриональных клеток, рецептор к АФП экспрессируют также и некоторые опухолевые клетки, а также моноциты и макрофаги [104, 105]. В настоящее время известно 30 АФП-связывающих рецепторов, которые принадлежат к классу рецепторов-мусорщиков. Несколько из них являются интегральными трансмембранными белками, которые участвуют в переносе АФП и связанных с ним лигандов внутрь клетки путем рецептор-опосредованного эндоцитоза [106]. Вероятно, АФП функционирует как аутокринный фактор роста для эмбриональных и раковых клеток, а для макрофагов служит фактором активации.

Иммуномодулирующая активность АФП. Альфа-фетопропротеин способен попадать в материнский кровоток через фетоплацентарный барьер и взаимодействовать с клетками иммунной системы. В исследованиях *in vitro* показано, что АФП снижает цитолитические эффекторные функции НК-клеток [31]. Позднее было продемонстрировано, что АФП достигает этого эффекта не напрямую, а через дендритные клетки [181].

В исследовании *in vitro* показано, что АФП способен индуцировать Т-лимфоциты для подавления первичного ответа антител [111], что косвенно указывает на существование хотя бы одного АФП-опосредованного механизма иммуносупрессии. Однако позже появились данные, которые показали, что этот эффект связан с тем, что АФП воздействует на Т-клетки не напрямую, а через взаимодействие с моноцитами [128]. В связи с этим, была выдвинута гипотеза поглощения молекулы АФП моноцитами. Для того, чтобы проверить это предположение, биохимическими методами был идентифицирован предполагаемый рецептор к АФП ($M_r \sim 65$ кДа). Однако до сих пор этот рецептор не охарактеризован. Тем не менее, эти исследования продемонстрировали определенное функциональное понимание, которое сводится к тому, что моноциты способны поглощать АФП с последующим выделением ими простагландина E2 (ПГЕ2) [174].

В работе, оценивающей механизмы воздействия АФП на дендритные клетки, было показано, что АФП снижает продукцию TNF- α и IL-12 с последующим апоптозом ДК [168].

В 2016 году стало известно, что АФП в эмбриональных концентрациях участвует в контроле функций регуляторных В-лимфоцитов, вызывая апоптоз этих клеток [53].

В целом, интерес ученых в изучении механизмов действия АФП, а также обнаружение определенных иммуносупрессорных свойств демонстрирует широкий функциональный потенциал данного белка. Именно это и дает перспективы его дальнейшего представления в контексте формирования иммунной толерантности.

1.2.3 – Гликоделин

Гликоделин (РАЕРР) – димерный гликопротеин молекулярной массой от 42 до 56 кДа, состоящий из 180 аминокислотных остатков. Гликоделин впервые был выделен Петруниным и Татариновым в 1976 году и характеризуется как антиген плаценты [3]. Гликоделин был обнаружен во всех гестационных периодах и изначально был отнесен к белку беременности, но позже стало известно, что он синтезируется в семенных пузырьках мужчин [182].

Существует несколько изоформ гликоделина, названных в зависимости от места его синтеза: амниотическая жидкость и эндометрий (GdA), фолликулы яичников (GdF), многослойный эпителий и яйценосный холмик (GdC), и семенная плазма (GdS). Формы гликоделина имеют различное гликозилирование, что ведет к разным биологическим эффектам [160]. Например, гликоделин А и F ингибируют связывание сперматозоида с яйцеклетками в женском репродуктивном тракте, а гликоделин S не обладает противозачаточной активностью [138]. Изоформа GdC имеет эффекты стимулирования связывания сперматозоидов с *zona pellucida* [140].

Гликоделин относят к семейству белков-микрोगлобулинов, проявляющих транспортные функции путем связывания стероидных гормонов и их дальнейшим аутокринным переносом в клетки [5]. Гликоделин стимулирует продукцию ХГЧ

клетками трофобласта, что указывает на его регуляторное действие во время беременности [72].

Экстракт децидуальной ткани, а также в обилии содержащийся в нем GdA способен иммуносупрессивные свойства [23]. GdA (РАЕР, простаген-ассоциированный белок эндометрия) – гликопротеин, продуцируемый секреторным и децидуализированным эндометрием [84]. В децидуальной оболочке концентрация GdA достигает максимума на 6-12 неделе беременности [153]. Именно в это время происходит развитие плаценты.

GdA модулирует иммунные клетки на границе мать-плод, принимая участие в поддержании нормального протекания беременности [83].

Иммунomodулирующая активность гликоделина. Подавление иммунного ответа во время беременности необходимо для успешной имплантации и сохранения беременности. Гликоделин А способен оказывать иммуносупрессивное воздействие на эндометрий. Биологическая активность GdA связана с взаимодействием его уникальных углеводных боковых цепей с мембранными рецепторами сиаловой кислоты (селектины, лектины Ig-связывающего типа), присутствующие на различных типах клеток границы мать-плод [30; 81; 85].

Механизм ингибирования может быть связан с блокированием синтеза IL-1 и IL-2, а также снижением активности НК [129; 130]. GdA принимает участие в дифференцировке эндометрия, трофобласта НК-клеток и Т-лимфоцитов [86, 87].

Исследования *in vitro*, посвященные изучению влияния гликоделина на иммунорегуляторные клетки беременных женщин показали, что препарат гликоделина повышает активность этих клеток после их совместной инкубации [5].

GdA может взаимодействовать с молекулой CD45 и вызывать апоптоз Т-лимфоцитов, в частности Th1, тем самым, сдвигая баланс в сторону Т-хелперов первого типа [83]. Известно, что GdA избирательно подавляет активированные Т-лимфоциты путем митохондриального притока кальция или индукцией апоптоза [108, 163], а также ингибирует трансдукцию и пролиферацию Т-лимфоцитов [131, 132]. Не так давно было показано, что GdA способствует дифференцировке наивных Т-лимфоцитов в фенотип Treg [117]. Таким образом, очевидно, что GdA

регулирует общее количество и функциональную активность Т-лимфоцитов децидуальной оболочки.

Децидуальные макрофаги составляют 20-30 % среди всех иммунокомпетентных клеток децидуальной оболочки [50]. В предимплантационном периоде моноциты мигрируют в децидуализированный эндометрий и дифференцируются в специфические макрофаги [162]. При воздействии гликоделином А на макрофаги было показано, что он не влияет на их жизнеспособность, фагоцитарную активность и клеточную гибель, однако, связывается с L-селектином, индуцируя экспрессию IL-6, который в свою очередь подавляет секрецию IFN- γ Т-хелперами [85]. Известно, что повышенный уровень IFN- γ коррелирует с осложнениями беременности или потерей плода, поэтому действие гликоделина может играть важную роль в поддержании иммунной толерантности.

Дендритные клетки децидуальной оболочки малочисленны (около 1 %), однако они обеспечивают определенный профиль цитокинов и рецепторов, поддерживая иммунную толерантность [161]. GdA подавляет экспрессию костимулирующих молекул CD80 и CD83 усиливает экспрессию DC-SIGN, тем самым влияя на индуцирование толерогенного фенотипа ДК из моноцитов [151]. Также GdA способен менять соотношение IL12/ IL-10 в сторону провоспалительного IL-10, и повышать эндопиноцитозную активность ДК, усиливая толерантность к антигенам [151].

Благодаря наличию уникальных углеводных боковых цепей GdA способен взаимодействовать с клеточной поверхностью различных типов клеток на границе мать-плод, в частности с трофобластами и иммунными клетками. Дальнейшее изучение биологической активности гликоделина и его возможные регуляторные функции, реализуемые через взаимодействие MDSC, позволит понять его роль в поддержании иммунной толерантности во время беременности.

1.2.4 – Хорионический гонадотропин

Хорионический гонадотропин человека (ХГЧ, hCG) представляет собой гетеродимерный гликопротеин с молекулярной массой 36-40 кДа, включающий две нековалентно связанные субъединицы – α и β [92]. α - субъединица ХГЧ идентична α - субъединицам гонадотропных гормонов гипофиза – лютеотропному гормону (ЛГ), фолликулостимулирующему гормону (ФСГ) и тиреотропному гормону (ТТГ). Напротив, β - субъединица ХГЧ различна с β - субъединицами ТТГ и ФСГ, но примерно на 80 % гомологична ЛГ. Именно уникальность β - субъединицы ХГЧ позволяет использовать ее в качестве специфического биомаркера.

ХГЧ является сложной молекулой, которая существует в разных молекулярных формах и участвует в основных репродуктивных процессах [127]. Посттрансляционные модификации ХГЧ приводят к появлению пяти известных на данный момент различных изоформ: «обычный» ХГЧ (regular hCG, rhCG), гипергликозилированный ХГЧ (Н-hCG), свободный β -ХГЧ (hCG β), гипергликозилированный свободный β -ХГЧ (Н-hCG β) и гипофизарный ХГЧ (p-hCG) [33]. Все они имеют разные биологические функции. Например, гипофизарный ХГЧ секретируется исключительно гипофизом, способствует овуляции ооцита, а во время менструального цикла совместно с ЛГ контролирует стероидогенез, индуцируя выработку андростенодиона и прогестерона в желтом теле. [36]. rhCG также индуцирует выработку прогестерона клетками желтого тела на ранних сроках беременности и поддерживает правильную имплантацию. rhCG способствует: образованию синцитиотрофобласта путем слияния клеток цитотрофобласта [155], формированию пуповины [135], росту органов плода [63], ангиогенезу [20]. Н-hCG синтезируется цитотрофобластом [147]. Именно Н-hCG является наиболее распространенной изоформой после имплантации, которая действует как ауто- и паракринный фактор, способствующий пролиферации и инвазии клеток цитотрофобласта [35]. А вот изоотипы hCG β и Н-hCG β указывают на наличие высокоинвазивных процессов, поскольку обе формы поддерживают рост и развитие опухолевых клеток, а их появление коррелирует с плохим прогнозом для раковых пациентов [34].

ХГЧ является одной из первых молекул, принимающих участие в модуляции места имплантации. Однако несмотря на то, что экспрессия гена *CGβ*, кодирующего структуру β-субъединицы, происходит уже с периода 8-клеточного эмбриона [24], активная секреция ХГЧ начинается со стадии бластоцисты [91]. ХГЧ в материнском кровотоке обнаруживается уже на 10 день после оплодотворения, а позже он активно продуцируется клетками трофобласта [72]. Этот процесс приводит к максимальным значениям ХГЧ на 9-11 неделе беременности. Дальнейшее снижение происходит потому, что основную функцию ХГЧ - стероидогенез и поддержание желтого тела, начинает выполнять плацента. К окончанию первого триместра уровень ХГЧ снижается, но остается повышенным по сравнению с небеременными женщинами.

У ХГЧ нет своего уникального рецептора, для связи с клетками он использует один рецептор с ЛГ. Причем для проявления тропной гормональной активности необходима только цельная молекула, отдельные субъединицы α и β ей не обладают [13]. Интересно, что β-субъединица ХГЧ гомологична TGF-β. Существует предположение, что ХГЧ способен блокировать рецептор TGF-β, таким образом, отменяя эффекты этого цитокина [34].

Иммуномодулирующие эффекты хорионического гонадотропина. На ранних стадиях процессов имплантации и плацентации эмбриона клетки иммунной системы играют очень важную роль. ХГЧ считается ключевой молекулой в этой иммунной регуляции. На сегодняшний день нет сомнений в том, что ХГЧ обладает иммуномодулирующей активностью, однако большая часть исследований носит феноменологический характер.

Участие иммунных клеток в поддержании беременности по факту начинается уже с периода менструального цикла. При выбросе ЛГ происходит индукция воспаления, при которой хемоаттрактант CCL20 способствует рекрутированию нейтрофилов, моноцитов, НК-клеток, дендритных клеток, а также В- и Т- лимфоцитов в яичники [32, 167]. ХГЧ, как и ЛГ увеличивает экспрессию CCL20 в яичниках, который также приводит к притоку лейкоцитов [14].

Показано, что ХГЧ усиливает пролиферацию Т- и В-лимфоцитов мышей, а его высокие дозы приводят к увеличению гуморального иммунного ответа [95]. В исследованиях *in vitro* ХГЧ способствует стимулированию митоген-индуцированной пролиферации лимфоцитов и синтезу иммуноглобулинов [165].

Низкие дозы ХГЧ угнетают пролиферацию и индуцируют апоптоз нейтрофилов [156, 157]. У беременных нейтрофилы активно проникают в плаценту, децидуальную и плодную оболочки для реализации защитной функции тканей плода [120; 61]. Вероятно, ХГЧ может принимать участие в контроле нейтрофилов, чрезмерная активность которых коррелирует с неблагоприятными исходами беременности [66, 61].

Плацентация эмбриона представляет собой, так называемое состояние контролируемого воспаления, при котором М1-макрофаги активно попадают из кровотока в децидуальную оболочку, эндометрий и миометрий [133]. После имплантации происходит процесс переключения на противовоспалительные М2-макрофаги для обеспечения толерантности к увеличению чужеродных фетальных антигенов. Считается, что этот сдвиг частично поддерживается ХГЧ [134, 56]. С другой стороны ХГЧ способен к стимулированию провоспалительных функций моноцитов и макрофагов человека, которые в свою очередь стоят на защите плода [12, 172]. Таким образом, очевидно, что ХГЧ принимает участие в регуляции важного иммунного баланса во время беременности.

Во время беременности важное значение имеют также маточные НК-клетки, которые отличны от периферических низким цитотоксическим потенциалом, а также наличием ангиогенного секреторного профиля [60]. Маточные НК являются важными клетками в процессах имплантации и плацентации, что подтверждено их высоким содержанием в первом триместре беременности [60]. Показано, что ХГЧ через сигнализацию маннозного рецептора увеличивает концентрацию эндометриальных НК, что в целом положительно влияет на имплантацию эмбриона [74].

Исследования как *in vitro*, так и *in vivo* показывают, что ХГЧ способен повышать уровень ИДО [166]. Существует несколько направлений

иммуносупрессивного действия ХГ по средством ИДО: дефицит триптофана в зоне контакта Т-лимфоцитов с клетками синцитиотрофобласта; снижение активности макрофагов; апоптоз Т-лимфоцитов, который индуирован побочными продуктами ИДО [52].

Принимая во внимание все вышеперечисленные эффекты ХГЧ в регуляции иммунного ответа, обеспечивающего толерантность во время беременности, становится очевидно, что ХГЧ является важным белком беременности, участвующим в сохранении плода.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ, ИЗЛОЖЕННЫМ В ГЛАВЕ 1

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и индексируемых в международных базах данных WoS, Scopus, RSCI:

1. Zamorina, S.A., Pregnancy-associated proteins as a tool in the therapy of autoimmune diseases and alloimmune disorders (review). S.A. Zamorina, Y.N. Troynich, N.P. Loginova, Y.A. Charushina, **K.Y. Shardina**, V.P. Timganova // Science and Global Challenges of the 21st Century - Science and Technology. Perm Forum 2021. Lecture Notes in Networks and Systems. Springer, Cham. – 2021. – Vol. 342.

2. **Шардина, К. Ю.** Роль миелоидных супрессорных клеток в процессах формирования иммунной толерантности в период беременности / К.Ю. Шардина, С. А. Заморина, М. Б. Раев, В. А. Черешнев // Цитология. – 2022. – Т. 64, № 2. – С. 116-125. [переводная версия] Shardina, K. Yu. The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Establishing Immune Tolerance during Pregnancy / K. Yu.

Публикации в других изданиях:

1. **Шардина, К.Ю.** Применение альфа-фетопропротеина в иммунофармакологии – история вопроса / К.Ю. Шардина, С.А. Заморина, М.Б. Раев, В.А. Черешнев // Вестник Пермского университета. Серия: Биология – 2020. – № 2. – С. 145-153.

ГЛАВА 2 – МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 – Объекты исследования

Исследование проводили согласно Хельсинской Декларации ВМА 2000 г. и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. В работе были использованы моноклеарные клетки периферической крови (МПК) условно здоровых доноров (женщины 22-42 лет, n=20). От доноров было получено добровольное информированное согласие.

2.2 – Белки и их разведения

В экспериментах использовали физиологические концентрации нативного АФП (Биалекса, Россия), соответствующие уровням в периферической крови матери в период беременности – для нативного АФП это 10, 50, 150 МЕ/мл. Выбранные концентрации соответствуют I, II и III триместрам беременности.

Максимальная концентрация гликоделина А к концу первого семестра достигает 2 мкг/мл, а максимальная концентрация белка во II триместре - 0,2 мкг/мл, после чего к третьему триместру уровень GdA снижается и не определяется [73]. В исследовании использовали физиологические концентрации рекомбинантного гликоделина (MyBioSource, США), которые также соответствуют его уровню в периферической крови беременных женщин, а также превышающую эти значения концентрацию – 10 мкг/ мл.

В работе использовали рекомбинантный ХГЧ (Овитрель, Израиль) в концентрациях 10 и 100 МЕ/мл. Выбранные концентрации соответствуют разным срокам беременности. На 10-12 неделе беременности концентрация гормона достигает 100 МЕ / мл, а в дальнейшем концентрация ХГЧ падает до 10 МЕ/ мл и держится до окончания беременности [34].

Белки разводили *ex tempore* полной питательной средой (ППС) (RPMI-1640, 10% FBS, 10 мМ Нерес («ICN Ph.», США), 2 мМ L-глутамин («ICN Ph.», США) и

100 мкг/мл пенициллина-стрептомицина-амфотерицина (100 мкл на 10 мл среды, «ВІ», Израиль)).

2.3 – Методы

2.3.1 – Фракционирование мононуклеарных клеток периферической крови.

Для выделения МПК была использована цельная венозная кровь, полученная от доноров-добровольцев путем венепункции. Кровь (27-54 мл) забирали в вакуумные пробирки с литий гепарином (Weihai Hongyu Medical Devices Co Ltd, Китай), после чего разводили в два раза раствором Хэнкса (ПанЭко, Россия). МПК выделяли путем наслаивания разведенной крови на градиент плотности фиколла (1,077 г/см³) (ДиаМ, Россия) с дальнейшим центрифугированием 40 минут при 400 g. После центрифугирования собирали образовавшееся мононуклеарное кольцо из каждой пробирки и дважды отмывали раствором Хэнкса в течение 20-ти минут при 350 g и 200 g (1-ая и 2-ая отмывки соответственно). Все отмывки за исключением последней (4°C) осуществлялись при комнатной температуре.

После всех отмывок удаляли супернатант, а осадок доводили до объема 1 мл раствором Хэнкса для дальнейшего подсчета общего количества МПК, а также их жизнеспособности. Оценка жизнеспособности происходила с добавлением к клеткам трипанового синего (Sigma Aldrich, Англия) в соотношении 1:1. Подсчет производили в камере Нейбауэра, процент живых клеток при описанных условиях составлял не менее 92%.

2.3.2 - *Иммуномагнитная сепарация CD33⁺- и CD 11b⁺- клеток.* Для того, чтобы из полученной клеточной суспензии выделить клетки с определённым поверхностным маркером был использован метод позитивной иммуномагнитной сепарации по технологии MACS® (Miltenyi Biotec, Германия). Суть метода заключается в использовании парамагнитных микросфер, покрытых моноклональными антителами против нужного поверхностного антигена (MicroBeads-частицы). Микросферы связываются с целевыми клетками, после чего полученную смесь пропускают через колонки, наполненные ферромагнитным

матриksom, которые закреплены в сепаратор MACS с мощным магнитным полем. Искомые клетки задерживаются в колонке (позитивная фракция), а клетки, не связавшиеся с MicroBeads-частицами, протекают в пробирку (негативная фракция).

Полученную суспензию МПК осаждали центрифугированием 10 минут при 300 g для того, чтобы клетки перевести в буфер Auto Macs Rinse Solution (Miltenyi Biotec, Германия) с добавлением 0,5% бычьего сывороточного альбумина (БСА). Клетки ресуспендировали в буфере Auto Macs Rinse Solution, содержащем 0,5% БСА, из расчета 80 мкл на каждые 10^7 клеток. К клеткам добавляли парамагнитные микрочастицы, конъюгированные с мышиными моноклональными антителами против молекулы CD33 или CD11b лимфоцитов человека (Miltenyi Biotec, Германия), исходя из расчета 20 мкл частиц на 10^7 клеток. Полученную смесь инкубировали 15 минут при 4°C. После инкубации к смеси клеток с MicroBeads-частицами производили отмывку центрифугированием в течение 10 минут при 300g и 4°C. После этого удаляли супернатант и ресуспендировали клетки в том же буфере из расчета 500 мкл на 10^8 клеток. Полученную суспензию вносили в колонку, находящуюся в магнитном поле. Колонку трижды промывали буфером, затем извлекая ее из магнитного поля сепаратора, элюировали CD33⁺ или CD11b⁺-клетки. Процедура магнитной сепарации была проведена на холоде. Описанную процедуру позитивной селекции осуществляли по протоколу изготовителя набора (Miltenyi Biotec, Германия). В результате процедуры сепарации чистота выделения CD11b⁺-клеток составляла $87,23 \pm 3,56$ %, а чистота выделения CD33⁺-клеток - $89,18 \pm 4,13$ %.

2.4 – Экспериментальные модели культивирования MDSC *in vitro*

2.4.1 - Схема культивирования MDSC из CD 33⁺-клеток периферической крови. Для оценки влияния белков беременности на дифференцировку MDSC использовали экспериментальную модель индукции MDSC из CD33⁺-клеток. В работе использовали монокультуры CD33⁺-клеток, полученные методом иммуномагнитной сепарации из МПК доноров - добровольцев (n=6). Для

направленной цитокиновой индукции CD33⁺-клеток в фенотип MDSC были использованы цитокины GM-CSF и IL-6, где GM-CSF выступает в роли ростового сигнала для миелоидных клеток, а IL-6 создает необходимый провоспалительный фон [82]. Концентрации цитокинов были выбраны методом подбора оптимальных, которые показали лучшие результаты предварительной экспериментальной схемы (данные не представлены).

CD33⁺-клетки в концентрации 1x10⁶ клеток/мл засеивали в 96-луночный планшет (Рисунок 4). Клетки культивировали в ППС с добавлением рекомбинантных цитокинов IL-6 (10 нг/мл) и GM-CSF (10 нг/мл) (Milteniy Biotech, Германия) в CO₂ – инкубаторе при 5 % CO₂ и 37 °С. Замену среды производили на 4-е сутки, тогда же вносили белки во всех выбранных концентрациях. Затем клетки культивировали еще 3 суток, после чего их собирали при помощи аккутазы согласно рекомендации производителя (Corning Scientific, Германия).

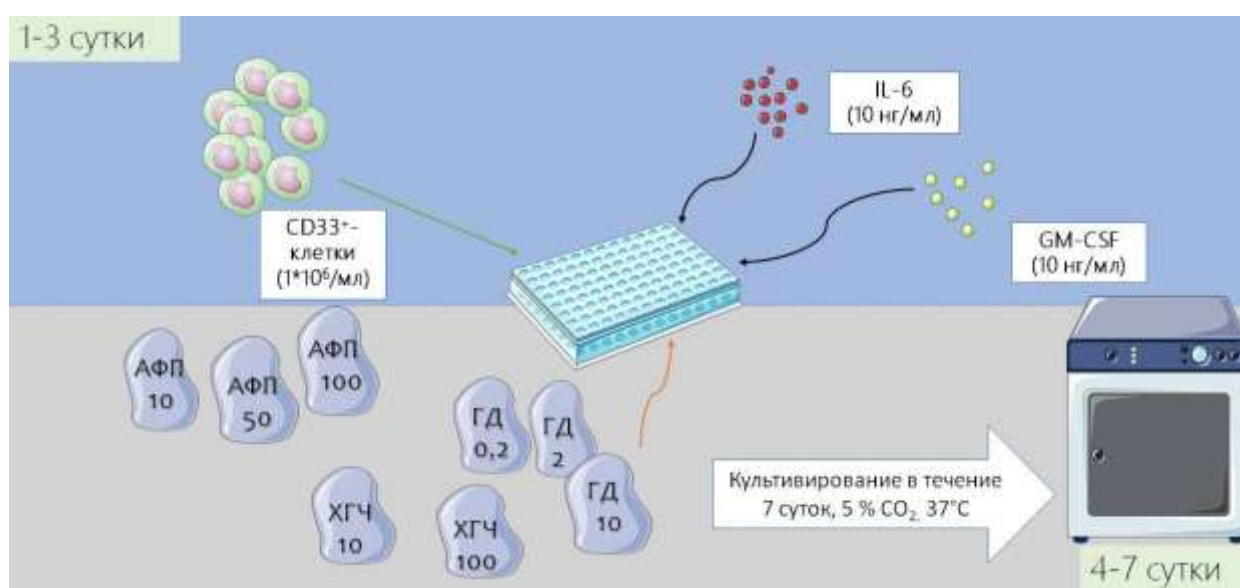


Рисунок 4 – Схема культивирования MDSC из CD33⁺-клеток

2.4.2 - Схема культивирования MDSC из CD 11b⁺-клеток периферической крови.

Для направленной дифференцировки MDSC из CD11b⁺-клеток была использована двухстадийная система добавления цитокинов [93]. Суть ее сводится

к тому, что на первом этапе происходит «лицензирование» клеток, направленное на миелоидный путь клеточного развития. Для этого авторами выбранной методики был использован GM-CSF, который является мощным фактором роста миелоидных клеток. Второй этап - клеточная активация. Этот этап представляет собой процесс иницирования сигнальных путей, с помощью которых клетки реализуют свои супрессивные функции. В данной экспериментальной схеме такими молекулами-активаторами выступают IL-1 β и ЛПС. Выбранные концентрации GM-CSF, IL-1 β и ЛПС были подобраны после проведения серии пилотных экспериментов (данные не представлены).

Выделенные из МПК доноров (n=7) CD11b⁺-клетки в концентрации 1*10⁶ клеток/мл засеивали в 96-луночный планшет в ППС, добавляя GM-CSF (MiltenyiBiotec, Германия) в концентрации 20 нг/ мл (рисунок 5). После этого клетки инкубировали двое суток в CO₂ – инкубаторе при 5 % CO₂ и 37 °С. По окончании первого этапа культивирования клеток производили смену среды. Затем в культуральную среду добавляли провоспалительный цитокин IL-1 β в концентрации 20 нг/мл (MiltenyiBiotec, Германия) и ЛПС в концентрации 0,1 мкг/мл (Sigma Aldrich, США). На следующий день добавляли АФП, гликоделин и ХГЧ во всех выбранных концентрациях. После добавления активационных молекул и белков клетки культивировали еще трое суток в тех же условиях. Спустя 7 суток культивирования клеточные культуры собирали с использованием аккутазы, дополнительно промывая лунки ледяным фосфатно-солевым буфером Дальбекко (DPBS) (Thermo Fisher Scientific, USA) для более качественного сбора.

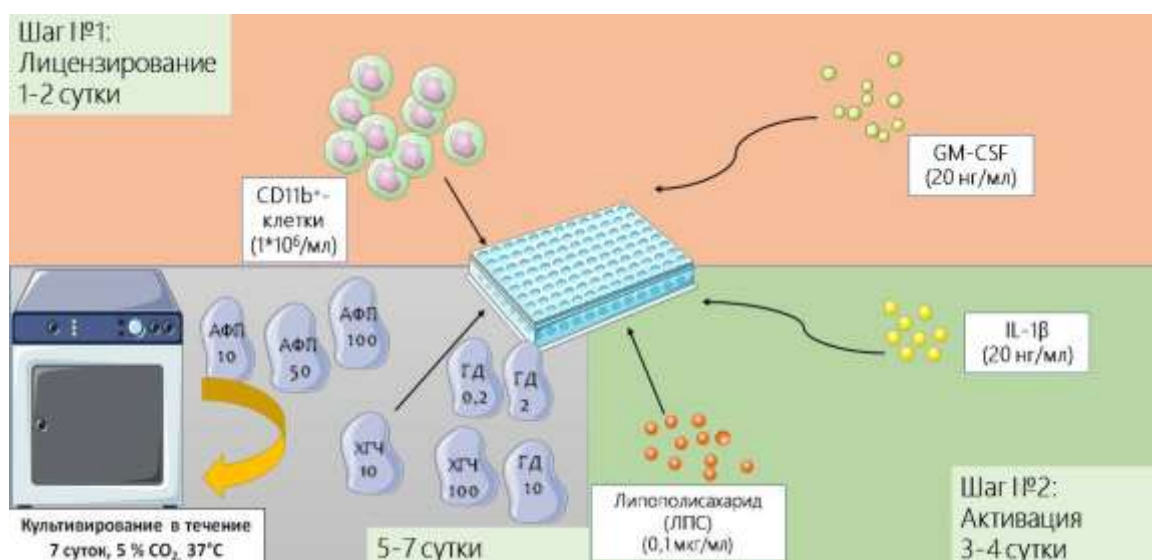


Рисунок 5 – Модель культивирования MDSC из CD11b⁺-клеток

2.4.3 – *Определение иммунофенотипа миелоидных супрессорных клеток в культурах методом проточной цитометрии*

Принцип метода. Проточная цитометрия – метод регистрации оптических сигналов преломления лазерного луча при прохождении потока клеток через него в режиме поштучного анализа. Регистрация сигнала происходит за счет автофлуоресценции, вызванной излучением собственных молекул клетки и специфической флуоресценции, связанной с излучением молекул, связанных с моноклональными антителами с флуоресцентной меткой.

Фенотипирование культуры проводили с использованием панели моноклональных антител к CD3, CD56, CD19, CD33, CD11b, HLA-DR, CD14, CD66b (R&D Systems, США) (Таблица 1). В качестве контролей, определяющих негативные популяции, использовали FMO (fluorescence minus one) пробы.

Таблица 1 – Панель моноклональных антител, использованная для идентификации MDSC

МАТ к CD-маркерам	Изотипы МАТ	Флуорохромы
<i>Позитивные CD-маркеры для определения фенотипа MDSC</i>		
CD11b	Мышиный IgG1	Alexa Fluor 405
CD33	Мышиный IgG1	APC
CD14	Мышиный IgG1	PerCP

Продолжение таблицы 1

CD66b	Мышиный IgG1	PE
<i>CD-маркеры для исключения других клеточных популяций</i>		
HLA-DR	Мышиный IgG1	Alexa Fluor 750
CD3	Мышиный IgG1	Alexa Fluor 700
CD19	Мышиный IgG1	Alexa Fluor 700
CD56	Мышиный IgG1	Alexa Fluor 700

После культивирования клетки осаждали 10 минут 1300 rpm и замораживали супернатант культур с целью дальнейшего мультиплексного анализа цитокинов. После этого клетки переносили в пробирки для анализа, для лучшего сбора лунки дополнительно промывали аккутазой и DPBS. Затем производили отмывку 1 мл DPBS, центрифугируя пробирки с культурами 10 минут при 350 g. Далее осуществляли окрашивание для определения их жизнеспособности суправитальным красителем Zombie Aqua (ZA) (Biolegend, USA) согласно протоколу производителя. Zombie Aqua - флуоресцентный краситель, который связывается с аминами клеток, проникая через поврежденные мембраны. Для окрашивания клеток ZA после центрифугирования максимально сливали надосадочную жидкость, добавляли 100 мкл 1000-кратного разведения ZA в каждую пробирку и инкубировали клетки 30 минут в темноте. После инкубации отмывали клетки в 2 мл DPBS в течение 10 минут при 350 g. Аккуратно сливали надосадок и добавляли по 1 мкл моноклональных антител всех видов в каждую пробирку, инкубируя суспензии 30 минут в темноте. По истечении времени инкубирования, клетки отмывали дважды 2 мл буфера для окрашивания проточной цитометрии (Staining Buffer) и переходили к внутриклеточному окрашиванию, там, где это было необходимо.

После этого буфером для окрашивания доводили общий объем пробы до 250 мкл, ресуспендировали и анализировали на проточном цитофлуориметре Cytotflex S (Beckman Coulter, США). Результаты были проанализированы в программе «CytExpert 2.4 software.» («Beckman Coulter», США). Сбор данных осуществляли до тех пор, пока не набиралось 50000 событий.

Тактика гейтирования. Гейтирование осуществляли согласно данным бокового (SSC, side scatter) и прямого светорассеяния (FSC, forward scatter), затем выделяли живые клетки, которые не окрашивались красителем Zombie Aqua. В гейте живых клеток, выбирали область, характеризующую Lin⁻ HLA-DR⁻ -клетки. Далее эти клетки отображали на двухпараметрическом графике CD11b / CD33.

Гейтированные таким образом живые $\text{Lin}^- \text{HLA-DR}^- \text{CD33}^+ \text{CD11b}^+$ отображали на двухпараметрическом графике CD66b и CD14 для определения M- и PMN-MDSC субпопуляций (Рисунок 6).

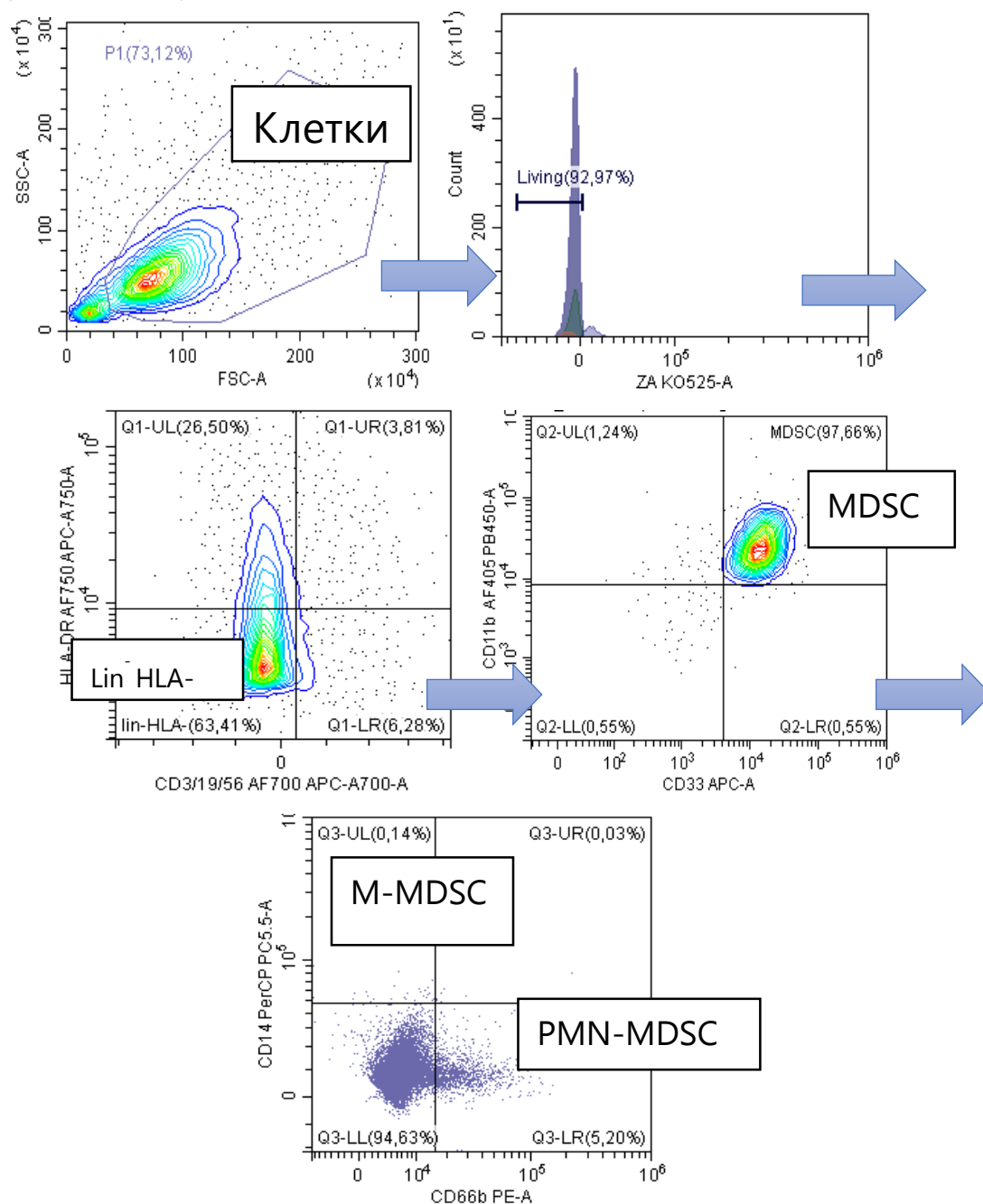


Рисунок 6 – Репрезентативный график, характеризующий тактику гейтирования MDSC

2.5 - Оценка внутриклеточного уровня индоламин-2,3-диоксигеназы и аргиназы-1

Оценку внутриклеточного уровня ферментов ИДО и Арг 1 производили пермеабиллизацией клеток с использованием моноклональных антител к ИДО (R&D Systems, США) и Арг 1 (R&D Systems, США) методом проточной цитометрии.

Пермеабилзация и фиксация клеток осуществлялась с помощью набора для фиксации / пермеабилзации Cytofix / Cytoperm (eBioscience, США).

После процедуры поверхностного окрашивания клетки осаждали 10 минут при 350 g, а затем фиксировали 100 мкл буфера для фиксации в течение 40 минут в темноте. После этого дважды отмывали буфером для пермеабилзации в течение 5 минут при 500 g. Затем сливали надосадок, ресуспендировали клетки в 100 мкл буфера для пермеабилзации и производили окрашивание моноклональными антителами (по 1 мкл каждого). Инкубировали клетки в течение 40 мин в темноте, после чего дважды промывали клетки 1 мл буфера для пермеабилзации в течение пяти минут при 500 g. После процедур фиксации и пермеабилзации окрашенные клетки ресуспендировали в 250 мкл Staining Buffer и производили анализ на проточном цитометре (*Рисунок 7*).

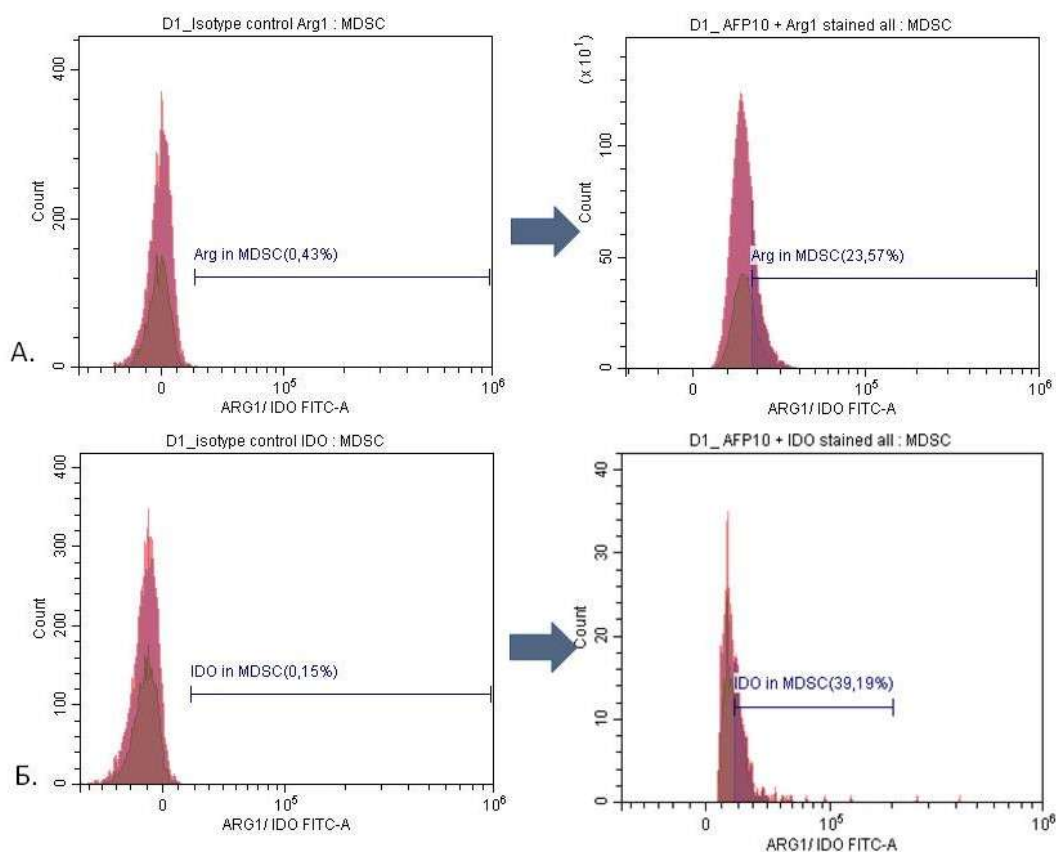


Рисунок 7 – Репрезентативный график, демонстрирующий изменение уровней ферментов Arg1 и IDO

Примечание: А. Изменение уровня Arg1 после добавления АФП по сравнению с контролем АФП Б. Изменение уровня и IDO после добавления АФП по сравнению с контролем АФП.

2.6 - Оценка цитокинового профиля в супернатантах культур миелоидных супрессорных клеток

Супернатанты культур CD33⁺- CD11b⁺- клеток, индуцированных в фенотип MDSC, собирали и замораживали для дальнейшего анализа цитокинового профиля. Количественное определение группы цитокинов в супернатантах культур, полученных методом центрифугирования в течение 15 минут при 1000 об/мин и 4°C производили в проточном флуоресцентном анализаторе MAGPIX (BioRad, США) с использованием коммерческого набора Bio-Plex Pro Human Inflammation panel 1 37-plex (Bio-Rad, США). Набор включает в себя определение 37 провоспалительных цитокинов (APRIL / TNFSF13, BAFF / TNFSF13B, sCD30 / TNFRSF8, sCD163, Chitinase-3-like 1, gp130 / sIL-6R β , IFN- α 2, IFN- β , IFN- γ , IL-2, sIL-6R α , IL-8, IL-10, IL-11, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-19, IL-20, IL-22, IL-26, IL-27 (p28), IL-28A / IFN- λ 2, IL-29/IFN- λ 1, IL-32, IL-34, IL-35, LIGHT / TNFSF14, MMP-1, MMP-2, MMP-3, Osteocalcin, Osteopontin, Pentraxin-3, sTNF-R1, sTNF-R2, TSLP, TWEAK / TNFSF12). Отмывки планшета производили с помощью ручного магнитного промывателя.

Технология мультиплексного анализа представляет собой использование полимерных микросфер, несущих на своей поверхности зонды к определенным молекулам. Микросферы включают 2-3 флуорофора различных концентраций, которые имеют разное соотношение, позволяющее создавать уникальные спектральные характеристики разных микросфер. Именно эти спектральные характеристики и способен считать анализатор.

Микросферы, ковалентно связанные с антителами, добавляли в каждую лунку планшета в количестве 50 мкл. После чего осуществляли промывку и вносили образцы и стандарты, инкубируя их со связанными микросферами в планшете 1 час при постоянном перемешивании (850 rpm) в темноте. По окончании инкубирования, планшет промывали трижды, вносили биотинилированные детектирующие антитела для создания сендвич-комплекса и также инкубировали планшет 30 минут при постоянном перемешивании (850 rpm) в темноте. Затем для создания окончательного комплекса микросферы-антитела захвата -образец-

детектируемые антитела-флуоресцентная метка добавляли стрептавидин-фикоэритрин (SA-PE) в объеме 50 мкл на лунку после трехкратной промывки планшета. После чего инкубировали планшет в течение 10 минут при постоянном помешивании (850 rpm) в темноте. После 3-кратной промывки в каждую лунку вносили 125 мкл буфера для измерения, встряхивали планшет 30 секунд при 850 rpm и помещали его на платформу анализатора для измерения. Регистрацию результатов проводили, используя программное обеспечение xPONENT (для построения стандартных кривых использовали 5-параметрический логистический (5PL) метод анализа). Обработку полученных данных осуществляли в программе Belysa. Концентрация каждого вещества была рассчитана с использованием стандартной кривой в соответствии с инструкциями производителя. Результаты представлены в «нг/мл».

2.7 - Статистический анализ результатов

При выборе методов статистической обработки результатов основывались на типе данных и характере их распределения. Нормальность распределения данных проводили с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Для решения проблемы множественных сравнений использовали поправку Бонферрони.

Данные представлены в виде блочных диаграмм, которые включают первый и третий квартили, медиану, а также минимальное и максимальное значение выборки. Для сравнения зависимых выборок был использован непараметрический вариант дисперсионного анализа – критерий Фридмана. Статистические различия считали значимыми при $p < 0,05$ (на графике помечены * и/ или #). Часть данных представлена в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей (Me (Q1-Q3)). В ряде случаев рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена. Полученные данные обрабатывали в программе GraphPad Prism 8 (StatSoft Inc., США).

ГЛАВА 3 – РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 – Разработка модели получения миелоидных супрессорных клеток из периферической крови человека в системе *in vitro*

Для разработки экспериментальной модели получения MDSC учитывали малочисленность популяции этих клеток в периферической крови. У здоровых людей уровень MDSC в периферической крови составляет менее 0,5 % [4].

На сегодняшний день изучение популяции MDSC на клеточной культуре человека *in vitro* возможно единственным путем – направленной индукцией клеток человека в фенотип MDSC с помощью цитокинов. Согласно этой логике, нами была проведена серия пилотных экспериментов получения MDSC из МПК периферической крови (n=3) (Приложение А). Однако в результате было выяснено, что для исследования популяции MDSC необходим поиск других клеток для их дальнейшей цитокиновой индукции, поскольку среди всех популяций в культуре МПК процент MDSC достигал всего 2-2,3 % (данные не представлены).

MDSC принято делить на две группы клеток: полиморфноядерные или гранулоцитарные (PMN-MDSC, CD33^{low} CD11b⁺ CD14⁻ CD15⁺/ CD66b⁺) и моноцитарные (M-MDSC, CD33⁺ CD11b⁺ CD14⁺ HLA-DR^{- / low} CD15⁻/ CD66b), отличающихся по поверхностным маркерам и происхождению. Именно поэтому логика наших исследований заключалась в том, чтобы получить MDSC из клеток, сепарированных по двум преобладающим маркерам: CD33 (M-MDSC) и CD11b (PMN-MDSC). Такой подход позволил нам получить более многогранную информацию о влиянии исследуемых белков на дифференцировку MDSC.

3.1.1 – Генерация миелоидных супрессорных клеток из CD33⁺-клеток

Для изоляции нужного типа клеток из МПК периферической крови был выбран один из преобладающих маркеров MDSC- CD33. Молекула CD33 является антигеном поверхности миелоидных клеток, поэтому в лунки культурального планшета были засеяны клетки миелоидного ряда периферической крови. Важным

аспектом при разработке схемы индукции MDSC было получение клеток в достаточном количестве при минимальных расходах для возможности оценки эффектов белков беременности на них.

Выбор цитокинов для индукции MDSC был основан на исследовании, в котором комбинации различных иммунных факторов клеточных линий солидных опухолей человека, индуцирующих MDSC, инкубировали с МПК периферической крови здоровых доноров [82]. После культивирования авторы оценивали способность цитокинов генерировать супрессивные CD33⁺-клетки, ингибирующие аутологичные Т-лимфоциты *in vitro*. В результате исследователи пришли к выводу, что лучшим сочетанием цитокинов для индукции MDSC являются GM-CSF и IL-6.

В процессе разработки экспериментальной модели индукции MDSC из CD33⁺-клеток подбор концентраций и времени культивирования осуществляли опытным путем, исходя из биологической активности цитокинов. В результате недельного культивирования CD33⁺-клеток с цитокинами GM-CSF и IL-6 уровень MDSC составлял $94,2 \pm 0,017$ % среди всех живых Lin-HLA-DR⁻ - клеток. По сравнению с контролем количество клеток увеличилось в среднем в 21 раз (рисунок 9).

3.1.2 - Генерация миелоидных супрессорных клеток из CD11b⁺-клеток

Другая экспериментальная схема была основана на выделении клеток периферической крови доноров, несущий другой важный поверхностный маркер MDSC - CD11b. CD11b – интегрин, который преимущественно экспрессируется на моноцитах и гранулоцитах. Поскольку в лунки культурального планшета были засеяны другие исходные клетки, необходимо было подобрать новые условия дифференцировки клеток в фенотип MDSC.

При подборе сигнальных молекул после серии пилотных экспериментов была выбрана новая стратегия генерации MDSC, которая была основана на уже разработанном способе [93]. Суть этой стратегии заключается в том, что в культуру клеток цитокины необходимо добавлять в два этапа. Первый этап носит название «лицензирование» и заключается в том, что сначала необходимо подать клеткам ростовой сигнал, для их дальнейшего развития по миелоидному пути. Для

реализации этого этапа подходят колониестимулирующие факторы. В нашей экспериментальной схеме был использован цитокин GM-CSF (colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)). GM-CSF – миелоидный фактор роста, который способен проявлять толерогенные свойства в зависимости от его концентрации и локализации [126]. В нормальных физиологических условиях GM-CSF управляет миелопоэзом, но при возникновении патологических условий, этот фактор становится избыточным, способствуя генерации MDSC [97]. В данном случае помимо того, что GM-CSF служит фактором роста, он также способствует пролиферации и позволяет клеткам, принимая сигналы активации, приобретать супрессивную функцию [139]. Второй этап – этап активации, представляющий собой инициирование сигнальных путей, через которые будут реализовываться супрессорные функции клеток [93]. Эти сигналы опосредованы DAMP и воспалительными цитокинами. В нашей экспериментальной схеме были использованы IL-1 β и ЛПС, взаимодействующие с клетками с помощью таких сигнальных путей, как NF- κ B, STAT1 и STAT6 [38]. Для выбора концентраций цитокинов и LPS были проведены пилотные эксперименты, результаты которых в полной мере реализовывали необходимые эффекты.

В результате недельного культивирования CD11b⁺-клеток с цитокинами GM-CSF, IL-1 β и ЛПС уровень MDSC составлял $53,05 \pm 0,04$ % среди всех живых Lin⁻ HLA-DR⁻ - клеток, по сравнению с контролем количество MDSC увеличилось в среднем в 43 раза (Рисунок 11).

На сегодняшний день MDSC получают в основном из костного мозга мышей или из опухолей. Однако стратегической задачей настоящего исследования была разработка экспериментальной модели, включающей работу с клетками здоровых доноров для возможности получить MDSC в системе *in vitro*. Поиск такой модели является трудной задачей, поскольку до сих пор однозначно не определено происхождение MDSC, а также не установлено микроокружение необходимое для индукции этих клеток. Новизна данной работы сводится к разработке протоколов генерации MDSC из нормальных клеток периферической крови, поскольку в

дальнейшем этот способ может упростить исследование MDSC за счет доступности биоматериала.

При сравнении двух экспериментальных схем стоит отметить, что выбор разных поверхностных молекул для клеточной изоляции, подразумевает засеивание в культуральный планшет отличающихся исходных типов клеток, а также их соотношений, что в целом и привело к различным результатам. Помимо этого, есть аспект, который демонстрирует преимущество использования схемы с выделением CD11b⁺-клеток над схемой выделения CD33⁺-клеток. Дело в том, что CD33 имеет два иммунорецепторных мотива (ITIM), которые передают ингибирующие сигналы внутрь клетки, поэтому при изоляции CD33⁺-клеток могут возникать нежелательные эффекты после взаимодействия магнитных сфер с молекулой-мишенью [41]. При изоляции CD11b⁺-клеток, наоборот, нарушения супрессорных функций клеток *ex vivo* не наблюдается [139]. Так, молекула CD11b⁺ в MDSC экспрессируется более стабильно, чем CD33, поэтому CD11b до сих пор является лучшим маркером для идентификации миелоидных клеток человека.

РЕЗЮМЕ

Таким образом, протокол генерации MDSC из CD11b⁺- клеток периферической крови оптимален при условиях двухэтапного добавления цитокинов в конечной концентрации 20 нг/ мл для IL-1 β и для ЛПС- 0,1 мкг/ мл, смена культуральной среды - на третьи сутки. В модели индукции MDSC из CD33⁺-клеток оптимально использовать по 10 нг/ мл цитокинов (IL-6 и GM-CSF), смена культуральной среды - на четвертые сутки ингибирования. В обеих экспериментальных схемах культивирование длится в течение 7 суток.

3.2 – Роль фетоплацентарных белков в регуляции дифференцировки миелоидных супрессорных клеток

3.2.1 – Влияние альфа-фетопротейна, гликоделина и хорионического гонадотропина человека на конверсию выделенных CD33⁺-клеток в фенотип MDSC

Во время беременности уровень MDSC повышается в периферической крови [59] и децидуальной оболочке [19]. К моменту рождения их концентрация в организме матери падает [78]. Считается, что MDSC в период беременности выполняет иммуносупрессивные функции, а подавление иммунного ответа, в свою очередь, играет определяющую роль в успешности имплантации и сохранении беременности.

Один из подходов изучения иммунной толерантности во время беременности – исследование регуляторных свойств, которые формируют фетальные белки [6]. Очевидно, что для реализации своего действия необходима трансдукция сигналов внутрь клетки-мишени с помощью поверхностных рецепторов к этим белкам.

Рецептор к АФП присутствует на большинстве эмбриональных клеток, раковых клетках, а также на клетках моноцитарно - макрофагального ряда [104, 105]. На сегодняшний день известно около 30 АФП-связывающих рецепторов-мусорщиков [106].

Известно, что GdA имеет уникальные боковые цепи, взаимодействующие с мембранными рецепторами сиаловой кислоты, которые присутствуют на различных тканях клеток границы мать-плод [30, 81, 85]. У ХГЧ нет своего уникального рецептора, поэтому для связи с клетками он использует общий рецептор с ЛГ.

На сегодняшний день нет данных о взаимодействии фетальных белков с MDSC, поэтому основной задачей нашего исследования было установить возможную взаимосвязь между ними. Первый шаг - оценка влияния белков выбранных концентраций на процесс конверсии клеток в иммунофенотип MDSC.

Жизнеспособность в гейте клеток на графике светорассеяния составляла 98,57 (94,09-98,84) %. В результате эксперимента установлено, что выбранные цитокины способствуют дифференцировке клеток в фенотип MDSC (*Рисунки 8 и 9*), что свидетельствует об адекватности экспериментальной схемы. Продемонстрировано, что АФП и ХГЧ не влиял на уровень генерации MDSC из сепарированных CD33⁺-клеток в сравнении с контролем. В то же время, гликоделин в низких (0,2 и 2 мкг/мл), но не в высокой концентрации снижал общий уровень MDSC (*Рисунок 9*). Ранее в наших экспериментах, посвященных влиянию гликоделина на дифференцировку регуляторных Т-лимфоцитов, был показан аналогичный эффект. Гликоделин в концентрации 0,2 мкг/мл снижал уровень Treg в культурах клеток за счет угнетения пролиферации активированных Т-хелперов [7].

Регуляторные Т-лимфоциты, как и MDSC играют важную роль в процессе беременности, поскольку эти субпопуляции клеток обладают выраженной супрессивной активностью. Очевидно, что данный эффект является неожиданным и не соответствует рабочей гипотезе, согласно которой белки беременности должны повышать уровень супрессорных клеток. Однако в наших исследованиях гликоделин снижал уровень супрессорных клеток, что говорит об особой роли этого белка.

Таким образом, установлено, что в культуре CD33-клеток, индуцированных в фенотип MDSC, ХГ и АФП не оказывали достоверных эффектов, а гликоделин (0,2 и 2 мкг/мл) снижал уровень этих клеток.

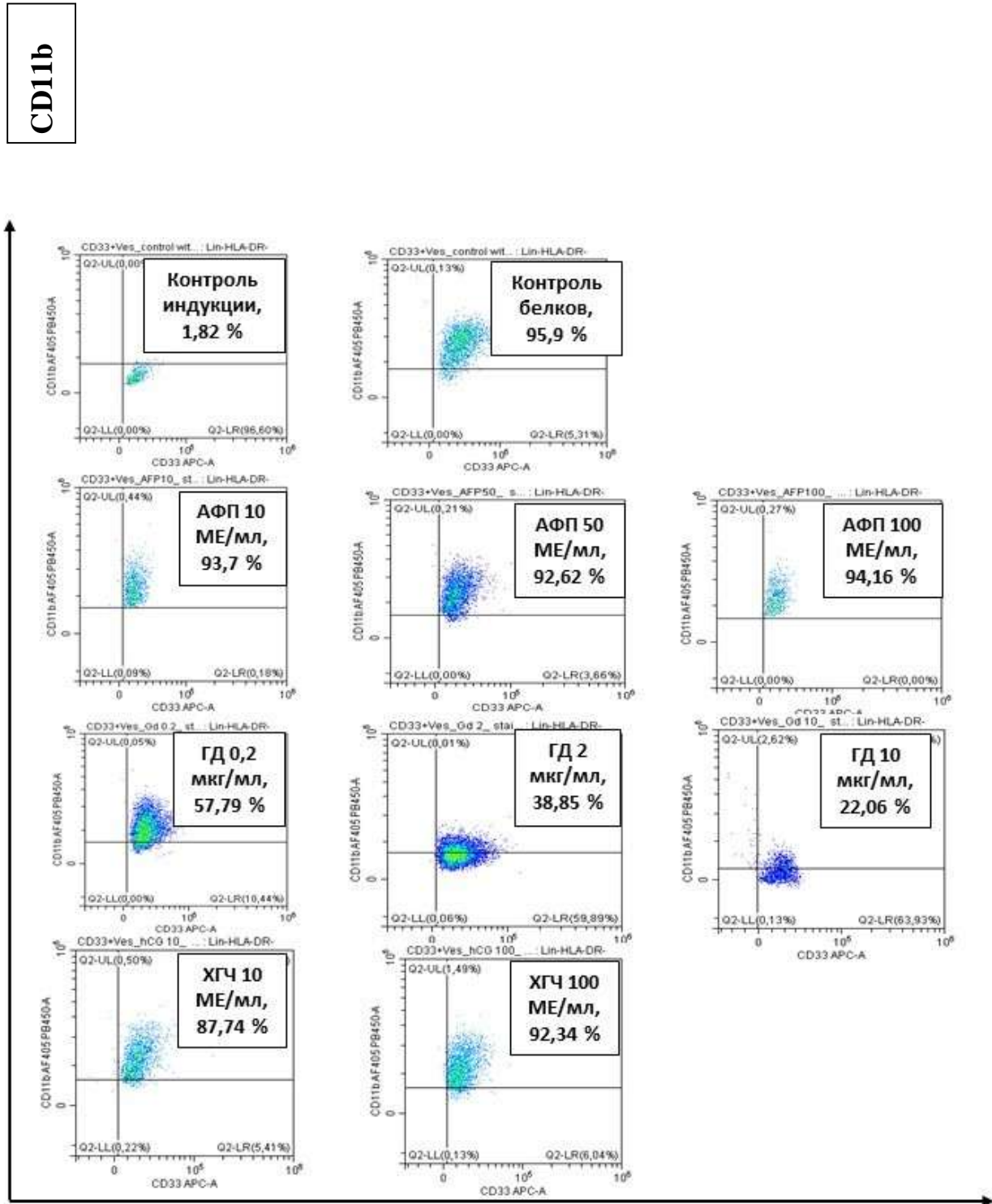


Рисунок 8 – Влияние альфа-фетопротеина (АФП), гликоделина (ГД) и хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) на конверсию CD33⁺-клеток в фенотип MDSC на примере одного эксперимента

Примечание: на гистограммах продемонстрирована экспрессия маркеров CD11b и CD33 от общего гейта живых Lin⁻HLA-DR⁻клеток.

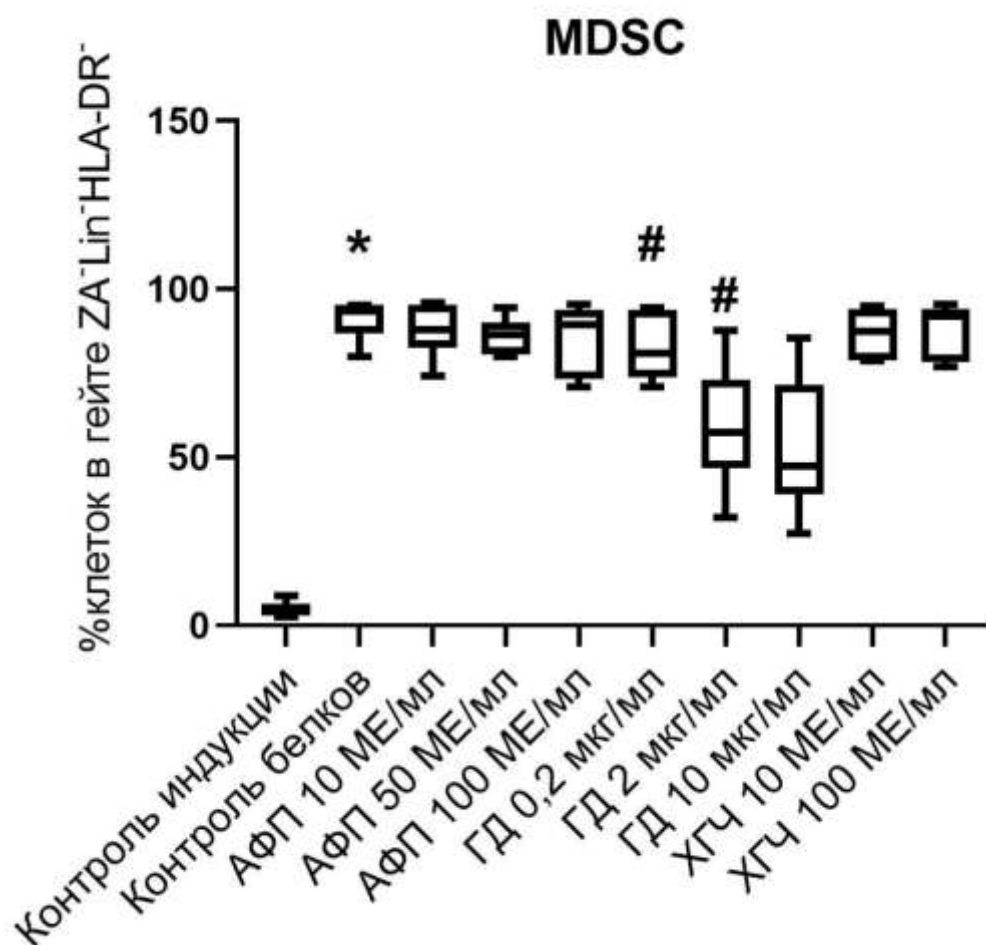


Рисунок 9 – Влияние альфа-фетопротейна (АФП), гликоделина (ГД) и хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) на конверсию CD33⁺-клеток в фенотип MDSC (M±m, n=6)

Примечание: представлены медианы, межквартильный диапазон (Q1-Q3), минимальное и максимальное значения; ось ординат – процент клеток в гейте живых Lin⁻HLA-DR⁻клеток, * - достоверные по критерию Фридмана отличия между контролем индукции (культура без добавления цитокинов и белков) и контролем белков (культура с добавлением цитокинов и без белков), # - достоверные по критерию Фридмана отличия с контролем белков

3.2.2 – Влияние альфа-фетопротейна, гликоделина и хорионического гонадотропина человека на дифференцировку CD33⁺-клеток в субпопуляции MDSC

Установлено, что белки во всех концентрациях не влияют на дифференцировку клеток в фенотип PMN-MDSC (Таблица 2). В то же время, исследуемые белки способны увеличивать уровень другой субпопуляции

миелоидных супрессоров – M-MDSC. Так, ГД и ХГЧ повышали уровень M-MDSC во всех использованных концентрациях. Причем с увеличением концентрации ХГЧ прослеживалась тенденция к уменьшению популяции, а с увеличением концентрации ГД, наоборот, достоверное увеличение (около 30%). Показано, что АФП не влиял на уровень M-MDSC в культуре индуцированных CD33⁺-клеток.

Таким образом, в культуре CD33-клеток, индуцированных в фенотип MDSC на уровне субпопуляций было показано, что АФП не оказывал достоверных эффектов, а ГД и ХГ не влияли на уровень PMN-MDSC, но повышали процентное содержание M-MDSC.

Таблица 2 – Влияние АФП, ГД, ХГЧ на экспрессию маркеров субпопуляций MDSC (PMN-MDSC и M-MDSC) (n=6, Me (Q1-Q3))

Экспериментальное воздействие		PMN-MDSC, %	M-MDSC, %
Контроль индукции		0,31 (0,083-0,515)	2,60 (1,708-3,873)
+GM-CSF, IL-6	Контроль белков	1,56 (1,045-1,908)	0,75 (0,410-3,530)
	АФП 10 МЕ/ мл	0,53 (0,067-2,393)	14,18 (12,06-17,45)
	АФП 50 МЕ/ мл	0,37 (0,142-2,128)	9,73 (8,320-15,30)
	АФП 100 МЕ/ мл	0,56 (0,270- 1,385)	12,22 (8,913-17,80)
	ГД 0,2 мкг/ мл	0,69 (0,275-2,350)	35,62* (20,48-54,07)
	ГД 2 мкг/ мл	0,15 (0,000-1,025)	75,17* (57,91-89,69)
	ГД 10 мкг/ мл	0,16 (0,000-3,208)	91,58* (85,72-96,99)
	ХГЧ 10 МЕ/ мл	0,46 (0,173-1,473)	37,56* (29,42-40,63)
	ХГЧ 100 МЕ/ мл	0,61 (0,000-1,778)	28,62* (25,53-37,30)

Примечание. *- достоверные (p <0,05) различия по сравнению с контролем белков

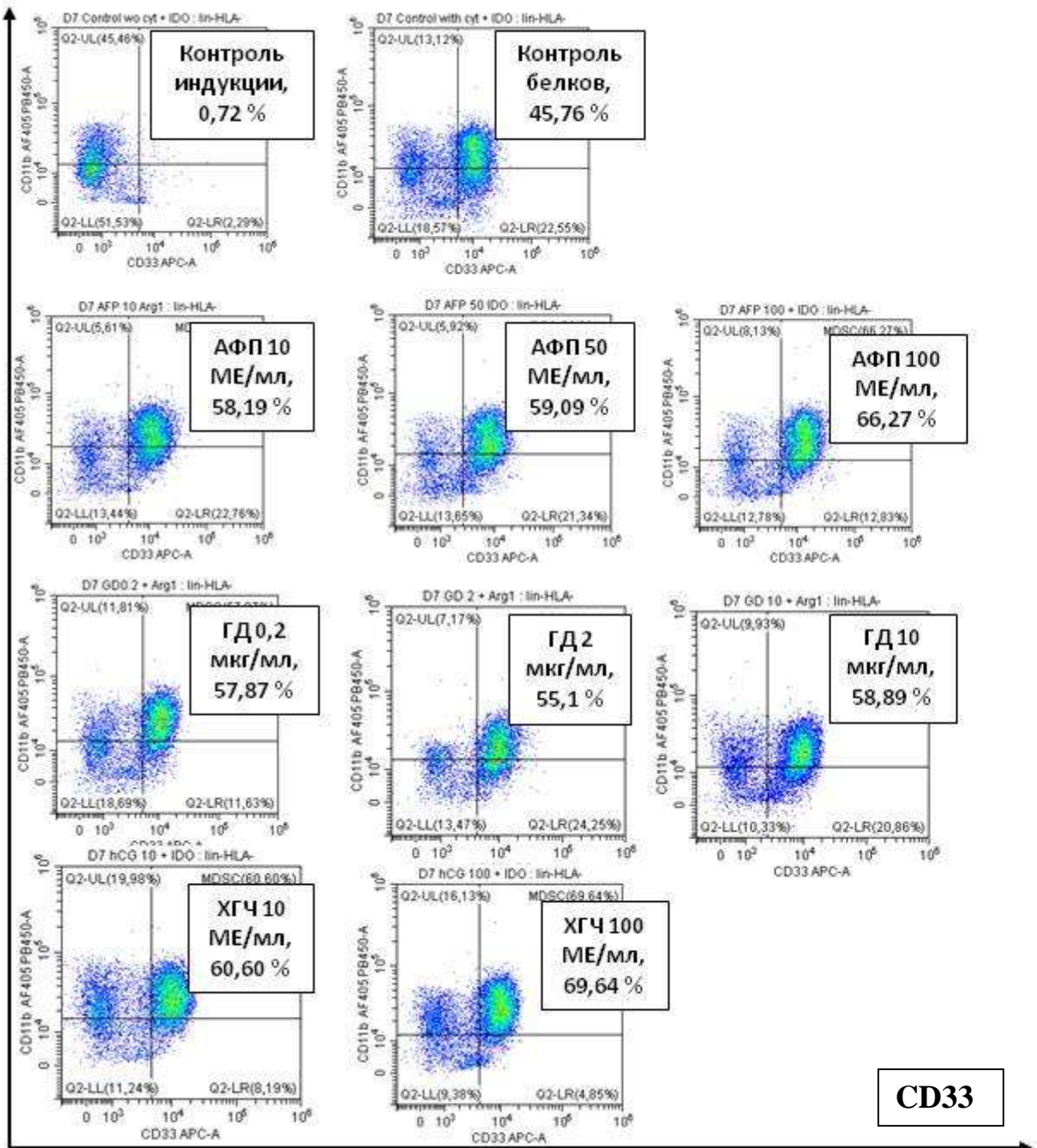
3.2.3 – Влияние альфа-фетопротейна, гликоделина и хорионического гонадотропина человека на конверсию выделенных CD11b⁺-клеток в фенотип MDSC

После семи суток культивирования CD11b⁺-клеток с белками, было показано, что выбранные цитокины – GM-CSF, IL1-β, а также ЛПС способствуют дифференцировке клеток в иммунофенотип MDSC (Рисунки 10 и 11). Жизнеспособность в гейте клеток на графике светорассеяния составляла 98,13 (94,09-98,84) %.

Показано, что в среднем АФП, ГД и ХГЧ демонстрируют видимую тенденцию к расширению пула MDSC, однако, статистически значимые различия с контролем белков были найдены только у ХГЧ в обеих концентрациях (10 и 100 МЕ/ мл).

Таким образом, установлено, что в культуре CD11b⁺-клеток, индуцированных в фенотип MDSC, ГД и АФП не оказывали достоверных эффектов, однако ХГЧ повышал уровень этих клеток.

CD11b



CD33

Рисунок 10 – Влияние альфа-фетопротейна (АФП), гликоделина (ГД) и хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) на конверсию CD11b⁺-клеток в фенотип MDSC на примере одного эксперимента

Примечание: на гистограммах продемонстрирована экспрессия маркеров CD11b и CD33 от общего гейта живых Lin⁺HLA-DR⁻—клеток.

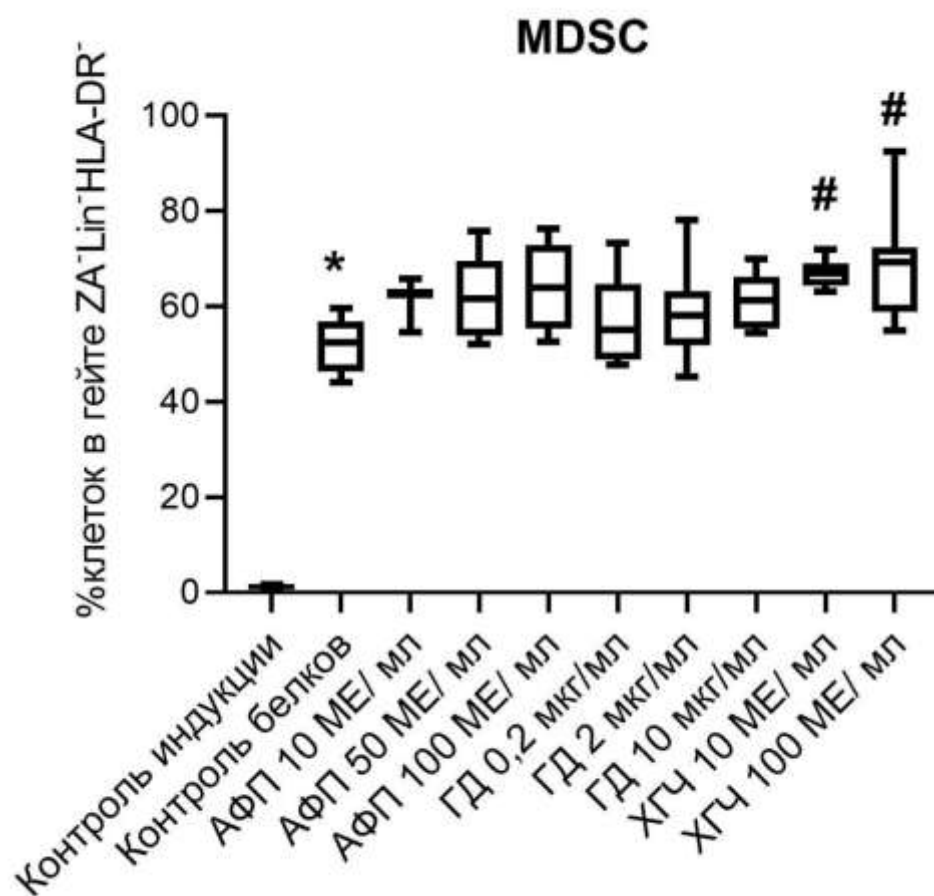


Рисунок 11 – Влияние альфа-фетопротейна (АФП), гликоделина (ГД) и хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) на конверсию CD11b⁺-клеток в фенотип MDSC (n=7)

Примечание: представлены медианы, межквартильный диапазон (Q1-Q3), минимальное и максимальное значения; ось ординат – процент клеток в гейте живых Lin⁺HLA-DR⁻ - клеток* - достоверные по критерию Фридмана отличия между контролем индукции (культура без добавления цитокинов и белков) и контролем белков (культура с добавлением цитокинов и без белков), # - достоверные по критерию Фридмана отличия с контролем белков.

3.2.4 – Влияние альфа-фетопротейна, гликоделина и хорионического гонадотропина на дифференцировку CD11b⁺-клеток в субпопуляции MDSC

В схеме получения MDSC из CD11b⁺-клеток показано, что цитокины и ЛПС способны статистически значимо увеличивать уровень M-MDSC, но не PMN-MDSC внутри популяции MDSC (Таблица 3). Интересно, что, как и в схеме

получения MDSC из CD33⁺-клеток, достоверно значимого увеличения субпопуляции PMN-MDSC не наблюдалось. Скорее всего, это связано с тем, что выбранные цитокины изначально не способствовали образованию PMN-MDSC (таблица 3). В то же время, в процессе беременности расширение пула происходит именно за счет PMN-MDSC, что позволяет предположить, что эти клетки могут быть мишенями для белков, ассоциированных с беременностью. Однако мы не можем исключать и воздействие других факторов.

В целом все белки имеют тенденцию к повышению уровня именно M-MDSC, однако статистически значимые различия найдены у: АФП в низкой и средней концентрациях- 10 и 50 МЕ/ мл; у гликоделина в концентрациях 2 и 10 мкг/ мл; у ХГЧ в концентрации 10 МЕ/ мл (Таблица 3).

Таблица 3 - Влияние АФП, ГД, ХГЧ на экспрессию маркеров субпопуляций MDSC (PMN-MDSC и M-MDSC) (n=7, Me (Q1-Q3))

Экспериментальное воздействие		PMN-MDSC, %	M-MDSC, %
Контроль индукции		0,040 (0,020-0,095)	0,090 (0,065-0,165)
+GM-CSF, IL-1 β и ЛПС	Контроль белков	0,375 (0,020-1,713)	7,835 # (0,767-9,608)
	АФП 10 МЕ/ мл	0,400 (0,243-4,525)	34,59* (32,87-37,33)
	АФП 50 МЕ/ мл	0,490 (0,257-1,553)	26,84* (21,32-42,60)
	АФП 100 МЕ/ мл	0,710 (0,340-3,780)	23,28 (19,48-25,80)
	ГД 0,2 мкг/ мл	0,445 (0,140-3,405)	23,87 (17,90-29,49)
	ГД 2 мкг/ мл	0,420 (0,202-0,982)	46,90* (39,11-51,18)
	ГД 10 мкг/ мл	0,455 (0,077-2,773)	59,74* (50,09-72,76)
	ХГЧ 10 МЕ/ мл	0,345 (0,112-6,353)	27,09* (25,19-29,64)
	ХГЧ 100 МЕ/ мл	1,395 (0,305-3,713)	25,30 (23,70-30,93)

Примечание. *- достоверные (p < 0,05) различия по сравнению с контролем белков, # - достоверные (p < 0,05) различия контроля индукции с контролем белков

Таким образом, в культуре CD11b⁺-клеток, индуцированных в фенотип MDSC, на уровне субпопуляций было показано, что АФП, ГД и ХГ не влияли на пул PMN-MDSC, однако существенно повышали уровень M-MDSC

3.2.5 . Оценка внутриклеточного уровня аргиназы-1 и индоламин-2,3-диоксигеназы в культуре CD11b⁺-клеток после культивирования с фетоплацентарными белками

Для идентификации MDSC важно понимать, что на сегодняшний день у этих клеток нет уникального маркера, по которому можно безошибочно определить клеточную принадлежность к этой группе. Именно поэтому для определения MDSC дополнительно проводят функциональные тесты или устанавливают экспрессию определенных белков, которые им присущи. В нашем исследовании для этих целей мы измеряли внутриклеточную экспрессию ферментов - аргиназы-1 и ИДО. MDSC опосредует ингибирующий эффект посредством многих механизмов, в том числе через истощение L-аргинина (экспрессией Арг 1) и L-триптофана (экспрессией ИДО) [89].

В результате эксперимента показано, что влияния белков на экспрессию Арг 1 в пуле MDSC не было (*таблица 4*). Возможно, это связано с тем, что в организме индукция Арг 1 в миелоидных клетках опосредуется цитокинами Т-хелперов 2-го типа, такими как IL-4, IL-13, IL-10, TGF- β , ПГЕ 2 [16; 39] и также в отсутствии антигенной стимуляции не происходит синтеза аргиназы-1.

Напротив, фермент ИДО в MDSC был обнаружен. АФП в низких концентрациях 10 и 50 МЕ/ мл, ГД во всех концентрациях и ХГЧ в низкой концентрации (10 МЕ/ мл) увеличивают экспрессию ИДО по сравнению с контролем. Однако достоверное увеличение было продемонстрировано только гликоделином в концентрации 10 МЕ/ мл.

Таблица 4 – Влияние альфа-фетопротейна, гликоделина и хорионического гонадотропина человека на продукцию аргиназы -1 в MDSC после 7-ми суток культивирования CD11b⁺-клеток (n=7, Me (Q1-Q3))

Экспериментальное воздействие		Процент клеток с фенотипом MDSC, продуцирующих Арг 1, %
Контроль индукции		0,150 (0,025-0,447)
+ \cup	Контроль белков	0,920 (0,212-1,538)

АФП 10 МЕ/ мл	0,180 (0,120-0,300)
АФП 50 МЕ/ мл	0,155 (0,072-0,200)
АФП 100 МЕ/ мл	0,145 (0,065-0,517)
ГД 0,2 мкг/ мл	0,510 (0,177-0,985)
ГД 2 мкг/ мл	0,215 (0,022-1,143)
ГД 10 мкг/ мл	0,905 (0,115-2,745)
ХГЧ 10 МЕ/ мл	1,335 (0,39-1,978)
ХГЧ 100 МЕ/ мл	0,145 (0,082-0,312)

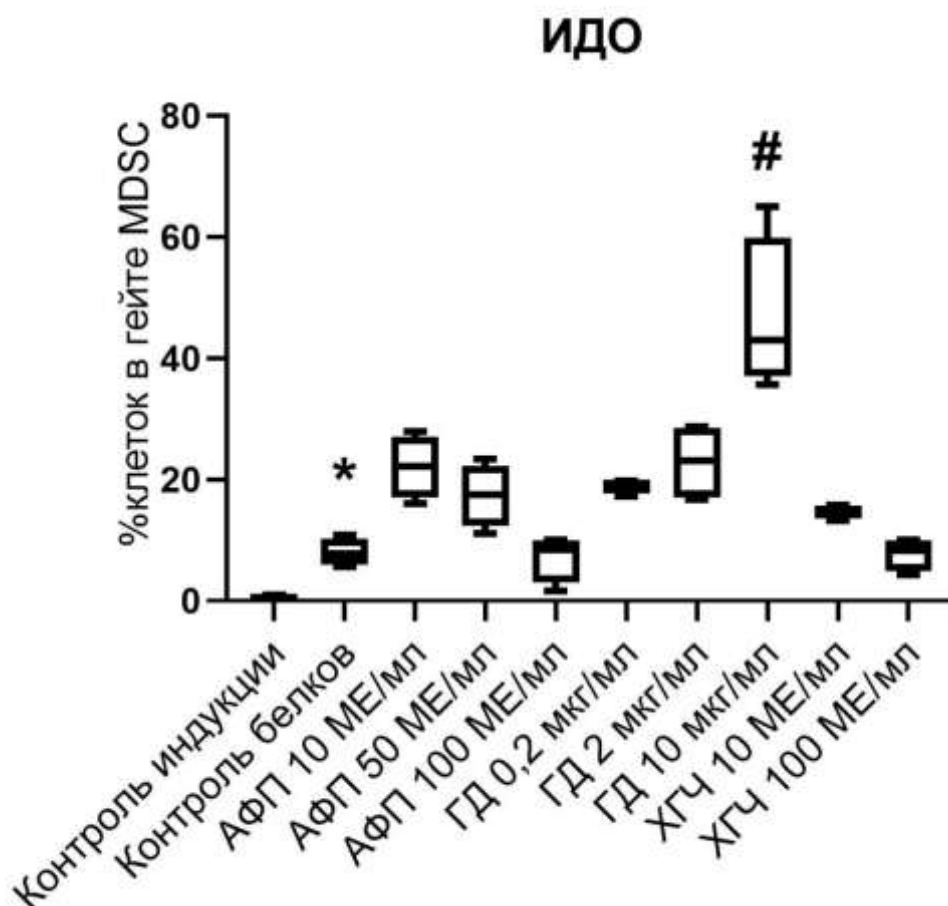


Рисунок 12 – Влияние альфа-фетопротейна (АФП), гликоделина (ГД) и хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) на продукцию индоламин-2,3-диоксигеназы (ИДО) в культуре CD11b⁺-клеток после 7-ми суток инкубации (n=7)

Примечание: представлены медианы, межквартильный диапазон (Q1-Q3), минимальное и максимальное значения; ось ординат – процент клеток в гейте MDSC, * - достоверные по критерию Фридмана отличия между контролем индукции (культура без добавления цитокинов и белков) и контролем белков (культура с добавлением цитокинов и без белков), # - достоверные по критерию Фридмана отличия с контролем белков (культура с добавлением цитокинов и без белков)

3.3 – Роль фетоплацентарных белков в регуляции продукции цитокинов клетками, индуцированными в фенотип MDSC

В процессе эволюции иммунная система развивалась так, чтобы защищать организм от патогенов. Именно поэтому иммунитет млекопитающих направлен на сохранение плода без ущерба для материнского организма во время беременности. При этом плод является полуаллогенным, а значит, иммунная система должна быть нацелена на защиту плода от патогенного воздействия и сопровождаться динамическими изменениями иммунных реакций. Несмотря на то, что на сегодняшний день существует большое количество исследований на тему поддержания иммунной толерантности при беременности, информация о ключевых механизмах регуляции для обеспечения качественного развития плода, остается недостаточной.

Для протекания успешной беременности важно осуществление скоординированного взаимодействия материнского организма с плодом. Иммунные клетки, а также выделяемые ими цитокины являются мостом для поддержания этой коммуникации. Цитокины, воздействуя на сигнальные пути, способны изменить клеточную дифференцировку и ремоделировать ткани.

В нашей работе важно было отследить общие тенденции изменения профиля и способность фетоплацентарных белков воздействовать на продукцию цитокинов клетками в культуре. Методом мультиплексного анализа оценивали содержание следующих маркеров:

1. 15 провоспалительных цитокинов (IL-27 (p28), IL-2, IL-8, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-20, IL-26, IL-27 (p28), IL-28A / IFN- λ 2, IL-32, IL-34, LIGHT / TNFSF14, TSLP, TWEAK/ TNFSF12, IL-22);
2. 6 противовоспалительных цитокинов (IL-10, IL-11, IL-19, IL-35, Pentraxin-3, Chitinase-3-like 1);
3. 5 цитокинов семейства TNF и их рецепторов (APRIL / TNFSF13, BAFF / TNFSF13B, sTNF-R1, sTNF-R2, sCD30/ TNFRS8);
4. 3 матриксных металлопротеиназ (MMP-1, MMP-2, MMP-3);

5. 3 растворимых рецептора (sCD163, gp 130/ sIL6R β , sIL-6R α);
6. 2 маркера формирования костной ткани (Osteocalcin, osteopontin);
7. 3 интерферона (IFN- α 2, IFN- β , IFN- γ).

Ниже представлены только те данные, которые имели статистически значимое различие ($p < 0,05$). Результаты анализа всех цитокинов представлены в приложениях (приложения Б и В).

3.3.1 – Анализ цитокинов супернатантов культур CD33⁺-клеток

В результате мультиплексного анализа установлено, что ХГЧ и АФП ни в одной из использованных концентраций не модулировали продукцию цитокинов APRIL / TNFSF13, BAFF / TNFSF13B, sCD30 / TNFRSF8, sCD163, Chitinase-3-like 1, gp130 / sIL-6R β , IFN- α 2, IFN- β , IFN- γ , IL-2, sIL-6R α , IL-8, IL-10, IL-11, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-19, IL-20, IL-22, IL-26, IL-27 (p28), IL-28A / IFN- λ 2, IL-29/IFN- λ 1, IL-32, IL-34, IL-35, LIGHT / TNFSF14, MMP-1, MMP-2, MMP-3, Osteocalcin, Osteopontin, Pentraxin-3, sTNF-R1, sTNF-R2, TSLP, TWEAK / TNFSF12 в культурах клеток.

Однако было установлено, что гликоделин (2 и 10 мкг/ мл) способен достоверно увеличивать уровень IL-20 в клеточной культуре (*Рисунок 13*).

IL-20 – провоспалительный цитокин с ангиогенными свойствами, продуцируемый моноцитами. IL-20 играет важную роль в иммунных реакциях, а также регуляции воспаления [143]. IL-20 обладает множественными функциями. С одной стороны, он участвует в ремоделировании тканей и поддерживает их целостность во время инфекции, с другой – действует в качестве сигнала к ингибированию фагоцитоза, экзоцитоза гранул и миграции активированных нейтрофилов [64].

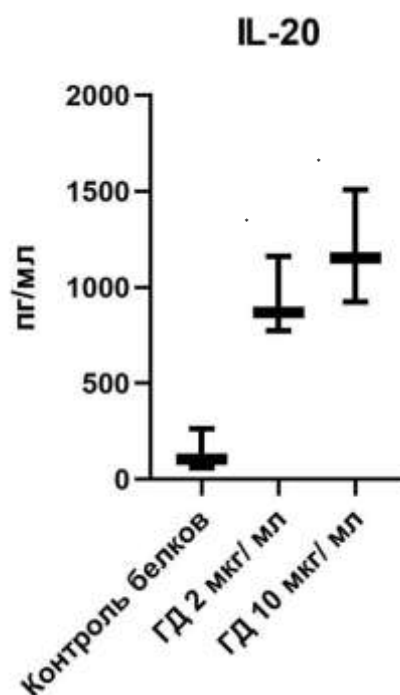


Рисунок 13 – Влияние гликоделина на продукцию IL-20 CD33⁺-клетками, индуцированными в фенотип MDSC

Примечание: *- достоверные ($p < 0,05$) различия медианных значений ($n=6$) по сравнению с контролем белков с использованием непараметрического критерия Фридмана; представлены медианы, межквартильный диапазон (Q1-Q3), минимальное и максимальное значения

Гликоделин в высоких концентрациях усиливал выработку провоспалительного цитокина IL-20. Во время беременности этот цитокин вырабатывают оболочки плода, а он, в свою очередь действует как ингибирующий агент для TNF [101].

Таким образом, оценка цитокинового профиля CD33⁺-клеток, индуцированных в фенотип MDSC, показала, что АФП и ХГЧ не модулируют данные показатели, в гликоделин (2 и 10 мкг/мл) повышал уровень IL-20, не влияя на другие цитокины.

3.3.2 – Анализ цитокинов супернатантов культур CD11b⁺-клеток

В результате эксперимента показано, что ХГЧ не влиял на цитокиновый профиль культуры, а конкретно на следующие цитокины: APRIL / TNFSF13, BAFF / TNFSF13B, sCD30 / TNFRSF8, sCD163, Chitinase-3-like 1, gp130 / sIL-6R β , IFN- α 2,

IFN- β , IFN- γ , IL-2, sIL-6R α , IL-8, IL-10, IL-11, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-19, IL-20, IL-22, IL-26, IL-27 (p28), IL-28A / IFN- λ 2, IL-29/IFN- λ 1, IL-32, IL-34, IL-35, LIGHT / TNFSF14, MMP-1, MMP-2, MMP-3, Osteocalcin, Osteopontin, Pentraxin-3, sTNF-R1, sTNF-R2, TSLP, TWEAK / TNFSF12.

Однако было показано супрессивное влияние АФП на продукцию цитокина IL-19, а гликоделина – на продукцию цитокинов IFN- α 2, IL-26, IL-19, TWEAK/ TNFSF12. А конкретно, в культуре CD11b⁺-клеток, индуцированных в фенотип MDSC наблюдалось уменьшение концентрации цитокинов в супернатантах: IFN- α 2 (ГД 10 мкг/ мл), IL-26 (ГД 2 и 10 мкг/ мл), IL-19 (АФП, 100 МЕ/ мл, ГД 2 мкг/ мл), TWEAK/ TNFSF12 (ГД 2 мкг/ мл) (*Рисунок 14*).

IFN- α 2 – гликопротеин, обладающий противовирусным и иммуномодулирующим действием [62]. Известно, что IFN- α 2 способствует пролиферации наивных CD8-клеток и инактивации регуляторных Т-лимфоцитов. IL-26 так же, как и IFN- α 2, является провоспалительным цитокином с противовоспалительными и противомикробными свойствами [90]. IL-19 долгое время считали противовоспалительной молекулой, гомологичной IL-10, однако на сегодняшний день IL-19 считают регуляторным цитокином. С одной стороны, IL-19 способствует продукции цитокинов Th2, а с другой - посредством IL-6 и TNF- α обладает провоспалительными свойствами [148]. TWEAK/ TNFSF12 (Tumor necrosis factor receptor superfamily member 12A) – цитокин, способный к индукции апоптоза в клетках и регуляции ангиогенеза [176]. Гликоделин оказался способен подавлять продукцию данных цитокинов в условиях *in vitro*, в то время как АФП снижал только уровень IL-19.

Интересно, что в данном случае фетоплацентарные белки только в некоторых концентрациях влияли на продукцию цитокинов культурой клеток. В экспериментальной схеме получения MDSC из CD11b⁺-клеток наблюдается подавление продукции цитокинов, поддерживающих развитие воспалительного процесса (IFN- α 2, IL-26, IL-19, TWEAK/ TNFSF12), что в целом может указывать на способность к регуляции иммунного ответа.

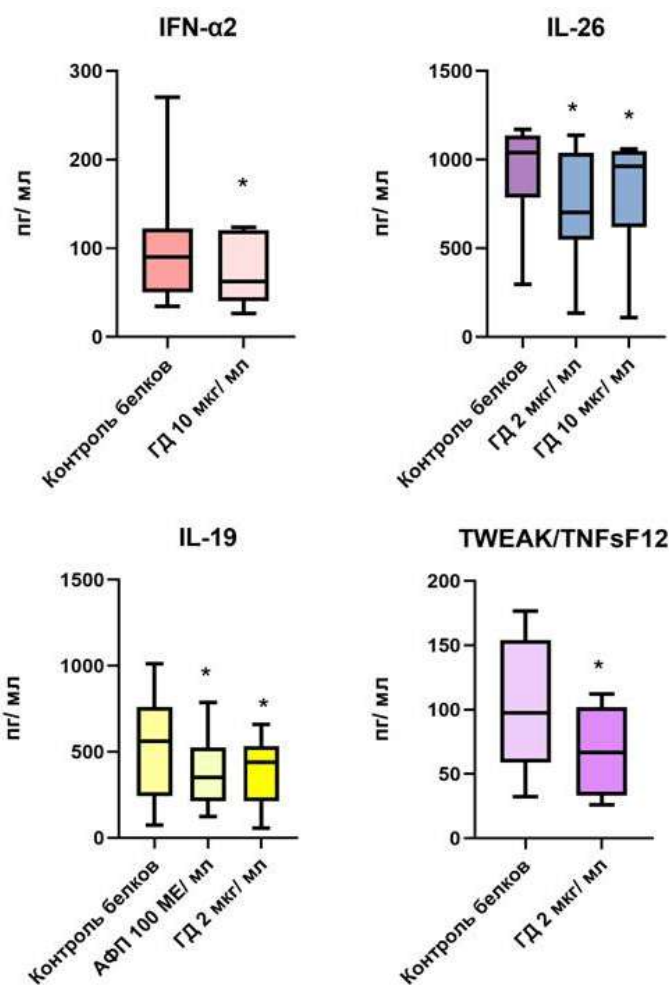


Рисунок 14 – Влияние фетоплацентарных белков на продукцию цитокинов CD11b⁺-клетками, индуцированными в фенотип MDSC, при которых наблюдалось достоверное уменьшение их концентрации

Примечание: *- достоверные ($p < 0,05$) различия медианных значений ($n=7$) по сравнению с контролем белков с использованием непараметрического критерия Фридмана; представлены медианы, межквартильный диапазон (Q1-Q3), минимальное и максимальное значения.

Таким образом, оценка цитокинового профиля CD11b⁺-клеток, индуцированных в фенотип MDSC показала, что ХГЧ не модулируют измеренные показатели, в то время как гликоделин снижает уровень IFN-α 2, IL-26, IL-19, TWEAK/ TNFSF12, а АФП – IL-19.

РЕЗЮМЕ

Таким образом, установлено, что альфа-фетопротеин и хорионический гонадотропин не влиял на дифференцировку CD33⁺-клеток в фенотип миелоидных супрессорных клеток, а гликоделин (0,2 и 2 мкг/мл) подавлял генерацию этих клеток. При анализе результатов на уровне субпопуляций установлено, что фетоплацентарные белки не влияли на генерацию полиморфноядерных MDSC, но при этом повышали уровень моноцитарных MDSC (гликоделин и хорионический гонадотропин).

В отношении MDSC, полученных из CD11b⁺-клеток установлено, что хорионический гонадотропин повышал общее количество MDSC в культуре, однако на уровне субпопуляций установлено, что альфа-фетопротеин в концентрациях 10 и 50 МЕ/мл, гликоделин (2 и 10 мкг/ мл) и хорионический гонадотропин (10 МЕ/мл) стимулировали генерацию моноцитарных MDSC.

Показано, что оба разработанных протокола не подходят для исследования экспрессии аргиназы-1, поскольку условия схемы культивирования не индуцируют дифференцировку полиморфноядерных MDSC. Однако, продукция ИДО в наших условиях в MDSC определяется и гликоделин в сверхфизиологической концентрации 10 мкг/мл усиливал ее экспрессию.

При анализе цитокинового профиля в супернатантах культур CD33⁺-клеток, индуцированных в фенотип MDSC, установлено, что гликоделин (2 и 10 мкг/ мл) повышал уровень IL-20. В то же время, оценка цитокинового профиля CD11b⁺-клеток, индуцированных в фенотип MDSC показала, что ХГЧ не модулируют измеренные показатели, в то время как гликоделин снижает уровень IFN- α 2, IL-26, IL-19, TWEAK/ TNFsF12, а АФП – IL-19.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ,

ИЗЛОЖЕННЫМ В ГЛАВЕ 3

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и индексируемых в международных базах данных WoS, Scopus, RSCI:

1. Тимганова, В.П. Получение миелоидных супрессорных клеток человека в экспериментальной модели *in vitro* / В.П. Тимганова, М.С. Бочкова, У.В. Ужвиюк,

К.Ю. Шардина, С.А. Заморина, М.Б. Раев // Российский иммунологический журнал – 2020. – Т. 23, № 2. - С. 157-162.

2. Заморина, С.А. Роль гликоделина в регуляции дифференцировки миелоидных супрессорных клеток / С.А. Заморина, В.П. Тимганова, **К.Ю. Шардина**, С.В. Ужвиюк, М.С. Бочкова, П.В. Храмцов, М.Д. Кропанева, М.Б. Раев // Медицинская иммунология. – 2021. – Т. 23, № 4. – С. 329- 334.

3. Заморина, С.А. Влияние альфа-фетопротейна на дифференцировку миелоидных супрессорных клеток / С.А. Заморина, **К.Ю. Шардина**, В.П. Тимганова, М.С. Бочкова, С.В. Ужвиюк, М.Б. Раев, В.А. Черешнев // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. – 2021. – Т. 501, № 1. – С. 569-572. [переводная версия] Zamorina, S. A. Effect of Alpha-Fetoprotein on Differentiation of Myeloid Supressor Cells / S.A. Zamorina, **K. Yu. Shardina**, V. P. Timganova, M. S. Bochkova, S. V. Uzhviyuk, M. B. Raev, V. A. Chereshev // BIOCHEMISTRY, BIOPHYSICS AND MOLECULAR BIOLOGY. – 2021. – Vol. 501. – P. 569–572.

4. Черешнев, В.А. Роль альфа-фетопротейна в регуляции дифференцировки и функциональной активности миелоидных супрессорных клеток / В.А. Черешнев, С.А. Заморина, **К.Ю. Шардина**, С.В. Ужвиюк, В.П. Тимганова, М.С. Бочкова, П.В. Храмцов, М.Б. Раев // Вестник Пермского федерального исследовательского центра. – 2022. – № 2. – С. 56-63.

5. **Shardina, K.Yu.** Generation of human myeloid-derived suppressor cells from CD11b⁺ cells in vitro / K.Yu. Shardina, V.P. Timganova, M.S. Bochkova, S.V. Uzhviyuk // Springer Nature. Perm Forum 2022. Lecture Notes in Networks and Systems -2022- Vol. 622 – P.539-547.

6. **Шардина, К.Ю.** Альфа-фетопротейн как фактор дифференцировки и функциональной активности миелоидных супрессорных клеток / К.Ю. Шардина, С.А. Заморина, В.П. Тимганова, М.С. Бочкова, С.В. Ужвиюк, В.А. Черешнев // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2023 – №2. – С. 83-91.

7. **Шардина, К.Ю.** Изучение влияния хорионического гонадотропина человека на дифференцировку и функциональную активность миелоидных супрессорных клеток / К.Ю. Шардина, В.П. Тимганова, М.С. Бочкова,

С.В. Ужвиюк, С.А. Заморина // Биологические мембраны. – 2023 – Т.40, №. – С. 404-412.

Публикации в других изданиях:

8. Заморина, С.А. Гликоделин как фактор дифференцировки миелоидных супрессорных клеток / С.А. Заморина, С.В. Ужвиюк, **К.Ю. Шардина**, М.Д. Кропанева, В.П. Тимганова, М.С. Бочкова, П.В. Храмцов, М.Б. Раев // Материалы XII Всероссийского конгресса молодых ученых-биологов с международным участием. – 2020. – С.103-105.

9. **Шардина, К.Ю.** Роль альфа-фетопротеина в регуляции дифференцировки миелоидных супрессорных клеток / К.Ю. Шардина, С.А. Заморина, В.П. Тимганова, М.С. Бочкова, С.В. Ужвиюк // Сборник материалов 24-й Пущинской школы-конференции молодых ученых. – Пущино, 2020. – С. 200-201.

10. **Шардина, К.Ю.** Роль белков беременности в дифференцировке миелоидных супрессорных клеток / **К.Ю. Шардина**, В.П. Тимганова, С.А. Заморина // Мать и Дитя – 2021: материалы Всероссийского научно-образовательного форума. – Москва, 2021. – С.143-144.

11. **Шардина, К.Ю.** Получение миелоидных супрессорных клеток из периферических клеток человека в условиях *in vitro* / К.Ю. Шардина, Л.С. Щербакова, В.П. Тимганова, М.С. Бочкова, С.А. Заморина, В.А. Черешнев // Фундаментальные и прикладные аспекты биоинформатики, биотехнологии и недропользования: сборник статей всероссийской научной конференции с международным участием. – Пермь, 2021. – С. 173-175.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Во время беременности эмбрион является наполовину чужеродным по отношению к материнскому организму, однако, при нормально развивающийся беременности отторжения плода не происходит. Плод с развитием гестации образует все больше чужеродных антигенов, так как помимо нарастания клеточной массы происходит дифференцировка клеток фетоплацентарного комплекса. В результате иммунная система материнского организма воспринимает увеличенную антигенную нагрузку, которая усугубляется взаимопроникновением клеток на уровне границы мать-плод. Клетки плода проникают в материнский кровоток, начиная с I-II триместров беременности [69]. При этом происходит мощная перестройка иммунитета, направленная на поддержание иммунологической толерантности к эмбриону, которая проявляется в отсутствии антигенспецифического иммунного ответа. Прежде всего, этот феномен связан с недоступностью антигенов, клеточной анергией, а также супрессией иммунного ответа [9].

Долгое время изучение клеточно-опосредованной иммуносупрессии было сведено исключительно к адаптивному звену иммунитета - регуляторным Т-лимфоцитам. Логично предположить, что регуляция иммунной системы была необходима еще до возникновения адаптивного звена, в эволюционно более древней - врожденной иммунной системе. На сегодняшний день, предполагается, что эта роль отведена иммуносупрессорной клеточной популяции – MDSC, увеличение которых происходит во время беременности, что подтверждает теорию о важности этих клеток в поддержании иммунной толерантности к эмбриону.

На сегодняшний день нет сведений о том, как MDSC взаимодействует с фетоплацентарными белками, которые также обладают иммуносупрессорным действием в процессе беременности. Важно понимать каким образом происходят клеточно-белковые взаимодействия, которые неизбежны в живом организме.

В нашем исследовании было важно не просто изучить взаимодействие фетоплацентарных белков с MDSC, но также оценить изменение экспрессии внутриклеточных ферментов, которые являются инструментами иммунного подавления MDSC — это аргиназа-1 и индоламин-2,3-диоксигеназа (ИДО). Аргиназа 1 – фермент, который метаболизирует аргинин. Недостаток аргинина в месте иммунного ответа приводит к угнетению пролиферации, экспрессии TCR-комплекса, а также подавлению развития Т-клеточной памяти [26; 118]. Именно этот механизм действия используют MDSC. Известно, что в миелоидных клетках истощаются запасы аргинина, в том числе и во внеклеточном пространстве [96; 142].

Другой механизм супрессии, опосредованный MDSC – экспрессия фермента ИДО, который катализирует триптофан. Известно, что ИДО образуется в макрофагах трофобласта во время беременности [109]. Плацентарный ИДО способен защищать плод путем подавления активности Т-лимфоцитов, которые проявляют свою активность в отношении аллоантигенов плода [100]. Механизм действия ИДО, прежде всего, связан с дефицитом триптофана в зоне контакта Т-лимфоцитов с клетками синцитиотрофобласта, однако, показано, что ИДО, экспрессируемый дендритными клетками и макрофагами децидуальной оболочки также используют этот механизм подавления. Помимо этого, действие на Т-лимфоциты происходит путем выделения побочных продуктов истощения триптофана – кинуренина, 3-гидроксикинуренина и 3-гидроксиантраниловой кислоты [52].

В нашем исследовании уровни экспрессии ИДО и Арг 1 были измерены только в схеме получения MDSC из CD11b⁺-клеток, поскольку стало очевидно, что MDSC, полученные из CD11b⁺-клеток более стабильны, многочисленны и жизнеспособны, чем MDSC, полученные из CD33⁺-клеток.

Альфа – фетопротейн. В результате наших исследований было показано, что АФП не оказывает влияния на расширение общего пула MDSC, выращенных ни из CD33⁺-, ни из CD11b⁺-клеток. Также АФП не оказывает эффектов на дифференцировку клеток в иммунофенотип субпопуляции PMN-MDSC. Однако

АФП в концентрациях 10 и 50 МЕ/мл достоверно способствует увеличению субпопуляции M-MDSC, полученных из CD11b⁺-клеток. Вероятно, АФП взаимодействует с другими клетками иммунной системы во время беременности, поддерживая иммунную толерантность. Известно, что АФП способен подавлять жизнеспособность и функциональность NK-клеток, ДК и моноцитов, а также косвенно способствовать дифференцировке CD4-лимфоцитов в фенотип регуляторных Т-клеток в исследованиях *in vitro* [8]. Предполагаемые механизмы иммуносупрессивного действия АФП делятся на две группы: осуществление АФП транспортировки различных веществ, подавляющих клеточную активность; супрессорные свойства самого белка, реализуемые через клеточный рецептор к АФП [110].

Известно, что концентрация АФП-10 МЕ/мл соответствует первому триместру беременности, а концентрация 50 МЕ/мл - второму. В этот период у эмбриона экспрессируются аллоантигены, являющиеся чужеродными для материнского организма [10]. Помимо этого, эмбрион экспрессирует стадийспецифические антигены, которые также чужеродны [169]. Именно поэтому первые два триместра являются определяющими в образовании нового иммунного баланса материнского организма, направленного на поддержание беременности. Вероятно, полученный нами эффект низких концентраций АФП на увеличение пула M-MDSC связан именно с этим фактом.

В эксперименте показано, что АФП не оказывает влияния на экспрессию аргиназы-1 в MDSC, однако мы обнаружили тенденцию увеличения уровня ИДО такими же концентрациями АФП (10 и 50 МЕ/ мл). Возможно, это увеличение происходило за счет повышения моноцитарной популяции MDSC, что подтверждает наличие прямой корреляционной связи между уровнем ИДО и M-MDSC ($r= 0,800$, $P<0,05$).

В схеме получения MDSC из CD11b⁺-клеток при добавлении в культуру АФП в концентрации 100 МЕ/ мл было продемонстрировано достоверное снижение продукции регуляторного цитокина IL-19.

Таким образом, АФП в концентрациях, соответствующих I-II триместру беременности, способен повышать уровень M-MDSC в культуре изолированных CD11b⁺-клеток, не влияя на общий пул MDSC и PMN-MDSC, а также снижать продукцию IL-19.

Гликоделин. В ходе эксперимента нами продемонстрировано, что гликоделин в концентрациях 0,2 и 2 МЕ/мл достоверно снижает общий пул MDSC, полученных из CD33⁺-клеток. В отношении MDSC, полученных из CD11b⁺-клеток достоверного эффекта не обнаружено. Однако наблюдается видимая тенденция к увеличению пула MDSC.

Показано, что гликоделин во всех использованных концентрациях (0,2; 2; 10 мкг/мл) достоверно увеличивает уровень субпопуляции M-MDSC (из CD33⁺-клеток). Также две концентрации гликоделина (2 и 10 мкг/мл) достоверно повышают пул M-MDSC в экспериментальной схеме получения клеток из CD11b⁺-клеток, что демонстрирует определенное влияние гликоделина на конверсию клеток в фенотип M-MDSC. В тоже время, показано, что гликоделин не влияет на уровень PMN-MDSC.

Интересно, что высокая концентрация гликоделина (10 мкг/мл) достоверно повышает экспрессию ИДО в клетках MDSC, при этом между этими параметрами существует прямая корреляционная связь ($r=0,800$, $P<0,05$). Стоит отметить, что и две другие концентрации также повышают экспрессию ИДО, однако достоверных различий найдено не было. В исследовании 2018 года, также был продемонстрирован схожий эффект гликоделина. Так, в эксперименте гликоделин усиливал экспрессию маркеров ИДО децидуальных макрофагов, а блокирование рецептора Siglec-7 на клетках нивелировало биологические эффекты ГД на дифференцировку моноцитов, что косвенно указывает на то, что рецептором к гликоделину может выступать Siglec-7 [171]. Интересно, что позже было проведено исследование, направленное на поиск лигандов сиаловой кислоты для Siglec на MDSC и в микроокружении опухоли глиомы [146]. Оказалось, что оба подмножества MDSC экспрессируют Siglec-3, -5, -7 и -9, с более высокими уровнями Siglec-3, -7 и -9 на M-MDSC и более высокими уровнями Siglec-5 на

PMN-MDSC. Аналогичные профили экспрессии Siglec были обнаружены на MDSC от здоровых доноров. Эти исследования дают основание предположить, что взаимодействие гликоделина и MDSC происходит как раз за счет рецептора Siglec-7, который в большей степени экспрессируется именно на M-MDSC.

Учитывая, что ГД достоверно повышает уровень M-MDSC и ИДО, довольно парадоксальным выглядит его влияние на уменьшение пула популяции MDSC (из CD33⁺-клеток). Возможно, это связано с разным уровнем экспрессии предполагаемых рецепторов для ГД на этих клетках.

В схеме получения MDSC из CD11b⁺-клеток обнаружено, что ГД в концентрациях 2 и 10 мкг/мл способен достоверно подавлять продукцию таких провоспалительных цитокинов, как IFN- α 2, IL-26, TWEAK, а также противовоспалительного IL-19. При этом обнаружена прямая корреляционная связь между экспрессией ИДО и продукцией IL-26 ($r=0,800$, $P<0,05$), но обратная между уровнем ИДО и продукцией IFN- α 2 ($r=-0,800$, $P<0,05$) под воздействием ГД 10 мкг/мл. На данный момент нет известных взаимосвязей между экспрессией ИДО и IL-26, однако IFN I типа может индуцировать экспрессию ИДО в клетках [52]. В нашем эксперименте ГД 10 мкг/мл повышал уровень ИДО, одновременно снижая продукцию IFN- α 2 клетками, что позволяет предположить, что индукция ИДО не связана с аутогенной продукцией IFN- α 2.

В целом, тенденция снижения ряда провоспалительных цитокинов может укладываться в концепцию иммунорегуляторных свойств гликоделина, направленных на поддержание иммунной толерантности.

Таким образом, гликоделин увеличивает количество M-MDSC, полученных как из CD33⁺-клеток, так и из CD11b⁺-клеток, не оказывая влияния на PMN-MDSC. Важно отметить, что высокая концентрация гликоделина повышала уровень ИДО в M-MDSC, способствуя увеличению функциональной активности этих клеток.

Хорионический гонадотропин человека. Нами установлено, что ХГЧ не влияет на конверсию клеток в фенотип MDSC (из CD33⁺-клеток), но обе концентрации достоверно повышают уровень MDSC в другой экспериментальной схеме (из CD11b⁺-клеток).

Помимо этого, также обе концентрации ХГЧ достоверно увеличивают пул М-MDSC (из CD33⁺-клеток), однако, стоит отметить, что ХГЧ с концентрацией 10 МЕ/ мл оказывает более сильное влияние на уровень М-MDSC, чем его высокая концентрация. В схеме эксперимента получения MDSC из CD11b⁺-клеток только низкая концентрация ХГЧ (10 МЕ/ мл) достоверно повышает уровень этой субпопуляции. Такой эффект можно объяснить тем, что концентрация 10 МЕ/мл соответствует началу беременности, в момент, когда выстраивание иммунной толерантности особенно важно, поскольку без этого невозможно дальнейшее сохранение плода.

Показано, что ХГЧ не влияет на экспрессию Арг 1 и ИДО в MDSC, однако наблюдается тенденция влияния ХГЧ в концентрации 10 МЕ/ мл на экспрессию ИДО. Интересно, что влияния ХГЧ на продукцию цитокинов иммунными клетками обнаружено не было. Вероятно, это связано с тем, что ХГЧ проявляет иммуномодулирующие свойства по-другому.

Имуномодулирующие эффекты ХГЧ на уровне других субпопуляций иммунной системы довольно хорошо изучены. Так, известно, что ХГЧ повышает уровень Treg [184, 152], осуществляющий супрессию иммунного ответа в период беременности. Наша рабочая гипотеза, состоящая в том, что ХГЧ будет стимулировать также и генерацию MDSC подтвердилась. Важно отметить, что эффект ХГЧ также касается именно моноцитарных, но не гранулоцитарных MDSC, как и в отношении, других изучаемых нами белков. По-видимому, именно М-MDSC являются мишенью для изучаемых белков, в то время как PMN-MDSC резистентны к их действию.

Таким образом, ХГЧ не влияет на уровень общего пула MDSC (из CD33⁺-клеток), но повышает уровень MDSC, полученных из CD11b⁺-клеток. Однако, при анализе влияния ХГЧ на субпопуляции MDSC показано, что ХГЧ повышает уровень М-MDSC, генерированных как из CD33⁺-, так и CD11b⁺-клеток, не влияя на уровень PMN-MDSC.

Аргиназа-1. В наших экспериментах не было обнаружено эффектов на уровень внутриклеточной экспрессии Арг 1. Стоит отметить, что этот результат не был ожидаемым, поскольку считается, что экспрессия Арг 1 в MDSC сопряжена с реализацией их супрессорных функций. Возможно, для того, чтобы началась экспрессия аргиназы-1, использованных сигнальных молекул в нашем эксперименте было недостаточно. Действительно, есть данные о том, что Арг 1 в миелоидных клетках индуцируется противовоспалительными цитокинами Т-хелперов 2 типа, такими, как, IL-10, TGF- β , простагландины (PGE) и катехоламины, IL-4 и IL-13 [17; 18, 39]. В связи с чем можно сделать предположение, что использованные нами цитокины, а именно IL-6, GM-CSF, IL-1 β , а также ЛПС не стимулируют экспрессию аргиназы-1 в MDSC.

PMN-MDSC. Также интересно, что дифференцировка клеток в субпопуляцию PMN-MDSC в нашем исследовании не происходила. Таким образом, можно предположить, что выбранные нами цитокины и фетоплацентарные белки не стимулируют MDSC к экспрессии маркера CD66b. С другой стороны, экспрессия маркера CD14, присущая субпопуляции M-MDSC происходила. Это может объясняться тем, что в качестве сигнальной молекулы нами был использован ЛПС, взаимодействующий с поверхностным антигеном, который является корцептором для TLR2 и TLR6 – CD14 [177, 75]. Вероятно, именно воздействие ЛПС на клеточную культуру поспособствовало экспрессии CD14.

Таким образом, мы впервые показали, что альфа-фетопроtein, гликоделин и хорионический гонадотропин человека способны проявлять иммуномодулирующие эффекты в отношении миелоидных супрессорных клеток, что в целом говорит об их способности к поддержанию иммунологической толерантности во время беременности. Полученные результаты исследования будут отражены в таблице 5.

Таблица 5 – Суммарные эффекты АФП, ГД и ХГЧ на дифференцировку MDSC, а также на экспрессию аргиназы-1 и индоламин-2,3-диоксигеназы

Белки	АФП		ГД		ХГЧ	
признаки	CD33	CD11b	CD33	CD11b	CD33	CD11b
MDSC	Нет влияния	Нет влияния	Уменьшение (ГД 0,2 и 2)	Нет влияния	Нет влияния	Увеличение (ХГЧ 10 и 100 МЕ/мл)
M-MDSC	Нет влияния	Увеличение (АФП 10, 50 МЕ/мл)	Увеличение (ГД 0,2, 2 и 10 мкг/мл)	Увеличение (ГД 2 и 10 мкг/мл)	Увеличение (ХГЧ 10 и 100 МЕ/мл)	Увеличение (ХГЧ 10 и 100 МЕ/мл)
PMN-MDSC	Нет влияния	Нет влияния	Нет влияния	Нет влияния	Нет влияния	Нет влияния
Arg1	-	Нет влияния	-	Нет влияния	-	Нет влияния
IDO	-	АФП 10 и 50 МЕ/мл Тенденция к увеличению (недостоверное)	-	Увеличение (ГД 10 мкг/мл)	-	Нет влияния
Цитокины	Нет влияния	Уменьшение IL-19 (АФП 100 МЕ/мл)	Увеличение IL-20 (ГД 2 и 10 мкг/мл)	Уменьшение: IFN-α2 (ГД 10) IL-26 (ГД 2 и 10) IL-19 (ГД 2) TWEAK (ГД 2)	Нет влияния	Нет Влияния

Перспективы дальнейшей разработки темы. Благодаря проведенным исследованиям выяснено, что белки беременности – альфа-фетопротеин, гликоделин и хорионический гонадотропин способны воздействовать на увеличение популяции MDSC, а также на субпопуляцию M-MDSC, усиливая экспрессию ИДО этими клетками, и влиять на продукцию некоторых цитокинов. В дальнейшем перспективным представляется изучение других механизмов подавления MDSC, а именно экспрессии молекул CD40, PDL-1, CD73, LOX-1, активных форм кислорода и азота и индуцибельной NO-синтазы. Планируется установить связь с угнетением пролиферации и активности Т-лимфоцитов и механизмов, благодаря которым осуществляется эта супрессия в большей степени. Также планируется оценить влияние фетоплацентарных белков на функциональную активность клеток и выявить рецепторы, благодаря которым изучаемые белки беременности взаимодействуют с MDSC.

ВЫВОДЫ

1) Оптимальный протокол генерации миелоидных супрессорных клеток в условиях *in vitro* методом направленной цитокиновой индукции сепарированных CD33⁺-клеток периферической крови человека с использованием IL-6 (10 нг/мл) и GM-CSF (10 нг/мл) включает в себя следующие параметры: время культивирования - 7 суток при стандартных условиях (5% CO₂ и 37°C), необходимость замены питательной среды на 4-е сутки инкубации.

2) Оптимальный протокол генерации миелоидных супрессорных клеток в условиях *in vitro* методом направленной цитокиновой индукции сепарированных CD11b⁺-клеток периферической крови человека заключается в добавлении GM-CSF (20 нг/мл) на первом этапе (2 суток), и внесением IL-1β (20 нг/мл) и липополисахарида (0,1 мкг/мл) на втором этапе (7 суток), культивирование осуществляется при стандартных условиях (5% CO₂ и 37°C) с заменой среды после первого этапа культивирования.

3) Альфа-фетопроtein не модулирует дифференцировку CD33⁺-клеток в фенотип миелоидных супрессорных клеток; гликоделин в концентрациях 0,2 и 2 мкг/мл подавляет генерацию общего пула миелоидных супрессорных клеток, не влияет на уровень полиморфноядерных миелоидных супрессорных клеток, но стимулирует генерацию моноцитарных миелоидных супрессорных клеток; хорионический гонадотропин не модулирует дифференцировку общей популяции миелоидных супрессорных клеток, но стимулирует генерацию моноцитарной субпопуляции миелоидных супрессорных клеток.

4) Альфа-фетопроtein не модулирует генерацию общего и полиморфноядерного пула миелоидных супрессорных клеток в культуре CD11b⁺-клеток, но стимулирует дифференцировку моноцитарных миелоидных супрессорных клеток в концентрациях 10 и 50 МЕ/мл; гликоделин не модулировал дифференцировку CD11b⁺-клеток в фенотип общего пула миелоидных

супрессорных клеток и полиморфноядерной субпопуляции, однако, не стимулирует дифференцировку моноцитарных миелоидных супрессорных клеток в концентрациях 2 и 10 мкг/мл; хорионический гонадотропин человека стимулирует дифференцировку миелоидных супрессорных клеток и моноцитарную субпопуляцию этого типа клеток, сгенерированных из CD11b⁺-клеток, не влияя на генерацию полиморфноядерных миелоидных супрессорных клеток.

5) Гликоделин усиливает внутриклеточную продукцию индоламин-2,3-диоксигеназы в миелоидных супрессорных клетках в концентрации 10 мкг/мл; оба разработанных протокола не являются показательными для исследования влияния фетоплацентарных белков на продукцию аргиназы-1 в миелоидных супрессорных клетках.

6) Гликоделин (2 и 10 мкг/ мл) повышает уровень IL-20 в культуре CD 33⁺- клеток; альфа-фетопротеин (100 ME/ мл) снижает продукцию IL-19, гликоделин (2 мкг/мл) подавляет продукцию IL-26, IL-19 и TWEAK, а в концентрации 10 мкг/мл подавляет продукцию IFN- α 2 и IL-26 в культуре CD11b⁺-клеток.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Для индукции популяции миелоидных супрессорных клеток в системе *in vitro* отдавать предпочтение стратегии дифференцировки CD11b⁺-клеток периферической крови.

Оптимальными концентрациями в условиях двухэтапного добавления цитокинов являются 20 нг/мл для IL-1 β и GM-CSF, а также 0,1 мкг/ мл для липополисахарида - на каждые 200 тыс. клеток.

В модели индукции миелоидных супрессорных клеток из CD33⁺-клеток оптимально использовать по 10 нг/мл каждого из цитокинов (IL-6 и GM-CSF) на каждые 200 тыс. клеток.

При использовании любой из разработанных экспериментальных схем культивирование клеток длится в течение 7 суток, а смена культуральной среды должна быть произведена на четвертые сутки инкубирования.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

АФП – альфа-фетопротеин

БСА – бычий сывороточный альбумин

ГД – гликоделин

ДК – дендритные клетки

ИДО – индоламин-2,3-диоксигеназа

ЛГ – лютеинизирующий гормон

ЛПНП- липопротеины низкой плотности

ЛПС – липополисахарид

мАТ- моноклональные антитела

МЛР – смешанная лейкоцитарная реакция

МПК – мононуклеарные клетки периферической крови

ПГЕ2 – простагландин Е2

ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты

РА- ревматоидный артрит

СКВ – системная красная волчанка

ТТГ – тиреотропный гормон

ФСГ – фолликулстимулирующий гормон

ХГЧ – хорионический гонадотропин человека

ADAM-17 – мембранный фермент металлопротеаза

АРС- allophycocyanin (аллофикоцианин)

Arg 1 – аргиназа 1

CCL 20- Chemokine (C-C motif) ligand 20 (хемокиновый лиганд 20)

CD — cluster of differentiation (мембранные маркеры клеток)

DAMP – damage associated molecular patterns (дистресс - ассоциированные молекулярные паттерны)

DPBS - Dulbecco's phosphate-buffered saline (фосфатно-солевой буфер Дульбекко)

FMO - fluorescence minus one (контроль флуоресценции минус один)

- FSC– forward scatter (прямое светорассеяние)
- Gal-9 – galectin-9 (галектин-9)
- GdA- гликоделин амниотической жидкости
- GdC- гликоделин многослойного эпителия и яйценосного холмика
- GdF- гликоделин фолликулов яичников
- GdS – гликоделин семенной плазмы
- GM-CSF – granulocyte-macrophage colony stimulating factor (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор)
- HLA-DR – human leukocyte antigens (рецептор клеточной поверхности МНС класса II)
- IFN- interferon (интерферон)
- IL – interleukin (интерлейкин)
- iNOS – inducible nitric oxide synthase (индуцибельная NO-синтаза)
- ITIM – Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (иммунорецепторный ингибиторный мотив на основе тирозина)
- Lin – anti-human lineage cocktail (CD3, CD19, CD56)
- LOX-1 - Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (рецептор окисленных липопротеинов низкой плотности)
- MDSC – myeloid-derived suppressor cells (миелоидные супрессорные клетки)
- M-MDSC – monocytic myeloid-derived suppressor cells (моноцитарные миелоидные супрессорные клетки)
- MMP- matrix metalloproteinase (матриксная металлопротеиназа)
- MPP - multipotent progenitors (мультипотентные предшественники)
- NADPH–оксидаза –nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (клеточный мембрано-связанный мультимолекулярный ферментный комплекс)
- NF-κB - nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (транскрипционный ядерный фактор κB)
- НК-клетки– natural killer (естественные клетки - киллеры)

PAMP – pathogen-associated molecular patterns (патоген-ассоциированные молекулярные паттерны)

PDL-1 – programmed death-ligand 1 (лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1)

PE- phycoerythrin (фикоэритрин)

PerCP- peridinin chlorophyll protein-Cyanine5.5 (перидининхлорофилл протеин)

PMN-MDSC – polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells (полиморфноядерные миелоидные супрессорные клетки)

SA-PE – streptavidin – phycoerythrin (комплекс стрептавидин-фикоэритрин)

SSC– side scatter (боковое светорассеяние)

TCR– T-cell receptor (Т-клеточный рецептор)

TGF- Transforming growth factor (трансформирующий фактор роста)

Th – T-helper (Т-хелпер)

TIM-3 – T-cell immunoglobulin and mucin domain 3 (Т-клеточный иммуноглобулин и белок, содержащий домен муцина 3)

TLR– toll-like receptor (толл-подобный рецептор)

TNF - tumor necrosis factor (фактор некроза опухоли)

Treg - regulatory T cells (регуляторные Т-лимфоциты)

TWEAK – tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TNF-подобный слабый индуктор апоптоза)

ZA – zombie aqua (суправитальный краситель зомби аква)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лазаревич, Н.Л. Молекулярные механизмы регуляции экспрессии гена альфа-фетопротейна / Н.Л. Лазаревич // Биохимия. – 2000. – Т. 65, № 1. – С. 37–39.
2. Молдогазиева, Н. Альфа-фетопротейн – новые подходы к изучению структуры и функций / Н. Молодгазиева, А.Терентьев // Успехи современного естествознания. – 2006. – N 5. – С. 87-89.
3. Петрунин, Д. Д. Иммунохимическая идентификация органоспецифического а2-глобулина плаценты человека и его содержание в амниотической жидкости / Д. Д. Петрунин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1976. – № 7. – С. 803–804.
4. Пономарев, А. В. Миелоидные супрессорные клетки: общая характеристика / А. В. Пономарев // Иммунология. – 2016. – Т. 37, № 1. – С. 47–50. – DOI: 10.18821/0206-4952-2016-37-1-47–50
5. Татаринов Ю.С. Специфический альфа2-микροглобулин (гликоделин) репродуктивной системы человека: 20 лет от фундаментальных исследований до внедрения в клиническую практику. /Ю.С. Татаринов, Л. В. Посисеева, Д.Д. Петрунин. – М.: МИК, 1998. – 127 с.
6. Харченко, Е. П. толерантность матери и плода как проявление регуляторного континуума и пластичности их иммунных систем / Е. П. Харченко // Медицинская иммунология. – 2011. – Т. 13, № 2-3. – С. 121–132.
7. Шардина К.Ю., Тимганова В.П., Бочкова М.С., Храмцов П.В., Раев М.Б., Заморина С.А. Роль рекомбинантного гликоделина в дифференцировке регуляторных Т-лимфоцитов // Доклады Академии Наук. - 2022. – Т.506, № 1. – DOI: С.417-421. – DOI: 10.31857/S2686738922050262
8. Шардина, К.Ю. Применение альфа-фетопротейна в иммунофармакологии – история вопроса / К.Ю. Шардина, С.А. Заморина, М.Б.

Раев [и др.] // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. - 2020. - N 2. - С. 145-153.

9. Ширшев, С.В. Иммунология материнско-фетальных взаимодействий / С.В. Ширшев // УрО РАН. - Екатеринбург. - 2009. - С. 582.

10. Ширшев, С.В. Механизмы иммунного контроля процессов репродукции / Екатеринбург: УрО РАН. -1999.-381 С.

11. Шмагель К.В. Иммуитет беременной женщины. Изд-во НГМА. – Н. Новгород, 2003. – 226 с.

12. Abu Alshamat, E. Human chorionic gonadotrophin (hCG) enhances immunity against *L. tropica* by stimulating human macrophage functions: hCG enhances macrophage functions against *L. tropica* / E. Abu Alshamat, S. Al-Okla, C. H. Soukkaieh [et al.] // *Parasite Immunology*. – 2012. – Vol. 34, N 10. – P. 449–454. – DOI: 10.1111/j.1365-3024.2012. 01368.x

13. Acevedo, H. F. Human chorionic gonadotropin (hCG), the hormone of life and death: a review / H. F. Acevedo // *Journal of Experimental Therapeutics & Oncology*. – 2002. – Vol. 2, N 3. – P. 133–145. – DOI: 10.1046/j.1359-4117.2002. 01031.x

14. Al-Alem, L. Chemokine Ligand 20: A Signal for Leukocyte Recruitment During Human Ovulation? / L. Al-Alem, M. Puttabyatappa, K. Rosewell [et al.] // *Endocrinology*. – 2015. – Vol. 156, N 9. – P. 3358–3369. – DOI: 10.1210/en.2014-1874

15. Andrews, R. G. Myeloid-associated differentiation antigens on stem cells and their progeny identified by monoclonal antibodies / R. G. Andrews, B. Torok-Storb, I. D. Bernstein // *Blood*. – 1983. – Vol. 62, N 1. – P. 124–132.

16. Bansal, V. Arginine availability, arginase, and the immune response / V. Bansal, J.B. Ochoa // *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. – 2003. – Vol. 6. – P.223–228.

17. Bansal, V. Interactions between fatty acids and arginine metabolism: implications for the design of immune-enhancing diets / V. Bansal, K.M. Syres, V. Makarenkova [et al.] // *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. – 2005. – Vol.29, N 1. – P.75-80. –DOI:10.1177/01486071050290S1S75

18. Barksdale, A. R. Regulation of arginase expression by T-helper II cytokines and isoproterenol. / A. R. Barksdale, A. C. Bernard, M. E. Maley [et al.] // *Surgery*. – 2004. - Vol.135. – P. 527–535.
19. Bartmann, C. CD33⁺/HLA-DR^{neg} and CD33⁺/HLA-DR^{+/-} Cells: Rare Populations in the Human Decidua with Characteristics of MDSC / C. Bartmann, M. Junker, S. E. Seegerer [et al.] // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 2016. – Vol. 75, N 5. – P. 539–556. – DOI: 10.1111/aji.12492
20. Berndt, S. Chorionic Gonadotropin Stimulation of Angiogenesis and Pericyte Recruitment / S. Berndt, S. Blacher, S. Perrier d'Hauterive [et al.] // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2009. – Vol. 94, N 11. – P. 4567–4574. – DOI: 10.1210/jc.2009-0443
21. Blohm, M.E. Alpha 1-fetoprotein (AFP) reference values in infants up to 2 years of age / M. E. Blohm, D. Vesterling-Hörner, G. Calaminus [et al.] // *Pediatric Hematology and Oncology*. – 1998. – Vol. 15, N 2. – P. 135–142. – DOI: 10.3109/08880019809167228
22. Bock, J. E. Alpha-fetoprotein in amniotic fluid and serum from pregnant women with severe rhesus isoimmunization / J. E. Bock, B. Norgaard-Pedersen, D. Trolle // *Acta Obstetricia Et Gynecologica Scandinavica. Supplement*. – 1976. – Vol. 53. – P. 7–13. – DOI: 10.3109/00016347609156439
23. Bolton, A. E. Identification of placental protein 14 as an immunosuppressive factor in human reproduction / A. E. Bolton, A. G. Pockley, K. J. Clough, [et al.] // *Lancet (London, England)*. – 1987. – Vol. 1, N 8533. – P. 593–595. – DOI: 10.1016/s0140-6736(87)90235-2
24. Bonduelle, M. Chorionic gonadotrophin-β mRNA, a trophoblast marker, is expressed in human 8-cell embryos derived from tripronucleate zygotes / M. Bonduelle, R. Dodd, I. Lieber's, [et al.] // *Human Reproduction*. – 1988. – T. 3, № 7. – C. 909–914. – DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a136808
25. Brandau, S. The kinship of neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells in cancer: cousins, siblings or twins? / S. Brandau, K. Moses, S. Lang //

Seminars in Cancer Biology. – 2013. – Vol. 23, N 3. – P. 171–182. – DOI: 10.1016/j.semcancer.2013.02.007

26. Bronte, V. L-Arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. / V. Bronte, P. Serafini, A. Mazzoni [et al.] // Trends Immunol. – 2003. – Vol. 24. – P. 302–306.

27. Bronte, V. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards / V. Bronte, S. Brandau, S. Chen [et al.] // Nature Communications. – 2016. – Vol. 7. – P. 12150. – DOI: 10.1038/ncomms12150

28. Budhwar, S. The Yin and Yang of Myeloid Derived Suppressor Cells / S. Budhwar, P. Verma, R. Verma [et al.] // Frontiers in Immunology. – 2018. – Vol. 9. – P. 2776. – DOI: 10.3389/fimmu.2018.02776

29. Chen, V. Reactive Oxygen Species Regulate T Cell Immune Response in the Tumor Microenvironment / X. Chen, M. Song, B. Zhang [et al.] // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2016. – Vol. 2016. – P. 1–10. – DOI: 10.1155/2016/1580967

30. Chiu, P. C. N. Glycodelin-A interacts with fucosyltransferase on human sperm plasma membrane to inhibit spermatozoa-zona pellucida binding / P. C. N. Chiu, M. Chung, R. Koistinen [et al.] // Journal of Cell Science. – 2007. – Vol. 120, N 1. – P. 33–44. – DOI: 10.1242/jcs.03258

31. Cohen, B.L. Suppression by alpha-fetoprotein of murine natural killer cell activity stimulated in vitro and in vivo by interferon and interleukin 2 / B. L. Cohen, A. Orn, K. O. Gronvik of Perin // Scandinavian Journal of Immunology. – 1986. – Vol. 23, N 2. – P. 211–223. – DOI: 10.1111/j.1365-3083.1986.tb01960.x

32. Cohen-Fredarow, A. Ovarian Dendritic Cells Act as a Double-Edged Pro-Ovulatory and Anti-Inflammatory Sword / A. Cohen-Fredarow, A. Tadmor, T. Raz, [et al.] // Molecular Endocrinology. – 2014. – Vol. 28, N 7. – P. 1039–1054. – DOI: 10.1210/me.2013-1400

33. Cole, L. A. hCG, five independent molecules / L. A. Cole // Clinical Chemical Acta. – 2012. – Vol. 413, N 1-2. – P. 48–65. – DOI: 10.1016/j.cca.2011.09.037

34. Cole, L. A. hCG, the wonder of today's science / L. A. Cole // *Reproductive Biology and Endocrinology*. – 2012. – Vol. 10, N 1. – P. 24. – DOI: 10.1186/1477-7827-10-24
35. Cole, L. A. Hyperglycosylated hCG, a review / L. A. Cole // *Placenta*. – 2010. – Vol. 31, N 8. – P. 653–664. – DOI: 10.1016/j.placenta.2010.06.005
36. Cole, L. A. Production of human chorionic gonadotropin during the normal menstrual cycle / L. A. Cole, J. M. Gutierrez // *The Journal of Reproductive Medicine*. – 2009. – Vol. 54, N 4. – P. 245–250.
37. Condamine, T. Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients / T. Condamine, G. A. Dominguez, J. Young [et al.] // *Science Immunology*. – 2016. – Vol. 1, N 2. – P. aaf8943. – DOI: 10.1126/sciimmunol.aaf8943
38. Condamine, T. Transcriptional regulation of myeloid-derived suppressor cells / T. Condamine, J. Mastio, D. Gabrilovich // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2015. – Vol. 98, N 6. – P. 913-922.
39. Cook, P.C. Alternatively activated dendritic cells regulate CD4+ T-cell polarization in vitro and in vivo / P.C. Cook, L. H. Jones, S. J. Jenkins [et al.] // *PNAS*. – 2012. – Vol. 109. – P. 9977-9982.
40. Corzo, C.A. Mechanism Regulating Reactive Oxygen Species in Tumor-Induced Myeloid-Derived Suppressor Cells / C. A. Corzo, M. J. Cotter, P. Cheng [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2009. – Vol. 182, N 9. – P. 5693–5701. – DOI: 10.4049/jimmunol.0900092
41. Crocker, P. R. Siglecs: sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in cell-cell interactions and signaling / P. R. Crocker // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2002. – N 12. – P. 609-615.
42. Debruyne, E. N. Diagnosing and monitoring hepatocellular carcinoma with alpha-fetoprotein: new aspects and applications / E. N. Debruyne, J. R. Delanghe // *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. – 2008. – Vol. 395, N 1-2. – P. 19–26. – DOI: 10.1016/j.cca.2008.05.010

43. De Cicco, P. Nutrition and Breast Cancer: A Literature Review on Prevention, Treatment and Recurrence / P. De Cicco, M.V. Catani, V. Gasperi [et al.] // *Nutrients*. – 2019. – Vol. 11, N 7. – P. 1-28. – DOI:10.3390/nu11071514
44. Deutsch, H. F. Chemistry and biology of alpha-fetoprotein / H. F. Deutsch // *Advances in Cancer Research*. – 1991. – Vol. 56. – P. 253–312. – DOI: 10.1016/s0065-230x (08)60483-2
45. Dorhoi, A. Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells in Chronic Infections / A. Dorhoi, N. Du Plessis // *Frontiers in Immunology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 1895. – DOI: 10.3389/fimmu.2017.01895
46. Draghiciu, O. Myeloid derived suppressor cells-An overview of combat strategies to increase immunotherapy efficacy / O. Draghiciu, J. Lubbers, H.W. Nijman [et al.] // *Oncoimmunology*. – 2015. – Vol. 4, N 1. – P.1 – 10. doi:10.4161/21624011.2014.954829
47. Dugast, A. Myeloid-Derived Suppressor Cells Accumulate in Kidney Allograft Tolerance and Specifically Suppress Effector T Cell Expansion / A. Dugast, T. Haudebourg, F. Coulon [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2008. – Vol. 180, N 12. – P. 7898–7906. – DOI: 10.4049/jimmunol.180.12.7898
48. Dumitru, C. A. Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology / C. A. Dumitru, K. Moses, S. Trellakis, S. Lang, S. Brandau // *Cancer immunology, immunotherapy: CII*. – 2012. – Vol. 61, N 8. – P. 1155–1167. – DOI: 10.1007/s00262-012-1294-5
49. Duwe, A. K. The immunoregulatory role of bone marrow / A. K. Duwe, S. K. Singhal // *Cellular Immunology*. – 1979. – Vol. 43, N 2. – P. 372–381. – DOI: 10.1016/0008-8749(79)90181-3
50. Erlebacher, A. Immunology of the maternal-fetal interface / A. Erlebacher // *Annual Review of Immunology*. – 2013. – Vol. 31. – P. 387–411. – DOI: 10.1146/annurev-immunol-032712-100003
51. Estruch, M. CD14 and TLR4 mediate cytokine release promoted by electronegative LDL in monocytes / M. Estruch, C. Bancells, L. Beloki [et al.] //

Atherosclerosis. – 2013. – Vol. 229, N 2. – P. 356–362. – DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.05.011

52. Fallarino, F. T cell apoptosis by tryptophan catabolism / F. Fallarino, U. Grohmann, C. Vacca [et al.] // *Cell Death and Differentiation*. – 2002. – Vol. 9, N 10. – P. 1069–1077. – DOI: 10.1038/sj.cdd.4401073

53. Fettke, F. Maternal and Fetal Mechanisms of B Cell Regulation during Pregnancy: Human Chorionic Gonadotropin Stimulates B Cells to Produce IL-10 While Alpha-Fetoprotein Drives Them into Apoptosis / F. Fettke, A. Schumacher, A. Canellada [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 495. – DOI: 10.3389/fimmu.2016.00495

54. Fletcher, M. L -Arginine Depletion Blunts Antitumor T-cell Responses by Inducing Myeloid-Derived Suppressor Cells / M. Fletcher, M. E. Ramirez, R. A. Sierra [et al.] // *Cancer Research*. – 2015. – Vol. 75, N 2. – P. 275–283. – DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1491

55. Fortin, C. NK Cell Response to Vaccinia Virus Is Regulated by Myeloid-Derived Suppressor Cells / C. Fortin, X. Huang, Y. Yang // *The Journal of Immunology*. – 2012. – Vol. 189, N 4. – P. 1843–1849. – DOI: 10.4049/jimmunol.1200584

56. Furcron, A. Human Chorionic Gonadotropin Has Anti-Inflammatory Effects at the Maternal-Fetal Interface and Prevents Endotoxin-Induced Preterm Birth, but Causes Dystocia and Fetal Compromise in Mice¹ / A. Furcron, R. Romero, T. N. Mial [et al.] // *Biology of Reproduction*. – 2016. – Vol. 94, N 6. – P. 1-13. – DOI: 10.1095/biolreprod.116.139345.

57. Gabrilovich, D. I. Myeloid-Derived Suppressor Cells / D. I. Gabrilovich // *Cancer Immunology Research*. – 2017. – Vol. 5, N 1. – P. 3–8. – DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0297

58. Gabrilovich, D. I. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells / D. I. Gabrilovich, V. Bronte, S. Chen [et al.] // *Cancer Research*. – 2007. – Vol. 67, N 1. – P. 425 – 426. – DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3037

59. Gantt, S. The role of myeloid-derived suppressor cells in immune ontogeny / S. Gantt, A. Gervassi, H. Jaspan [et al.] // *Frontiers in immunology*. – 2014. – Vol. 5, N 387. P. 1- 6. – DOI: 10.3389/fimmu.2014.00387
60. Gaynor, L. M. Uterine Natural Killer Cells: Functional Distinctions and Influence on Pregnancy in Humans and Mice / L. M. Gaynor, F. Colucci // *Frontiers in Immunology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 467. – DOI: 10.3389/fimmu.2017.00467
61. Giaglis, S. Neutrophil migration into the placenta: Good, bad or deadly? / S. Giaglis, M. Stoikou, F. Grimolizzi [et al.] // *Cell Adhesion & Migration*. – 2016. – Vol. 10, N 1-2. – P. 208–225. – DOI: 10.1080/19336918.2016.1148866
62. Goeddel, D. Human leukocyte interferon produced by *E. coli* is biologically active / D. Goeddel, E. Yelverton, A. Ullrich [et al.] // *Nature*. – 1980. – Vol. 287, N 5781. – P. 411-416. – DOI: 10.1038/287411a0.
63. Goldsmith, P. C. Cellular Localization of Chorionic Gonadotropin in Human Fetal Kidney and Liver* / P. C. Goldsmith, W. G. Mcgregor, W. J. Raymoure [et al.] // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 1983. – Vol. 57, N 3. – P. 654–661. – DOI: 10.1210/jcem-57-3-654
64. Gough, P. IL-20 Signaling in Activated Human Neutrophils Inhibits Neutrophil Migration and Function / P. Gough S. Ganesan, S. Datta // *Immunology*. – 2017. – Vol. 198, N 11. – P. 4373-4382. – DOI: 10.4049/jimmunol.1700253.
65. Green, K. A. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Murine Retrovirus-Induced AIDS Inhibit T- and B-Cell Responses *In Vitro* That Are Used To Define the Immunodeficiency / K. A. Green, W. J. Cook, W. R. Green // *Journal of Virology*. – 2013. – Vol. 87, N 4. – P. 2058–2071. – DOI: 10.1128/JVI.01547-12
66. Hahn, S. Neutrophil NETs in reproduction: from infertility to preeclampsia and the possibility of fetal loss / S. Hahn, S. Giaglis, I. Hoesli [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2012. – Vol. 3. – DOI: 10.3389/fimmu.2012.00362.
67. Hanson, E. M. Myeloid-Derived Suppressor Cells Down-Regulate L-Selectin Expression on CD4⁺ and CD8⁺ T Cells / E. M. Hanson, V. K. Clements, P. Sinha [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2009. – Vol. 183, N 2. – P. 937–944. – DOI: 10.4049/jimmunol.0804253

68. Haziot, A. Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice / A. Haziot, E. Ferrero, F. Köntgen [et al.] // *Immunity*. – 1996. – Vol. 4, N 4. – P. 407–414. – DOI: 10.1016/s1074-7613(00)80254-x
69. Heyborne, K. Recognition of trophoblasts by $\gamma\delta$ T cells / K. Heyborne, Fu Y-X., A. Nelson // *J.Immunol.* –1992. –Vol.149. –P.2877-2880.
70. Huang , B. Gr-1+CD115+ Immature Myeloid Suppressor Cells Mediate the Development of Tumor-Induced T Regulatory Cells and T-Cell Anergy in Tumor-Bearing Host / B. Huang, P. Pan, Q. Li [et al.] // *Cancer Research*. – 2006. – Vol. 66, N 2. – P. 1123–1131. – DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1299
71. Hunt, J.S. Expression of the inducible nitric oxide synthase gene in mouse uterine leukocytes and potential relationships with uterine function during pregnancy / J. S. Hunt, L. Miller, D. Vassmer [et al.] // *Biology of Reproduction*. – 1997. – Vol. 57, N 4. – P. 827–836. – DOI: 10.1095/biolreprod57.4.827
72. Jeschke, U. Stimulation of hCG protein and mRNA in first trimester villous cytotrophoblast cells in vitro by glycodelin A / U. Jeschke, U. Karsten, T. Reimer [et al.] // *Journal of Perinatal Medicine*. – 2005. – Vol. 33, N 3. – P. 212-218. – DOI: 10.1515/JPM.2005.039.
73. Julkunen, M. Distribution of placental protein 14 in tissues and body fluids during pregnancy / M. Julkunen, E. M. Rutanen, A. Koskimies [et al.] // *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. – 1985. – Vol. 92, N 11. – P. 1145–1151. – DOI: 10.1111/j.1471-0528.1985.tb03027.x
74. Kane, N. Proliferation of Uterine Natural Killer Cells Is Induced by Human Chorionic Gonadotropin and Mediated via the Mannose Receptor / N. Kane, R. Kelly, P. T. K. Saunders [et al.] // *Endocrinology*. – 2009. – Vol. 150, N 6. – P. 2882–2888. – DOI: 10.1210/en.2008-1309
75. Kelley, S.L. The crystal structure of human soluble CD14 reveals a bent solenoid with a hydrophobic amino-terminal pocket. S.L. Kelley, T. Lukk, S.K. Nair [et al.] // *J Immunol*. – 2013.- Vol. 190, N 3. – P.1304-1311.

76. Kerr, M. A. The role of CD15-(Le(X))-related carbohydrates in neutrophil adhesion / M. A. Kerr, S. C. Stocks // *The Histochemical Journal*. – 1992. – Vol. 24, N 11. – P. 811–826. – DOI: 10.1007/BF01046353
77. Köstlin, N. Granulocytic myeloid derived suppressor cells expand in human pregnancy and modulate T-cell responses: Cellular immune response / N. Köstlin, H. Kugel, B. Spring [et al.] // *European Journal of Immunology*. – 2014. – Vol. 44, N 9. – P. 2582–2591. – DOI: 10.1002/eji.201344200
78. Kostlin, N. Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Accumulate in Human Placenta and Polarize toward a Th2 Phenotype. N. Kostlin, K. Hofstadter, A.L. Ostermeir [et al.] // *J Immunol*. – 2016. – Vol. 196, N 3. –P.1132–1145. – DOI: 10.4049/jimmunol.1500340
79. Kumar, V. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment / V. Kumar, S. Patel, E. Tcyganov [et al.] // *Trends in Immunology*. – 2016. – Vol. 37, N 3. – P. 208–220. – DOI: 10.1016/j.it.2016.01.004
80. Lakschevitz, F.S. Identification of neutrophil surface marker changes in health and inflammation using high-throughput screening flow cytometry / F. S. Lakschevitz, S. Hassanpour, A. Rubin [et al.] // *Experimental Cell Research*. – 2016. – Vol. 342, N 2. – P. 200–209. – DOI: 10.1016/j.yexcr.2016.03.007
81. Lam, K.K. Glycodelin-A Protein Interacts with Siglec-6 Protein to Suppress Trophoblast Invasiveness by Down-regulating Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK)/c-Jun Signaling Pathway / K. K. Lam, P. C. Chiu, C. Lee [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 286, N 43. – P. 37118–37127. – DOI: 10.1074/jbc.M111.233841
82. Lechner, M. G. Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells / M. G. Lechner, D. J. Liebertz, A. L. Epstein // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. – 2010. – Vol. 185, N 4. – P. 2273–2284. – DOI: 10.4049/jimmunol.1000901
83. Lee, C. Differential actions of glycodelin-A on Th-1 and Th-2 cells: a paracrine mechanism that could produce the Th-2 dominant environment during

pregnancy / C. Lee, P. C. Chiu, K. K. Lam [et al.] // *Human Reproduction*. – 2011. – Vol. 26, N 3. – P. 517–526. – DOI: 10.1093/humrep/deq381

84. Lee, C. Glycodelin-A as a paracrine regulator in early pregnancy / C. Lee, K. K. Lam, H. Koistinen [et al.] // *Journal of Reproductive Immunology*. – 2011. – Vol. 90, N 1. – P. 29–34. – DOI: 10.1016/j.jri.2011.04.007

85. Lee, C. Glycodelin-A Stimulates Interleukin-6 Secretion by Human Monocytes and Macrophages through L-selectin and the Extracellular Signal-regulated Kinase Pathway / C. Lee, E. Y. Lam, K. K. Lam [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – Vol. 287, N 44. – P. 36999–37009. – DOI: 10.1074/jbc.M112.385336

86. Lee, C. Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Proinflammatory Cytokine–Mediated Inhibition of Trophoblast Invasion in Placenta-Related Complications of Pregnancy / C. Lee, J. H. Veerbeek, T. K. Rana [et al.] // *The American Journal of Pathology*. – 2019. – Vol. 189, N 2. – P. 467–478. – DOI: 10.1016/j.ajpath.2018.10.015

87. Lee, C. The Pleiotropic Effect of Glycodelin-A in Early Pregnancy / C. Lee, K. K. W. Lam, M. Vijayan [et al.] // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 2016. – Vol. 75, N 3. – P. 290–297. – DOI: 10.1111/aji.12471

88. Lelis, F.J. Myeloid-derived suppressor cells modulate B-cell responses / F. J. Lelis, J. Jaufmann, A. Singh [et al.] // *Immunology Letters*. – 2017. – Vol. 188. – P. 108–115. – DOI: 10.1016/j.imlet.2017.07.003

89. Lim, H.X. Understanding the differentiation, expansion, recruitment and suppressive activities of myeloid-derived suppressor cells in cancers / H.X. Lim, Kim T.S., Poh C.L. // *International J. Molecular Science*. – 2020. – Vol. 21, N 10. ID 3599. doi:10.3390/ijms21103599

90. Lin, Y. Interleukin 26 Skews Macrophage Polarization Towards M1 Phenotype by Activating cJUN and the NF- κ B Pathway / Y. Lin, Y. Wang, Y. [et al.] // *Peng Cells*. – Vol. 9, N 4. – DOI: 10.3390/cells9040938.

91. Lopata, A. The potential of early human embryos to form blastocysts, hatch from their zona and secrete HCG in culture / A. Lopata, D. L. Hay // *Human*

Reproduction. – 1989. – Vol. 4, N suppl 1. – P. 87–94. – DOI: 10.1093/humrep/4.suppl_1.87

92. Lund, H. Epitope analysis and detection of human chorionic gonadotropin (hCG) variants by monoclonal antibodies and mass spectrometry / H. Lund, E. Paus, P. Berger [et al.] // *Tumor Biology*. – 2014. – Vol. 35, N 2. – P. 1013–1022. – DOI: 10.1007/s13277-013-1135-y

93. Lutz, M. B. Comments on the ambiguity of selected surface markers, signaling pathways and omics profiles hampering the identification of myeloid-derived suppressor cells / M. B. Lutz, I. N. Eckert // *Cellular Immunology*. – 2021. – Vol. 364. – P. 104347. – DOI: 10.1016/j.cellimm.2021.104347

94. Ma, P. Circulating Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSC) That Accumulate in Premalignancy Share Phenotypic and Functional Characteristics With MDSC in Cancer / P. Ma, P. L. Beatty, J. McKolanis, [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1401. – DOI: 10.3389/fimmu.2019.01401

95. Maes, R. F. The effect of preparations of human chorionic gonadotropin on lymphocyte stimulation and immune response / R. F. Maes, N. Claverie // *Immunology*. – 1977. – Vol. 33, N 3. – P. 351–360.

96. Makarenkova, V.P. CD11b+/Gr-1+ myeloid suppressor cells cause T cell dysfunction after traumatic stress. / V.P. Makarenkova, V Bansal, BM Matta [et al.] // *J Immunol*. – 2006. – Vol. 176. – P. 2085–2094.

97. Marvel, D. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected / D. Marvel, D. Gabrilovich // *Clinical Investigation*. – 2015. – Vol. 125, N 9. – P. 3356–3364.

98. Mauti, L.A. Myeloid-derived suppressor cells are implicated in regulating permissiveness for tumor metastasis during mouse gestation / L. A. Mauti, M. Le Bitoux, K. Baumer [et al.] // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2011. – Vol. 121, N 7. – P. 2794–2807. – DOI: 10.1172/JCI41936

99. Medzhitov, R. Highlights of 10 years of immunology in Nature Reviews Immunology / R. Medzhitov, E. M. Shevach, G. Trinchieri [et al.] // *Nature Reviews Immunology*. – 2011. – Vol. 11, N 10. – P. 693–702. – DOI: 10.1038/nri3063

100. Mellor, A.L. Tryptophan catabolism prevents maternal T-cell from activating lethal anti-fetal immune responses / A.L. Mellor, D.H. Munn // *J. Reprod. Immunol.* - 2001. - Vol. 52. - P. 5-13.

101. Menon, R. Human fetal membrane expression of IL-19 and IL-20 and its differential effect on inflammatory cytokine production. R. Menon, L. Ismail, D. Ismail [et al.] // *Matern Fetal Neonatal Medicine.* - Vol. 19, N 4. - P. 209-214. - DOI: 10.1080/14767050500440986.

102. Mezrich, J. D. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells / J. D. Mezrich, J. H. Fechner, X. Zhang, [et al.] // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950).* - 2010. - Vol. 185, N 6. - P. 3190–3198. - DOI: 10.4049/jimmunol.0903670

103. Mizejewski, G. J. Alpha-fetoprotein structure and function: relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants / G. J. Mizejewski // *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.).* - 2001. - Vol. 226, N 5. - P. 377–408. - DOI: 10.1177/153537020122600503

104. Mizejewski, G. J. Biological role of α -fetoprotein in cancer: prospects for anticancer therapy / G. J. Mizejewski // *Expert Review of Anticancer Therapy.* - 2002. - T. 2, № 6. - P. 709–735. - DOI: 10.1586/14737140.2.6.709

105. Mizejewski, G. J. Biological roles of alpha-fetoprotein during pregnancy and perinatal development / G. J. Mizejewski // *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.).* - 2004. - Vol. 229, N 6. - P. 439–463. - DOI: 10.1177/153537020422900602

106. Mizejewski, G. J. Review of the putative cell-surface receptors for alpha-fetoprotein: identification of a candidate receptor protein family / G. J. Mizejewski // *Tumor Biology.* - 2011. - Vol. 32, N 2. - P. 241–258. - DOI: 10.1007/s13277-010-0134-5

107. Mold, J.E. Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero / J. E. Mold, J. Michaëlsson, T. D. Burt [et al.] // *Science (New York, N.Y.).* - 2008. - Vol. 322, N 5907. - P. 1562–1565. - DOI: 10.1126/science.1164511

108. Mukhopadhyay, D. Placental protein 14 induces apoptosis in T cells but not in monocytes / D. Mukhopadhyay, S. Sundereshan, C. Rao [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – Vol. 276, N 30. – P. 28268–28273. – DOI: 10.1074/jbc.M010487200
109. Munn, D.H. Prevention of allogenic fetal rejection by tryptophan catabolism / D.H. Munn, M. Zhou, J.T. Attwood [et al.] // *Science*. - 1998. - Vol. 281. - P. 1191–1193.
110. Munson, P. V. Immunomodulatory impact of α -fetoprotein / P. V. Munson, J. Adamik, L. H. Butterfield // *Trends in Immunology*. – 2022. – T. 43, № 6. – C. 438–448. – DOI: 10.1016/j.it.2022.04.001
111. Murgita, R. A. Alpha-Fetoprotein induces suppressor T cells in vitro / R. A. Murgita, E. A. Goidl, S. Kontianen [et al.] // *Nature*. – 1977. – Vol. 267, N 5608. – P. 257–259. – DOI: 10.1038/267257a0
112. Nagaraj, S. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8⁺ T cell tolerance in cancer / S. Nagaraj, K. Gupta, V. Pisarev, [et al.] // *Nature Medicine*. – 2007. – Vol. 13, N 7. – P. 828–835. – DOI: 10.1038/nm1619
113. Nair, R.R. Reduced Myeloid-derived Suppressor Cells in the Blood and Endometrium is Associated with Early Miscarriage / R. R. Nair, P. Sinha, A. Khanna [et al.] // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 2015. – Vol. 73, N 6. – P. 479–486. – DOI: 10.1111/aji.12351
114. Newton, K. Signaling in Innate Immunity and Inflammation / K. Newton, V. M. Dixit // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2012. – Vol. 4, N 3. – P. 1-19. – DOI: 10.1101/cshperspect.a006049.
115. Nicholson, L. B. Monocyte dependent regulation of autoimmune inflammation / L. B. Nicholson, B. J. E. Raveney, M. Munder // *Current Molecular Medicine*. – 2009. – Vol. 9, N 1. – P. 23–29. – DOI: 10.2174/156652409787314499
116. Noman, M. Z. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation / M. Z. Noman, G. Desantis, B. Janji [et al.] // *Journal of Experimental Medicine*. – 2014. – T. 211, № 5. – C. 781–790. – DOI: 10.1084/jem.20131916

117. Ochanuna, Z. Inhibition of effector function but not T cell activation and increase in FoxP3 expression in T cells differentiated in the presence of PP14 / Z. Ochanuna, A. Geiger-Maor, A. Dembinsky-Vaknin [et al.] // *PloS One*. – 2010. – Vol. 5, N 9. – P. e12868. – DOI: 10.1371/journal.pone.0012868
118. Ochoa, J. B. Effects of L-arginine on the proliferation of T lymphocyte subpopulations. / J. B. Ochoa, J. Strange, P. Kearney [et al.] // *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. – 2001. – Vol. 25. – P. 23–29.
119. Ohta, A. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells / A. Ohta, E. Gorelik, S. J. Prasad, F. [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – Vol. 103, N 35. – P. 13132–13137. – DOI: 10.1073/pnas.0605251103
120. Osman, I. Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term / I. Osman, A. Young, M. A. Ledingham [et al.] // *Molecular Human Reproduction*. – 2003. – Vol. 9, N 1. – P. 41–45. – DOI: 10.1093/molehr/gag001
121. Ostrand-Rosenberg, S. Myeloid derived-suppressor cells: their role in cancer and obesity / S. Ostrand-Rosenberg // *Current Opinion in Immunology*. – 2018. – Vol. 51. – P. 68–75. – DOI: 10.1016/j.coi.2018.03.007
122. Pacher, P. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease / P. Pacher, J. S. Beckman, L. Liaudet // *Physiological Reviews*. – 2007. – Vol. 87, N 1. – P. 315–424. – DOI: 10.1152/physrev.00029.2006
123. Pan, P. Immune Stimulatory Receptor CD40 Is Required for T-Cell Suppression and T Regulatory Cell Activation Mediated by Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancer / P. Pan, G. Ma, K. J. Weber [et al.] // *Cancer Research*. – 2010. – Vol. 70, N 1. – P. 99–108. – DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1882
124. Pan, T. 17 β -Oestradiol enhances the expansion and activation of myeloid-derived suppressor cells via signal transducer and activator of transcription (STAT)-3 signalling in human pregnancy / T. Pan, L. Zhong, S. Wu, Y. [et al.] // *Clinical and Experimental Immunology*. – 2016. – T. 185, № 1. – P. 86–97. – DOI: 10.1111/cei.12790

125. Parmelee, D. C. The presence of fatty acids in human alpha-fetoprotein / D. C. Parmelee, M. A. Evenson, H. F. Deutsch // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1978. – Vol. 253, N 7. – P. 2114–2119.
126. Parmiani, G. Opposite immune functions of GM-CSF administered as vaccine adjuvant in cancer patients / G. Parmiani, C. Castelli, L. Pilla [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2007. – N 18. – P. 226-232.
127. Paulesu, L. hCG and Its Disruption by Environmental Contaminants during Human Pregnancy / L. Paulesu, C. V. Rao, F. Ietta [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – Vol. 19, N 3. – P. 914. – DOI: 10.3390/ijms19030914
128. Peck, A. B. Cellular and genetic restrictions in the immunoregulatory activity of alpha-fetoprotein. III. Role of the MLC-stimulating cell population in alpha-fetoprotein-induced suppression of T cell-mediated cytotoxicity / A. B. Peck, R. A. Murgita, H. Wigzell // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. – 1982. – Vol. 128, N 3. – P. 1134–1140.
129. Pockley, A. G. Placental protein 14 (PP14) inhibits the synthesis of interleukin-2 and the release of soluble interleukin-2 receptors from phytohaemagglutinin-stimulated lymphocytes / A. G. Pockley, A. E. Bolton // *Clinical and Experimental Immunology*. – 1989. – Vol. 77, N 2. – P. 252–256.
130. Pockley, A. G. The effect of human placental protein 14 (PP14) on the production of interleukin-1 from mitogenically stimulated mononuclear cell cultures / A. G. Pockley, A. E. Bolton // *Immunology*. – 1990. – Vol. 69, N 2. – P. 277–281.
131. Rachmilewitz, J. A rheostatic mechanism for T-cell inhibition based on elevation of activation thresholds / J. Rachmilewitz, G. J. Riely, J. H. Huang [et al.] // *Blood*. – 2001. – Vol. 98, N 13. – P. 3727–3732. – DOI: 10.1182/blood.v98.13.3727
132. Rachmilewitz, J. Placental protein 14 functions as a direct T-cell inhibitor / J. Rachmilewitz, G. J. Riely, M. L. Tykocinski // *Cellular Immunology*. – 1999. – Vol. 191, N 1. – P. 26–33. – DOI: 10.1006/cimm.1998.1408
133. Ramhorst, R. Decoding the chemokine network that links leukocytes with decidual cells and the trophoblast during early implantation / R. Ramhorst, E. Grasso, D.

Paparini [et al.] // *Cell Adhesion & Migration*. – 2016. – Vol. 10, N 1-2. – P. 197–207. – DOI: 10.1080/19336918.2015.1135285

134. Rami, D. The First Trimester Gravid Serum Regulates Procalcitonin Expression in Human Macrophages Skewing Their Phenotype *In Vitro* / D. Rami, M. La Bianca, C. [et al.] // *Mediators of Inflammation*. – 2014. – Vol. 2014. – P. 1–10. – DOI: 10.1155/2014/248963

135. Rao, C. V. The past, present and future of nongonadal LH/hCG actions in reproductive biology and medicine / C. V. Rao, Z. M. Lei // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2007. – Vol. 269, N 1-2. – P. 2–8. – DOI: 10.1016/j.mce.2006.07.007

136. Rastad, J. L. Myeloid-derived suppressor cells in murine AIDS inhibit B-cell responses in part via soluble mediators including reactive oxygen and nitrogen species, and TGF- β / J. L. Rastad, W. R. Green // *Virology*. – 2016. – T. 499. – P. 9–22. – DOI: 10.1016/j.virol.2016.08.031

137. Ren, J. Myeloid- derived suppressor cells depletion may cause pregnancy loss via upregulating the cytotoxicity of decidual natural killer cells / J. Ren, W. Zeng, F. Tian [et al.] // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 2019. – Vol. 81, N 4. – P. e13099. – DOI: 10.1111/aji.13099

138. Ren, S. Functional characterization of the progestagen-associated endometrial protein gene in human melanoma / S. Ren, S. Liu, P. M. Howell Jr [et al.] // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2009. – Vol. 14, N 6b. – P. 1432–1442. – DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00922.x

139. Ribechini, E. Novel GM-CSF signals via IFN- γ R/IRF-1 and AKT/mTOR license monocytes for suppressor function / E. Ribechini, J. A. Hutchinson, S. Hergovits [et al.] // *Blood Advances*. – 2017. – T. 1, № 14. – C. 947–960. – DOI: 10.1182/bloodadvances.2017006858

140. Riittinen, L. Time-resolved immunofluorometric assay for placental protein 14 / L. Riittinen, U. H. Stenman, H. Alfthan [et al.] // *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. – 1989. – Vol. 183, N 2. – P. 115–123. – DOI: 10.1016/0009-8981(89)90327-6

141. Rodriguez, P. C. l-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression / P. C. Rodriguez, D. G. Quiceno, A. C. Ochoa // *Blood*. – 2007. – Vol. 109, N 4. – P. 1568–1573. – DOI: 10.1182/blood-2006-06-031856
142. Rodriguez, P. C. L-Arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes. / P. C. Rodriguez, A.H. Zea, J. DeSalvo [et al.] // *J Immunol*. – 2003. – Vol. 171. – P. 1232–1239.
143. Sa, S. The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis. Sa S., Valdez P., Wu J. [et al.] // *Immunology*. – Vol. 178, N 4. – P. 2229-2240. – DOI: 10.4049/jimmunol.178.4.2229.
144. Saito, S. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy / S. Saito, A. Nakashima, T. Shima [et al.] // *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*. – 2010. – Vol. 63, N 6. – P. 601–610. – DOI: 10.1111/j.1610-0897.2010.00852.x
145. Sakuishi, K. Emerging Tim-3 functions in antimicrobial and tumor immunity / K. Sakuishi, P. Jayaraman, S. M. Behar [et al.] // *Trends in Immunology*. – 2011. – Vol. 32, N 8. – P. 345–349. – DOI: 10.1016/j.it.2011.05.003
146. Santegoets, K.C.M. Expression profiling of immune inhibitory Siglecs and their ligands in patients with glioma. K.C.M. Santegoets, P.R. Gielen, C. Büll [et al.] // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2019.- Vol. 68.- P. 937–949.
147. Sasaki, Y. Hyperglycosylated human chorionic gonadotropin and the source of pregnancy failures / Y. Sasaki, D. G. Ladner, L. A. Cole // *Fertility and Sterility*. – 2008. – Vol. 89, N 6. – P. 1781–1786. – DOI: 10.1016/j.fertnstert.2007.03.010
148. Savasan, Z. Interleukin-19 in fetal systemic inflammation. Savasan Z., Chaiworapongsa T., Romero R. [et al.] // *Matern Fetal Neonatal Medicine*. – Vol. 25, N 7. – P. 995-1005. – DOI: 10.3109/14767058.2011.605917.
149. Schittenhelm, L. β 2 Integrins As Regulators of Dendritic Cell, Monocyte, and Macrophage Function / L. Schittenhelm, C. M. Hilkens, V. L. Morrison // *Frontiers in Immunology*. – 2017. – T. 8. – C. 1866. – DOI: 10.3389/fimmu.2017.01866

150. Schlecker, E. Tumor-Infiltrating Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Mediate CCR5-Dependent Recruitment of Regulatory T Cells Favoring Tumor Growth / E. Schlecker, A. Stojanovic, C. Eisen [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2012. – Vol. 189, N 12. – P. 5602–5611. – DOI: 10.4049/jimmunol.1201018
151. Scholz, C. Glycodelin A induces a tolerogenic phenotype in monocyte-derived dendritic cells in vitro / C. Scholz, B. Toth, R. Brunnhuber [et al.] // *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*. – 2008. – Vol. 60, N 6. – P. 501–512. – DOI: 10.1111/j.1610-0897.2008.00647.x
152. Schumacher, A. Human chorionic gonadotropin as a central regulator of pregnancy immune tolerance / A. Schumacher, K. Heinze, J. Witte [et al.] // *J Immunol*. – 2013 – Vol. 190, N 6. – P. 2650-2658.
153. Seppälä, M. Glycodelin: A Major Lipocalin Protein of the Reproductive Axis with Diverse Actions in Cell Recognition and Differentiation / M. Seppälä, R. N. Taylor, H. Koistinen [et al.] // *Endocrine Reviews*. – 2002. – Vol. 23, N 4. – P. 401–430. – DOI: 10.1210/er.2001-0026
154. Serafini, P. Myeloid-Derived Suppressor Cells Promote Cross-Tolerance in B-Cell Lymphoma by Expanding Regulatory T Cells / P. Serafini, S. Mgebhoff, K. Noonan [et al.] // *Cancer Research*. – 2008. – Vol. 68, N 13. – P. 5439–5449. – DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6621
155. Shi, Q. J. Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. / Q. J. Shi, Z. M. Lei, C. V. Rao [et al.] // *Endocrinology*. – 1993. – Vol. 132, N 3. – P. 1387–1395. – DOI: 10.1210/endo.132.3.7679981
156. Shirshhev, S. V. Reproductive hormones in the regulation of apoptosis of neutrophils / S. V. Shirshhev, E. M. Kuklina, A. A. Yarilin // *Biochemistry (Moscow)*. – 2003. – Vol. 68, N 6. – P. 688–695. – DOI: 10.1023/A:1024626128286
157. Shirshhev, S. V. Role of cAMP and neutrophil cyclooxygenase in gonadotropin-dependent regulation of T lymphocyte proliferation. / S. V. Shirshhev, E. M. Kuklina // *Biochemistry (Moscow)*. – 2001. – Vol. 66, N 9. – P. 994–998. – DOI: 10.1023/A:1012321619879

158. Slavin, S. Induction of allograft tolerance after total lymphoid irradiation (TLI): development of suppressor cells of the mixed leukocyte reaction (MLR) / S. Slavin, S. Strober // *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950). – 1979. – Vol. 123, N 2. – P. 942–946.
159. Sonnenfeld, A. Leukämische reaktionen bei carcinoma / A.Sonnenfeld // *Zeitschrift f Klin Med.* – 1929. – P. 111.
160. Sørensen, S. Affinity purification of native glycodelin from amniotic fluid for biological investigations and development of a glycodelin ELISA for clinical studies / S. Sørensen, V. Myrhøj, T. H. Nguyen, P. [et al.] // *Protein Expression and Purification.* – 2017. – Vol. 130. – P. 73–80. – DOI: 10.1016/j.pep.2016.09.020
161. Steinman, R. M. Tolerogenic dendritic cells / R. M. Steinman, D. Hawiger, M. C. Nussenzweig // *Annual Review of Immunology.* – 2003. – Vol. 21. – P. 685–711. – DOI: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141040
162. Stout, R. D. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments / R. D. Stout, J. Suttles // *Journal of Leukocyte Biology.* – 2004. – Vol. 76, N 3. – P. 509–513. – DOI: 10.1189/jlb.0504272
163. SundarRaj, S. Glycodelin A triggers mitochondrial stress and apoptosis in T cells by a mechanism distinct and independent of TCR signaling / S. SundarRaj, D. Mukhopadhyay, A. A. Karande // *Molecular Immunology.* – 2008. – Vol. 45, N 8. – P. 2391–2400. – DOI: 10.1016/j.molimm.2007.11.004
164. Swartz, S. K. The lack of estrogen binding by human alpha-fetoprotein / S. K. Swartz, M. S. Soloff // *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* – 1974. – Vol. 39, N 3. – P. 589–591. – DOI: 10.1210/jcem-39-3-589
165. Teodorczyk-Injeyan, J. A. Chorionic gonadotropin-induced cell proliferation and polyclonal immunoglobulin synthesis in human mononuclear cells / J. A. Teodorczyk-Injeyan, J. A. Kellen // *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie.* – 1988. – Vol. 42, N 1. – P. 49–53.
166. Tsampalas, M. Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties / M. Tsampalas, V. Gridelet, S. Berndt [et al.]

// Journal of Reproductive Immunology. – 2010. – Vol. 85, N 1. – P. 93–98. – DOI: 10.1016/j.jri.2009.11.008

167. Turner, E.C. Conditional ablation of macrophages disrupts ovarian vasculature / E. C. Turner, J. Hughes, H. Wilson, [et al.] // REPRODUCTION. – 2011. – Vol. 141, N 6. – P. 821–831. – DOI: 10.1530/REP-10-0327

168. Um, S.H. Alpha-fetoprotein impairs APC function and induces their apoptosis / S. H. Um, C. Mulhall, A. Alisa, [et al.] // Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950). – 2004. – Vol. 173, N 3. – P. 1772–1778. – DOI: 10.4049/jimmunol.173.3.1772

169. Underwood, J.L. Does antigenic modulation cause the absence of major histocompatibility complex antigens on the syncytiotrophoblast? / J.L. Underwood, M. Ruszkiewicz, K.L. Barnden [et al.] // Transplant.Proc. –1985. –V.17. –P.921-924.

170. Veglia, F. Myeloid-derived suppressor cells coming of age / F. Veglia, M. Perego, D. Gabrilovich // Nature Immunology. – 2018. – Vol. 19, N 2. – P. 108–119. – DOI: 10.1038/s41590-017-0022-x

171. Vijayan, M. P56 Glycodelin-A polarised human macrophages exhibit characteristics and functions similar to decidual macrophages / Vijayan M., Lee C-L., Chiu P.C.N. [et al.] // American Journal of Reproductive Immunology. - 2018. - Vol. 80.- P. 81–82.

172. Wan, H. Chorionic gonadotropin up-regulates long pentraxin 3 expression in myeloid cells / H. Wan, C. G. Helden-Meeuwsen, C. Garlanda, [et al.] // Journal of Leukocyte Biology. – 2008. – Vol. 84, N 5. – P. 1346–1352. – DOI: 10.1189/jlb.0108067

173. Wang, P. Prognostic role of pretreatment circulating MDSCs in patients with solid malignancies: A meta-analysis of 40 studies / P. Wang, S. Song, T. Wang [et al.] // Oncoimmunology. – 2018. – Vol. 7, N 10. – P. e1494113. – DOI: 10.1080/2162402X.2018.1494113

174. Wang, W. Downregulation of phorbol 12-myristate 13-acetate-induced tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta production and gene expression in human monocytic cells by human alpha-fetoprotein / W. Wang, E. Alpert // Hepatology (Baltimore, Md.). – 1995. – Vol. 22, N 3. – P. 921–928.

175. Wei, J. Myeloid-derived suppressor cells in major depression patients suppress T-cell responses through the production of reactive oxygen species / J. Wei, M. Zhang, J. Zhou // *Psychiatry Research*. – 2015. – Vol. 228, N 3. – P. 695–701. – DOI: 10.1016/j.psychres.2015.06.002
176. Wiley, S. A novel TNF receptor family member binds TWEAK and is implicated in angiogenesis. Wiley S., Cassiano L., Lofton T. [et al.] // *Immunity*. – Vol. 15, N 5. – P. 837-846. – DOI: 10.1016/s1074-7613(01)00232-1.
177. Wright, S.D. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. // S.D. Wright, R.A. Ramos, P.S. Tobias [et al.] // *Science*. – 1990. – Vol. 249. – P. 1431-1433.
178. Wu, H. Arginase-1-dependent promotion of TH17 differentiation and disease progression by MDSCs in systemic lupus erythematosus / H. Wu, Y. Zhen, Z. Ma [et al.] // *Science Translational Medicine*. – 2016. – Vol. 8, N 331. – P. 331ra40. – DOI: 10.1126/scitranslmed.aae0482
179. Wu, T. The roles of myeloid-derived suppressor cells in transplantation / T. Wu, Y. Zhao, Y. Zhao // *Expert Review of Clinical Immunology*. – 2014. – Vol. 10, N 10. – P. 1385–1394. – DOI: 10.1586/1744666X.2014.948424
180. Xia, S. Gr-1+ CD11b+ myeloid-derived suppressor cells suppress inflammation and promote insulin sensitivity in obesity / S. Xia, H. Sha, L. Yang [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 286, N 26. – P. 23591–23599. – DOI: 10.1074/jbc.M111.237123
181. Yamamoto, M. α -Fetoprotein impairs activation of natural killer cells by inhibiting the function of dendritic cells / M. Yamamoto, T. Tatsumi, T. Miyagi [et al.] // *Clinical and Experimental Immunology*. – 2011. – T. 165, № 2. – C. 211–219. – DOI: 10.1111/j.1365-2249.2011.04421.x
182. Yeung, W. S. B. Effects of glycodefins on functional competence of spermatozoa / W. S. B. Yeung, K. Lee, R. Koistinen [et al.] // *Journal of Reproductive Immunology*. – 2009. – Vol. 83, N 1-2. – P. 26–30. – DOI: 10.1016/j.jri.2009.04.012
183. Yu, J. Noncanonical NF- κ B Activation Mediates STAT3-Stimulated IDO Upregulation in Myeloid-Derived Suppressor Cells in Breast Cancer / J. Yu, Y. Wang, F.

Yan [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2014. – Т. 193, № 5. – С. 2574–2586. – DOI: 10.4049/jimmunol.1400833

184. Zamorina, S. A. Human chorionic gonadotropin is a factor in the induction of immune tolerance in pregnancy / S. A. Zamorina, S.V. Shirshv. // *immunologia*. - 2013 - Vol.34. – P. 105-107.

185. Zanoni, I. Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation / I. Zanoni, F. Granucci // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2013. – Vol. 3. – P. 32. – DOI: 10.3389/fcimb.2013.00032

186. Zhang, B. Circulating and tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells in patients with colorectal carcinoma / B. Zhang, Z. Wang, L. Wu [et al.] // *PloS One*. – 2013. – Vol. 8, N 2. – P. e57114. – DOI: 10.1371/journal.pone.0057114

187. Zhang, H. Myeloid-derived suppressor cells are proinflammatory and regulate collagen-induced arthritis through manipulating Th17 cell differentiation / H. Zhang, S. Wang, Y. Huang [et al.] // *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*. – 2015. – Vol. 157, N 2. – P. 175–186. – DOI: 10.1016/j.clim.2015.02.001

188. Zhang, Y. Human trophoblast cells induced MDSCs from peripheral blood CD14(+) myelomonocytic cells via elevated levels of CCL2 / Y. Zhang, D. Qu, J. Sun [et al.] // *Cellular & Molecular Immunology*. – 2016. – Vol. 13, N 5. – P. 615–627. – DOI: 10.1038/cmi.2015.41

189. Zhu, J. Myeloid-Derived Suppressor Cells Regulate Natural Killer Cell Response to Adenovirus-Mediated Gene Transfer / J. Zhu, X. Huang, Y. Yang // *Journal of Virology*. – 2012. – Vol. 86, N 24. – P. 13689–13696. – DOI: 10.1128/JVI.01595-12

190. Ziegler-Heitbrock, L. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood / L. Ziegler-Heitbrock, P. Ancuta [et al.] // *Blood*. – 2010. – Vol. 116, N 16. – P. e74–80. – DOI: 10.1182/blood-2010-02-258558

Приложение А

Влияние времени и условий культивирования на процент общей субпопуляции
MDSC (HLA-DR⁻CD33⁺CD11b⁺), M±m, n=3

Время/условия культивирования Time/culture conditions	IL-6 + GM-CSF (20 нг/мл) IL-6 + GM-CSF (20 ng/ml)	IL-6 + GM-CSF (20 нг/мл) + LPS (100 нг/мл) IL-6 + GM-CSF (20 ng/ml) + LPS (100 ng/ml)	IL-6 + GM-CSF (40 нг/мл) IL-6 + GM-CSF (40 ng/ml)	IL-6 + GM-CSF (40 нг/мл) + LPS (100 нг/мл) IL-6 + GM-CSF (40 ng/ml) + LPS (100 ng/ml)
1-я неделя 1 st week	1,158±0,476	1,325±0,761	1,112±0,659	1,258±0,875
2-я недели 2 nd weeks	0,677±0,258	0,797±0,476	2,313±1,114	0,650±0,355
3-я недели 3 rd weeks	1,079±0,536	2,166±0,654	2,035±0,872	0,551±0,254

Приложение Б

Концентрации цитокинов супернатантов культур CD33-клеток после 7
суток культивирования

IL-19	IL-12 (p40)	MMP-2	IL-26	IFN-gamma	IFN-alfa2	sIL-6Ralfa	IL-22	IL-34	gp130/sIL-6Rbeta	IL-27(p28)	Цитокины
132,9 (107,8-237,9)	40,3 (32,4-133,6)	901,7 (604,5-1610,3)	648,2 (508,7-860)	8,93 (7-17)	25,3 (19,1-42,6)	510,9 (430-951,1)	1574,6 (972,1-2544,3)	1268,6 (886,7-1281,3)	386,7 (329,9-500,6)	76,1 (51-90,7)	Контроль белков
122,8 (109,5-129,5)	39,3 (37,3-42,5)	769,4 (659,3-769,4)	561,4 (538,9-614,4)	7,7 (7,3-8,5)	21,6 (20,3-22,8)	529,1 (381,7-1003,9)	1178,8 (1126,8-1368,1)	825,3 (727,8-1129,8)	301,5 (282,6-377,3)	61,5 (61,1-67,4)	АФП 10 МЕ/мл
159,7 (130,4-171,5)	50,2 (42,8-51,6)	879,7 (786-1034,1)	567,8 (542,1-641,8)	10,1 (8,3-11,2)	27,7 (22,8-29,6)	579 (390,5-1017,2)	1402,7 (1244,6-1559,9)	756 (746,6-1028,2)	332,2 (321,6-422,3)	70,4 (67,4-77,4)	АФП 50 МЕ/мл
139,6 (122,9-175,7)	44,2 (43,2-57,9)	989,9 (918,3-1166,6)	593,5 (577,4-728,9)	9,7 (9,7-11,6)	25,3 (24,6-30,2)	603,4 (415,8-1012,7)	1433,5 (1417,3-1787,6)	837,9 (756,1-1171,2)	320,4 (315,7-406,9)	77,5 (72,5-90,1)	АФП 100 МЕ/мл
205,2 (180,8-250,1)	121,8 (102,3-133,3)	1288 (1128-1459,5)	864,3 (788,4-909,6)	18,2 (17,3-20,6)	45,1 (41,4-48,8)	452,8 (375,2-920,7)	2470 (2226,4-2632,1)	976,9 (897,9-1282,3)	415,1 (386,7-529,1)	116,5 (99,4-118,4)	ГД 0,2 МКГ/мл
329,2 (247,8-385,1)	367,2 (268,6-370)	1919,1 (1869,2-2052,3)	1032,8 (984,2-1078,3)	23,9 (21,5-26)	69,3 (61,5-70,9)	773,9 (583,2-1080)	3472,9 (3163,5-3541,5)	1319,5 (1186,2-1468)	647,9 (522-664,6)	102,1 (97,3-117,8)	ГД 2 МКГ/мл
533,4 (373,5-564,1)	598,7 (401,6-1248,1)	2107,8 (2019-2291,2)	1032,8 (1028-1215,5)	33,8 (28-44,7)	96,1 (94-101,4)	1333,7 (930,2-1997)	3547,3 (3367,8-3761)	1262,2 (1252,7-1619,7)	647,9 (588,5-686,1)	121,4 (119-122,3)	ГД 10
97,8 (95,3-103,6)	34,4 (32,1-35,4)	835,6 (692,4-868,6)	561,4 (506,9-599,9)	8,1 (7,3-8,3)	21,6 (19,7-22,8)	554,6 (380,1-850,2)	1249,7 (1028-1413,9)	642,8 (617,7-917,6)	275,5 (261,3-354,8)	61,5 (54,7-65,9)	ХГЧ 10 МЕ/мл
149,6 (121,2-161,4)	43,3 (36,3-44,5)	923,8 (890,7-945,8)	619,2 (609,6-628,9)	8,9 (7,3-8,9)	20,3 (19,1-23,7)	605,8 (410,5-1073,9)	1375,4 (1285,5-1523,6)	762,3 (738,7-1095,1)	334,6 (289,7-398,6)	71,8 (68,5-77,1)	ХГЧ 100 МЕ/мл

sCD163	MMP-3	IFN-beta	MMP-1	APRIL/ TNFSF1 3	IL-11	IL-2	BAFF/T NFSF13 B	IL-32	IL-35	IL- 29/IFN- lambda1	IL-20
2658,5 (2044,5- 4044,7)	1302,7 (1014,6- 1806,8)	4,4 (3,4-10,7)	310,9 (224,5- 505,9)	113327,7 (67016,1- 338575,2)	4,8 (3,9-9,9)	31820,7 (21766,3- 38324,6)	31820,7 (21766,3- 38324,6)	43,3 (42,7- 47,7)	177,4 (133,3- 446,4)	15 (11,7- 34,1)	105,4 (82,9- 184,6)
1684,3 (1525,6- 4190,2)	1180,9 (1099,9- 1211,7)	4,5 (4,5-4,7)	250,4 (237,4- 267,7)	89619,5 (88569,6- 390229,5)	4,1 (2,9-4,9)	16460,6 (15677,5- 34391,1)	16460,6 (15677,5- 34391,1)	52,9 (47,4- 56,4)	171,8 (159,8- 185,1)	15,6 (13,8-16,2)	179,7 (176,6- 215,6)
2431,1 (2147,9- 3674,4)	1418,9 (1276,2- 1460,9)	5,5 (5,5-5,7)	336,9 (278,5- 362,8)	97489,5 (88546,3- 301973,4)	5,1 (3,4-5,6)	19944,6 (17867,9- 35894,8)	19944,6 (17867,9- 35894,8)	66,9 (56- 77,8)	240,7 (202,7- 253,4)	16,8 (15-18)	246,9 (210,7- 272,2)
2441,4 (1733,3- 4170)	1361,4 (1317,1- 1466,3)	6 (5,3-6,7)	293,6 (274,1- 354,2)	72076,6 (62903,2- 333776,8)	6,3 (4,4-7)	20531,2 (19134,5- 37954,6)	20531,2 (19134,5- 37954,6)	63,4 (54,2- 72,8)	194,3 (188,6- 244,3)	20,4 (16,8-21)	235,3 (233,7- 304,3)
3217 (2168,9- 6931,5)	1916,6 (1854,6- 2000,1)	10,3 (9,7-11,4)	466,7 (458,1- 557,8)	82836,4 (62042,3- 157180,9)	6,1 (5,3-7,2)	25072 (23737,4- 38319,8)	25072 (23737,4- 38319,8)	259,6 (173,1- 272,3)	573,9 (479,5- 609,9)	33,1 (32,8- 40,1)	504,4 (492,7- 534,7)
3127,8 (2086,4- 5513,1)	2355 (2123,6- 2365,9)	15 (14,5-16,7)	857,4 (703,2- 866,1)	38560,8 (30924,5- 98840)	7,8 (6,8-8,1)	40993,4 (33682,9- 62059,6)	40993,4 (33682,9- 62059,6)	452,4 (298,4- 499,3)	918,1 (720,1- 977,7)	56,8 (47,1-60,1)	868,8* (821,3- 1015,6)
4485,1 (3184,5- 6409)	2398,6 (2398,6- 2468,2)	59,9 (46,6-73,3)	940 (835,7- 964)	60054,6 (50942,6- 157556,1)	11,9 (9,5-14,4)	44088 (41435,6- 79181,5)	44088 (41435,6- 79181,5)	522,8 (403- 543,9)	1114,3 (916,3- 1162,7)	65,3 (58-67,7)	1153,6* (1039,24- 1330,3)
1700,4 (1668- 1846,5)	1117,5 (1093,1- 1210,1)	4,1 (3,7-4,3)	228,8 (217,9- 235,2)	130995,7 (102049,6- 321446,2)	4,6 (3,2-4,7)	17113 (16361,2- 27863,8)	17113 (16361,2- 27863,8)	39,8 (38,5- 40,9)	162 (153,5- 181,6)	13,2 (12-13,8)	208 (168,6- 235,3)
2028,1 (1663- 3955,7)	1242,5 (1180- 1287,4)	4,7 (4,6-5)	241,7 (241,7- 272)	90905,7 (83989,2- 408596,2)	4,9 (3,2-5,2)	19485,6 (17754,9- 32031,3)	19485,6 (17754,9- 32031,3)	55,5 (46,4- 57,7)	201,3 (192,9- 211,1)	14,4 (13,8-15)	243,7 (221,6- 259,5)

sTNF-R1	Chitinas e 3-like 1	sTNF-R2	IL-28A/IFN -	Osteocalcin	TWEAK/TNFSK12	IL-10	IL-8	sCD30/TNFRSF8	TSLP	LIGHT/TNFSF14	Pentraxin-3
7208,9 (5825,2- 7660,7)	112324,7 (99671,8- 153264,9)	1620,9 (1531,5- 1777,2)	9,4 (7-18,2)	250,7 (197,6- 552,4)	186,3 (133,6- 205,2)	165,1 (120,3- 190,4)	18513,5 (17007,6- 22164,9)	5584 (4394,5- 21376,6)	4,6 (3,6-7,2)	97,5 (60,7- 156,4)	89779,3 (88109,3- 105647,4)
6619 (6297,4- 7887)	115348,2 (110956,7- 169230,8)	1683,2 (1566,8- 1865,5)	8,9 (8,6-8,9)	250,7 (241-270)	155,8 (107- 179,8)	106,7 (66,4- 211,8)	12826,4 (12802,1- 13879,5)	5508,1 (4921,3- 5717,1)	3,9 (3,6-4,3)	72,5 (70,7-86,7)	108461,8 (72863,2- 144387,5)
7652,5 (6673- 7858,6)	118850,8 (115933,7- 177068)	1523,9 (1497,1- 1767,2)	11,6 (10,8-11,9)	318,4 (279,7- 328,1)	220,4 (142,5- 227,4)	129,3 (79,7- 440)	14843,4 (14166,6- 15047,3)	6421,2 (5076,2- 8306)	5,4 (4,2-5,6)	94,5 (82,5- 101,5)	62039,1 (58198,9- 62092,8)
6164,8 (5752- 7648,2)	132254,3 (116684,3- 189439,2)	1497,1 (1488- 1769)	10,5 (10-12,4)	299,1 (294,2- 362,1)	157,9 (121,1- 180,8)	239,6 (146,2- 247,5)	14844,5 (14796,9- 15612)	6516,5 (5746,9- 7445,6)	4,6 (4,4-5,6)	91,1 (90,1- 113,2)	100023,3 (86951,6- 181569)
6500,1 (5343,2- 8335,6)	90180,7 (81478,1- 233241)	1565,8 (1528,7- 1816,9)	18,9 (18,8- 19,1)	570,9 (561,2- 619,7)	155,8 (104,1- 166,1)	2073 (1185,9- 2096,3)	17176,2 (16658,4- 17850,2)	39505 (25061,6- 41471)	7,9 (7,4-8,1)	157,9 (140,2- 165)	116959 (104409,5- 121014,7)
9928,4 (7775,3- 11324,7)	122768,6 (106192,5- 141185,7)	1781,7 (1555,4- 1974,8)	25,8 (22,7-27,5)	795,4 (712,4- 871,4)	184,7 (126,8- 191,3)	4639,2 (2374,9- 5066,3)	19572,9 (18934,1- 20172,1)	69427,1 (45158,9- 73101,9)	12,1 (11,9-13,6)	219,8 (206,3- 222,8)	131531,9 (115454,4- 137163,8)
12794,8 (11222- 17635,8)	126303,1 (126236,4- 128964,6)	1858,9 (1677,1- 1989,5)	42,1 (34,5- 43,2)	859,1 (851,7- 915,5)	150,1 (114,5- 155,3)	5534,3 (2864,3- 5629,9)	19872,9 (18910,3- 19921,1)	81009,1 (60367,9- 84157,5)	17,7 (16,4-22,3)	264,5 (261,2- 295,3)	142760 (140090,5- 143359,2)
7119,5 (6145,4- 7306,2)	126430,8 (125627,1- 171722,9)	1551 (1535,6- 1789,7)	7,8 (7,6-8,5)	221,7 (199,9- 255,5)	139,7 (102,1- 172)	42 (36- 108,9)	14707,4 (13188,8- 14814,5)	4372,3 (4277,9- 4997,1)	3,5 (3,4-3,6)	85,6 (66,2-91,5)	59398,4 (40559,2- 90990,2)
7435,2 (6436,2- 8683,3)	140143,1 (126952,5- 166374,7)	1563,7 (1533- 1835,6)	7,8 (7,8-9,4)	221,7 (207,2- 250,7)	175,2 (134,4- 212,3)	71 (55,1- 229,5)	14662,2 (14608,1- 15119,2)	5622,1 (5129,4- 6461)	4,2 (3,6-4,6)	87,4 (83,9-94,4)	95571,9 (57941,1- 112711)

Osteopontin (OPN)	IL-12 (p70)
97479,1 (57286,3-162732,4)	2,3 (1,6-5)
112517,3 (91863,1-177708,3)	2,5 (2,2-2,5)
103897,4 (88850,9-165206,3)	2,6 (2,3-2,7)
91079,3 (77940,3-168682,7)	2,8 (2,5-3)
54692,9 (50500,4-74576)	4,7 (4,1-4,8)
66981,2 (50614,3-79132,3)	7,4 (7,0-7,5)
47425,9 (35233,4-128437,3)	10,2 (10,2-10,3)
81796 (78733,6-149836,5)	1,9 (1,6-2,3)
204066,3 (150519,6-232436,1)	2,8 (2,5-2,8)

Концентрации цитокинов супернатантов культур CD11b⁺-клеток после 7
суток культивирования

ММР-2	IL-26	IFN-gamma	IFN-alfa2	sIL-6Ralfa	IL-22	IL-34	gp130/sIL-6Rbeta	IL-27(p28)	Цитокины
2130 (1459,5-2230)	1039,3 (802,9-1097,8)	25,6 (17-30,1)	89,9 (59,4-106,3)	520,6 (319,7-583,9)	3301,9 (2499-3452,6)	1059,1 (800,1-1381,7)	576,5 (374,9-729)	107,8 (97,5-125,7)	Контроль белков
1586,7 (1376,6-2057,8)	1000,4 (748,1-1026,3)	26 (24,1-29)	91,1 (60,6-119)	508,5 (318,6-690,5)	3083,1 (2553,4-3309,7)	837,9 (677,4-1265,4)	548 (372,2-668,3)	112,8 (88,9-119,9)	АФП 10 МЕ/мл
1996,8 (1371-2118,9)	974,4 (731,9-1062,1)	25,2 (23,6-28,1)	81,1 (60,6-116,3)	588,7 (301,8-629,6)	3165,3 (2420,9-3350,3)	1138,4 (685,3-1337)	557,5 (391,1-664,6)	111,6 (88-116,5)	АФП 50 МЕ/мл
1763,9 (1376,7-1980,2)	997,1 (698,1-1060,5)	27,4 (23,9-29,1)	71,2 (59,4-126,1)	547,3 (336-569,2)	2891,8 (2411-3279,5)	901 (693,2-1113)	495,7 (424-606,4)	115,3 (91-122,7)	АФП 100 МЕ/мл
1786,1 (1321,5-2174,4)	1016,6 (688,4-1079,9)	24,8 (22,7-27,7)	83 (58,1-105,1)	535,2 (306,6-659,6)	3062,2 (2390,1-3255,4)	1056 (642,9-1290,9)	500,5 (406,3-675,3)	97,6 (80,3-117,1)	ГД 0,2 МКГ/мл
1564,5 (791,6-2318,9)	702,9* (583,9-1026,3)	26 (17,5-28)	69,9 (36,9-83,3)	426,2 (303,6-641,3)	2652,6 (2107,9-3323,4)	790,6 (556-1310)	548 (311,1-619,3)	102,8 (73,8-110,6)	ГД 2 МКГ/мл
1586,7 (1139,1-2113,4)	961,5* (635,3-1029,6)	28 (16,1-33,9)	62,5* (42,1-100,8)	475,7 (374,5-713,9)	3240,2 (2119,9-3362,9)	904,2 (759,7-1208,3)	526,6 (326,4-628,9)	107,2 (92,4-115,3)	ГД 10 МКГ/мл
1852,6 (1697,4-2091,1)	945,3 (777,1-1010,1)	26 (17,8-26,7)	80 (51,9-89,2)	467,3 (280,8-591,2)	3046,9 (2580,5-3163,6)	1179,6 (745,8-1325,9)	529 (363,1-619,4)	98,3 (85,3-106,8)	ХГЧ 10 МЕ/мл
1686,3 (1150,3-2096,7)	980,9 (706,1-1050,7)	25,6 (17,6-28,9)	77,4 (59,4-85,5)	496,3 (296,4-609,5)	3249,8 (2391,4-3287,4)	1246,4 (883,6-1332,3)	548 (351,3-638,4)	106,6 (82,5-115,6)	ХГЧ 100 МЕ/мл

IFN-beta	MMP-1	APRI L/TNF SF13	IL-11	IL-2	BAFF/TNFS F13B	IL-32	IL-35	IL-29/IFN -	IL-20	IL-19	IL-12 (p40)
17,1 (11,1-81,9)	722,7 (557,8-800,9)	9943,54 (4489,6-51115,5)	8,9 (4,6-15,2)	43217,6 (27551,7-71227,6)	53788,1 (27551,7-71227,6)	364,3 (249,4-491,9)	843,48 (426,4-978,4)	57,4 (40,4-132,7)	1065,7 (750,6-3385,4)	561,4 (280,6-731,5)	119,3 (78,5-325,1)
17,8 (11,3-88,3)	714 (540,5-761,8)	12941 (6070,7-72677,8)	8,1 (4,1-9,3)	43337,9 (28510,7-66053,6)	53266,5 (28510,7-66053,6)	360,3 (248,3-505,1)	862,48 (421,4-1015,2)	70,6 (58,3-89,3)	1062,6 (811,9-2226,4)	453,2 (215,3-576,5)	115,8 (91,2-195,7)
19,4 (12,1-92,7)	753,1 (560,1-785,6)	18165,6 (6105,1-84417,8)	7,3 (4,3-10,2)	44873,1 (26988,9-57068,5)	55337,3 (26988,9-57068,5)	466,6 (256,9-492,7)	861,01 (397,2-1043,3)	69,2 (56,49-98,1)	992,7 (799,9-2485,7)	415,2 (233,9-571,9)	114,8 (90,7-338,4)
17,6 (12-110,5)	727 (510,2-744,4)	11580,1 (6141,1-37381,8)	7 (4,3-9,7)	42169,2 (27265-59270,6)	50581,3 (27265-59270,6)	460,4 (245,1-478,7)	849,32 (395,1-946)	90,8 (56,2-147,1)	1086,7 (719,3-2478,6)	351,5* (218,7-490,7)	114,3 (104,8-345,8)
20,9 (11,4-82,5)	718,3 (534,1-757,4)	19469,1 (6566,7-70489,8)	9,5 (4,1-10,4)	43502,2 (27368,5-58757,4)	54702,2 (27368,5-58757,4)	433,5 (278,4-487,9)	950,43 (405,1-968,8)	78,6 (55,5-98,8)	1020,3 (787,4-2426,3)	408,2 (244,9-479,3)	112,8 (87,9-414,5)
21 (9,7-53,2)	588,1 (449,5-807,4)	20916,4 (2468,7-27116)	11,8 (3,7-30,8)	38552,1 (24024-71127,3)	50071,2 (24024-71127,3)	332,4 (191,4-483)	635,87 (349,6-1054,4)	61,6 (38,9-83,5)	1118,3 (521,1-2526,6)	439,4* (229,7-506,3)	126,8 (76,7-335,4)
20 (10,7-80,2)	761,8 (456-813,9)	10778,7 (3136,6-28410,3)	12,4 (3,6-51,6)	37119 (23845,3-72272,2)	46984,1 (23845,3-72272,2)	392,3 (149,8-493,2)	861,01 (359,6-995,3)	56,8 (41,1-100)	1097,9 (500,1-2602,9)	425,5 (217-587,5)	123,8 (72,5-277,6)
16,9 (12,1-61,8)	709,6 (512,3-757,4)	14689,8 (4029,-78479,1)	7,5 (4,8-10,7)	42096 (28059,4-56361,8)	50817,4 (28059,4-56361,8)	447,7 (298,5-480,4)	931,34 (417,2-1001,2)	55,5 (54,4-94,8)	887,6 (581,4-2622,6)	463,6 (244,1-550,9)	112,3 (83,9-336)
15,5 (11,8-65)	705,3 (521-805,2)	16337,7 (4558,4-103188,8)	6,5 (4,3-9,6)	43114,2 (27287,7-57024,2)	52215,6 (27287,7-57024,2)	456,2 (315,9-496,2)	913,73 (413,6-1062,5)	68,4 (57,1-85)	922,5 (532,7-2734,2)	491,5 (264,5-584,3)	122,8 (89,4-401,4)

sTNF-R2	IL-28A/IFN- γ	Osteocalcin	TWEAK/TNFSF12	IL-10	IL-8	sCD30/TNFSF8	TSLP	LIGHT/TNFSF14	Pentraxin-3	sCD163	MMP-3
1864,5 (1716,1-2425)	31,4 (17-38,4)	810,1 (571,2-871,3)	91,3 (49,8-124,8)	4384,3 (1329,6-4980,6)	19085,4 (18182,1-19566,5)	43888 (25043,6-72773,6)	10,7 (8,1-11,1)	208,7 (175,2-229,6)	122226,5 (93317,6-14004)	4240,4 (2335,1-8850,2)	2321,9 (1918,3-2420,3)
1866,3 (1718,7-2587,1)	27,8 (17,6-40,1)	780,7 (539,8-829,7)	84,3 (39,9-127,3)	4606,4 (1487,5-5306,3)	19146,2 (17043,1-19915)	42851,8 (26839,2-72064,1)	11 (8-11,9)	193,9 (179,5-213,7)	130964 (72641,1-14004)	3890,6 (2277,6-7958,9)	2288,7 (1863,8-2332,8)
1852,8 (1613,1-2375,2)	25,3 (18,7-41,2)	766,1 (551,9-800,3)	91,3 (36-125,2)	4582,9 (1556-5302,2)	18953,7 (16935,5-20116,9)	64105,8 (27296-72238,1)	10,3 (7,5-11,8)	202,8 (169,8-210,4)	120098 (65281,1-128846)	3320,3 (2358,3-6704,3)	2310,9 (1887,1-2420,3)
1810,2 (1631,7-2451,9)	25 (16,8-40,5)	766,1 (547-800,3)	80,9 (40,9-110,2)	4770,6 (2015,6-5039,4)	18743,7 (17663,4-19500,1)	45420,2 (31492-70944,8)	10,4 (7,6-15,3)	184,1 (174,9-224)	124234,3 (72023,6-14004)	3704,8 (2084,1-6985,6)	2243,9 (1838-2431)
1793,7 (1564,8-2069,6)	28,6 (16,9-40)	785,6 (512,9-815)	89,6 (36,2-117,4)	4763,1 (1571,9-5114,1)	18522,7 (17746,6-19642)	60783,9 (23340-73129,4)	10,3 (7,8-10,8)	189,4 (164,3-205,5)	121256,2 (68477,7-14004)	4278,9 (2180,3-6446,3)	2198,7 (1845,1-2310,9)
1734,8 (1513,7-1887,8)	28,1 (16,2-33,1)	756,3 (459,3-783,2)	48,5* (30,7-91,6)	3822,1 (958,2-5167,5)	19168,2 (17056,2-19422,6)	38268 (15588,6-71614,3)	10,8 (3-11,6)	179,8 (154-224,2)	120080,2 (62327,4-14004)	4560,1 (1962,8-11122,4)	2130 (1755,9-2288,2)
1790,4 (1616-1966,2)	22,5 (16,2-39,7)	775,9 (527,7-819,9)	58,9 (38,4-86,4)	4582,9 (913,9-5193,6)	18561,4 (15972,6-19622,7)	46704,5 (14250,3-72206,8)	10,4 (5,1-12,9)	248,2 (177-265,8)	107371,9 (63437,8-14004)	4050,4 (1950,4-10546)	2198,7 (1746-2371)
1895,9 (1674,9-2381,4)	28,1 (17,6-33,1)	707,4 (524,9-766,1)	126,6 (71,5-130,5)	4679,6 (1182,1-5318,1)	20045,3 (19925,1-20429,2)	63810,8 (16503,1-71586,4)	10,3 (7,7-11)	190,8 (167,6-204,4)	118618 (76273,2-126128)	3920,1 (1668,7-7238,1)	2243,9 (1906,9-2343,9)
1860,8 (1668,5-2302,1)	26,9 (18,1-36,6)	795,4 (571,3-834,6)	130,7 (79-139,2)	4490,4 (1141-5454,9)	19446,9 (18021,9-19862,7)	63712,6 (17506,1-73629,4)	10,7 (7,6-10,9)	201,9 (161,9-210,1)	117754,9 (84453,7-127914)	3810,4 (2242,2-8344,9)	2288,7 (1890,2-2365,9)

Osteopontin (OPN)	IL-12 (p70)	sTNF-R1	Chitinase 3-like 1
31410,8 (6785,4-39842)	9,3 (5,4-60,4)	7127,7 (2649,8-9523,6)	122789,6 (98298,4)
9803,4 (3378-35140,5)	9 (5,7-35,1)	6992,8 (2508,1-9322,7)	112936,7 (94662,8)
27628,3 (3396,5-41970,3)	7,9 (6,5-51,2)	8719 (2434,5-9380,8)	109052,8 (92030-235377,4)
10736,3 (2786,4-31982,5)	9,3 (5,6-55,2)	7383,2 (2664,3-8331,7)	116874,6 (96648,3)
32365 (2375,7-38928,7)	10,8 (7-43,3)	8535,3 (1924,5-9611,6)	116708,7 (105143,9)
4334,9 (2451,6-33691,6)	8,6 (5,8-29)	7600,1 (1714,9-10972,9)	88126 (77058,7)
4508,4 (2354,7-34026,5)	9,4 (6,7-33,5)	10098 (1782,8-11484,6)	125392,9 (74797,1)
30691,4 (5965,8-36362,9)	7,6 (6,3-42)	8875,1 (2195,7-9403,3)	119170,2 (96259,7)
29848,2 (6206,5-32794)	7,6 (5,6-39,7)	9108,1 (2429,3-9567,1)	112540,4 (82222,7)
			124235,6