

И.Э. Николаева, А.С. Гольдерова, В.Г. Иванова,
М.П. Кириллина, Т.И. Николаева

СОЗРЕВАНИЕ МОНОЦИТОВ В ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ ПО МОРФОЛОГИЧЕСКИМ ПРИЗНАКАМ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

DOI 10.25789/YMJ.2023.83.04

УДК 57.085.23; 616-006.66

Учитывая сложный процесс созревания дендритных клеток в условиях культивирования, а также имеющиеся данные морфологических характеристик при различных патологических состояниях, нам представляется интересным оценить особенности морфологии клеток у онкологических больных. Целью данного исследования явилась оценка морфологических особенностей процессов созревания дендритных клеток при раке молочной железы. У онкобольных в первые дни культивирования отмечается сниженный потенциал жизнеспособности клеток и процессов созревания по сравнению со здоровыми лицами, вероятно, связанная с цитотоксичностью проводимой на момент исследования химио- и лучевой терапии. Результаты анализа клеток в последние дни культивирования указывают, что процессы активации созревания моноцитов в дендритные клетки в условиях *in vitro* у онкобольных оказались существенно выше, чем у здоровых лиц.

Ключевые слова: культивирование, моноциты, дендритные клетки, морфология, рак молочной железы.

Given the complex maturation process of dendritic cells under culturing conditions, as well as the available data of morphological characteristics at various pathological conditions, we find it interesting to assess the features of cell morphology in oncological patients. The purpose of this study was to assess the morphological characteristics of the processes of maturation of dendritic cells in breast cancer. In cancer patients, the potential for cellular viability and maturation compared to healthy individuals is reduced in the early days of cultivation, probably due to the cytotoxicity of chemotherapy and radiation therapy at the time of the study. Cell analysis in the last days of cultivation indicates that the processes of activation of monocyte maturation in dendritic cells in *in vitro* were significantly higher in oncobols than in healthy individuals.

Keywords: cultivation, monocytes, dendritic cells, morphology, breast cancer.

Введение. Противораковые вакцины разработаны с целью индукции иммунного ответа против опухолевых антигенов. Несмотря на десятилетия исследований и разработок, только несколько противораковых вакцин были одобрены для использования человеком. Успех этих противораковых вакцин зависит от нескольких факторов, включая тип используемых антигенов, микроокружение опухоли, иммунный ландшафт опухоли и различные составы вакцин [5]. Дендритные клетки (ДК) являются основными антигенпрезентирующими клетками, которые процессируют и представляют антигены через молекулы главного комплекса гистосовместимости МНС I и II к врожденной и адаптивной иммунной системе [3, 6, 8, 11].

ДК можно выращивать (дифференцировать) в больших количествах в

специальных лабораторных условиях и их стали широко изучать на экспериментальных моделях. ДК редко встречаются среди лейкоцитов периферической крови (менее 1%) и обычно демонстрируют сложную фенотипическую и функциональную гетерогенность популяции. Описано несколько подтипов ДК с уникальными и специфическими функциями, морфологией и локализацией: 1) клетки Лангерганса; 2) миелоидные дендритные клетки; 3) дендритные клетки, полученные из моноцитов; 4) лимфоидные дендритные клетки; 5) плазмцитоподобные дендритные клетки.

Незрелые ДК имеют округлую и гладкую поверхность, тогда как зрелые ДК имеют шероховатую поверхность с множественными псевдоподиями. В незрелом состоянии ДК экспрессируют более низкие уровни костимулирующих молекул, таких как CD80, CD86, CD83 и МНС II, и секретируют более низкие уровни иммуностимулирующих цитокинов, таких как IL-12, IL-10 и TNF. Напротив, зрелые ДК экспрессируют высокие уровни костимулирующих молекул и иммуностимулирующих цитокинов, что указывает на то, что ДК находятся в фенотипически и функционально зрелом состоянии [4]. Незрелые ДК с низким уровнем активации и высокой фагоцитарной способностью

поглощают антигены и созревают, приобретая более активный фенотип. После созревания ДК образуют дендриты и быстро мигрируют в лимфатические узлы для усиления иммунного ответа [7].

Важным отличием свойств ДК новорожденных от ДК взрослых является более выраженное подавление митогенной активности в культурах с конкурентным влиянием обычных и модулированных ДК [2]. Под влиянием полисахарида Куреха незрелые дендритные клетки превращаются в зрелые дендритные клетки со сниженным захватом антигенов, но также высокой экспрессией ключевых поверхностных молекул МНС-II класса, CD40, CD80, CD86 и CD83, а также большей продукцией IL-12p70 и TNF-α [9].

Незрелые дендритные клетки при наблюдении отмечали достаточно крупные округлые клетки, практически без отростков. Ко времени созревания клетки приобретают характерную для дендритных отростчатую вытянутую форму. Указанные изменения до и после активации происходят аналогично и на дендритных клетках пациентов, и на дендритных клетках условно здоровых лиц. Результаты исследования основаны на том, что способность созревания дендритных клеток при заболевании остеомиелитом не на-

Медицинский ин-т Северо-Восточный федеральн. ун-т им. М.К. Аммосова: **НИКОЛАЕВА Ирина Эдуардовна** – н.с., medbiotech@s-vfu.ru, **ГОЛЬДЕРОВА Айтиалина Семеновна** – д.м.н., н.с., проф., **ИВАНОВА Виолетта Григорьевна** – студентка 6 курса, **НИКОЛАЕВА Татьяна Ивановна** – к.м.н. доцент; гл. врач Якутского республ. онкологич. диспансера; **КИРИЛЛИНА Мария Петровна** – к.б.н., в.н.с.-руковод. лаб. ЯНЦ КМП.

рушается. Способность дендритных клеток, выделенных из моноцитов периферической крови пациентов с хроническим остеомиелитом, вызванным *Staphylococcus aureus*, к созреванию под влиянием активаторов *in vitro* не нарушена [1].

В исследовании [10] было проведено сравнение созревания ДК из моноцитов больных циррозом печени и здоровых лиц. Более высокий выход ДК из моноцитов был обнаружен у пациентов с циррозом печени. Однако при фенотипировании CD14⁺ клеток не было существенной разницы между больными циррозом печени и здоровыми донорами в отношении выхода ДК из предшественников CD14⁺. В итоге исследования сделали вывод, что при использовании адекватных условий для созревания ДК и примирования Т-клеток ДК от пациентов с циррозом сохраняют такую же способность к активации, созреванию и презентации антигена, что и у здоровых доноров.

Созревание дендритных клеток представляет собой сложный гетерогенный процесс, который может придавать различные отличительные функциональные свойства. В исследованиях китайских ученых [12] проверяли влияние сурфактина на созревание дендритных клеток. Результаты исследования показали, что по сравнению с незрелыми ДК зрелые ДК образуют более длинные отростки. Сурфактин может индуцировать морфологическое, фенотипическое и функциональное созревание дендритных клеток и в этом процессе NF-κB был вовлеченным сигнальным путем.

Таким образом, учитывая сложный процесс созревания дендритных клеток в условиях культивирования, а также имеющиеся данные морфологи-

ческих характеристик при различных патологических состояниях нам представляется интересным оценить особенности морфологии клеток у онкологических больных.

Целью данного исследования являлась оценка морфологических особенностей процессов созревания дендритных клеток при раке молочной железы.

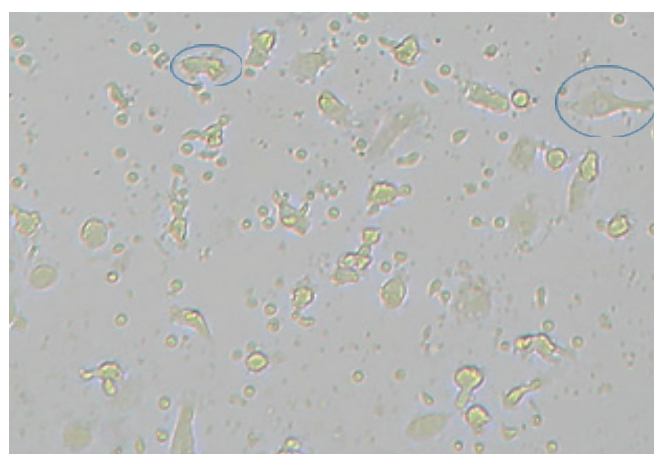
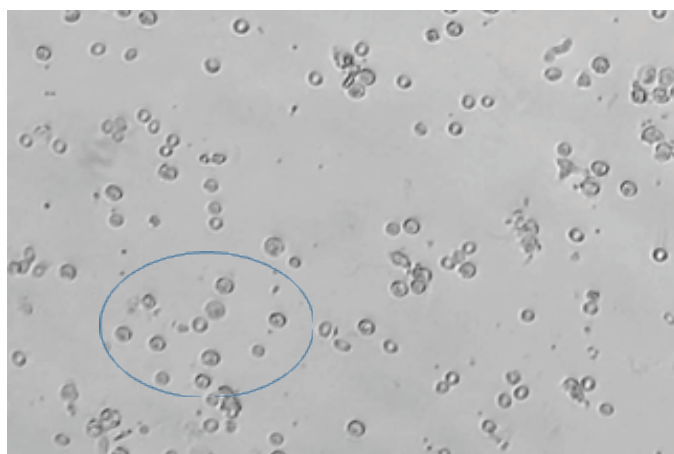
Материал и методы исследования. Исследования проводились на базе лаборатории медицинских биотехнологий Медицинского института СВФУ им. М.К. Аммосова. Венозная кровь 19 пациентов с верифицированным диагнозом рак молочной железы с информированного добровольного согласия была предоставлена в Якутский республиканский онкологический диспансер. Дендритные клетки были выделены из моноцитов венозной крови взрослых лиц. Контрольную группу составили 4 практически здоровых добровольца без воспалительных, аутоиммунных и онкологических заболеваний.

Все исследования проводились в стерильных условиях и ламинарном боксе. Забор венозной крови осуществляли стерильно в вакутейнеры, содержащие ЭДТА (Lab-Vac), объем венозной крови составлял около 18 мл (2 пробирки по 9 мл) и разбавлен равным объемом питательной среды RPMI-1640 («Биолот», Россия). Мононуклеарные клетки выделяли стандартным методом, путем центрифугирования в градиенте плотности Ficoll (ООО «ПанЭко») 1500 об/мин в течение 40 мин, и 2 раза отмывали центрифугируя при 1000 об/мин на 10 мин. Для адгезии моноцитов на дно культуральных флаконов объемом 75 см² суспензию мононуклеарных клеток предварительно инкубировали на 1,5

ч в условиях 5% CO₂ при 37°C. Неприкрепившиеся клетки (лимфоциты) отмывали неполной средой RPMI (ООО «Биолот», Россия). Далее к прикрепившимся моноцитам добавляли полную культуральную среду RPMI (ООО «Биолот», Россия) 10 мл с 20%-ным содержанием FBS500SA (ООО «Диам»), также ростовые факторы и факторы дифференцировки – GM-CSF (40 мкл) и IL-4 (40 мкл), которые вносили на 1-й, 3-й и 5-й дни культивирования.

Были сделаны фотографии полей зрения с нативными (неокрашенными) клетками в культивируемых флаконах под инвертированным микроскопом (АО «ЛОМО», Россия) с увеличением x10 и x40 на 2-е и 7-е дни культивирования. Для подсчета были выбраны четкие изображения с равномерным распределением клеток по всему полю зрения микроскопа. Исходная концентрация клеток в исследуемой суспензии в день посадки во флаконы была в пределах 1-1,5 млн клеток в мл. Всего для анализа были отобраны 16 полей зрения 4 здоровых лиц (по 4 поля зрения) и 76 полей зрения 19 онкобольных (по 4 поля зрения). Дифференцировка анализируемых клеток была произведена по морфологической форме на два вида: 1 – «круглые клетки», т.е. округлой формы без отростков (незрелые), и 2 – «вытянутые клетки», т.е. клетки вытянутой формы и клетки с отростками (созревающие) (рисунок).

Статистический анализ проведен с использованием пакета программы IBM SPSS Statistics 19.0. Для выявления соответствия данных нормальному закону распределения использовали тест Колмогорова-Смирнова. Равенство выборочных средних проверяли по параметрическому t-критерию Стьюдента (в случае нормального



Изображения клеток под инвертированным микроскопом (объектив × 40): 2-й день культивирования (слева) – преобладают клетки круглой формы, 7-й день (справа) – клетки вытянутой формы (примеры клеток выделены овалом)

Соотношение количества посчитанных клеток в динамике, (Me , $Q1; Q3$)

День культивирования	Клетки	Контрольная группа (в 16 полях зрения)	Группа онкобольных (в 76 полях зрения)	p...
2-й	«Круглые» / незрелые	113,00 (74,75; 138,00)	89,00 (42,00; 126,00)	0,184
	«Вытянутые» / созревающие	27,00 (18,25; 46,75)	18,00 (13,00; 27,00)	0,024
7-й	«Круглые» / незрелые	69,00 (47,50; 87,5)	12,00 (6,00; 25,75)	0,000
	«Вытянутые» / созревающие	27,50 (22,25; 35,00)	18,00 (9,75; 25,00)	0,001

распределения) и непараметрическому U-критерию Манна-Уитни для независимых выборок (при отклонении от нормального распределения). Для оценки наличия или отсутствия связи между двумя категориальными переменными использовали критерий χ^2 . Данные представлены в таблице в виде Me (медиана), $Q1$ и $Q3$ (квартили 25 и 75%). Результаты считались статистически значимыми при величинах достигнутого уровня значимости $p < 0,05$. Исследование проводилось в полном соответствии с этическими рекомендациями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации и Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан (1993 г.).

Результаты и обсуждение. Сравнительный анализ данных показал, что количество круглых клеток на 2-й день культивирования между сравниваемыми группами не выявил статистически значимых различий, хотя медиана круглых клеток у контрольной группы оказалась в 1,31 раза больше, чем у онкобольных (таблица). Тем не менее нами выявлено на 2-й день культивирования существенное различие в количестве вытянутых клеток, так, в группе онкобольных их количество оказалось значительно ниже ($p=0,024$), чем в контрольной группе. Процент вытянутых клеток в группе здоровых лиц составил 19,28, а в группе онкобольных – 16,82%. На второй день культивирования морфологическая характеристика клеток по степени изменения формы моноцитов в вытянутую группу у онкобольных имеет тенденцию к снижению ($\chi^2 = 51,56$; $p=0,056$) по сравнению с контрольной группой. Таким образом, в первые дни культивирования процесс созревания в некоторой степени замедлен у онкологических больных.

Анализ полученных данных подсчета клеток на 7-й день культивирования указывает, что общее количество клеток у онкобольных уменьшилось по сравнению со 2-м днем культивирования

в 3,56 раза, тогда как у контрольной группы – в 1,45 раза. Такой существенный процент потери, т.е. низкая жизнеспособность клеток онкобольных к условиям культивирования, возможно, связана с цитотоксичным влиянием химиотерапии и лучевой терапии, которую получали на момент исследования пациентки с раком молочной железы.

Сравнительный анализ данных на 7-й день культивирования показал, что количество круглых и вытянутых клеток статистически значимо ниже оказалось у онкобольных ($p=0,000$ и $p=0,001$ соответственно). Тем не менее следует отметить, что доля вытянутых по форме клеток у онкобольных составила 45,85%, что в 1,56 раза больше, чем у контрольной группы (29,32%), при этом соотношение круглых и вытянутых клеток имело статистически значимое различие ($\chi^2 = 82,14$; $p=0,010$) и доля вытянутых клеток значимо больше у онкобольных. Таким образом, в последние дни культивирования несмотря на значимо низкое содержание клеток, процессы активации созревания моноцитов в дендритные клетки в условиях *in vitro* у онкобольных оказались выше, чем у здоровых лиц.

Заключение. Таким образом, полученные нами данные морфологического анализа указывают, что степень созревания дендритных клеток из моноцитов периферической крови в условиях культивирования у больных раком молочной железы и здоровых лиц имеет существенное различие. У онкобольных в первые дни культивирования отмечается сниженный потенциал жизнеспособности клеток и процессов созревания по сравнению со здоровыми лицами, что, вероятно, связано с цитотоксичностью проводимой на момент исследования химио- и лучевой терапии. Результаты анализа клеток в последние дни культивирования указывают, что процессы активации созревания моноцитов в дендритные

клетки в условиях *in vitro* у онкобольных оказались существенно выше, чем у здоровых лиц. Полученные нами данные требуют дальнейшего, более углубленного изучения с целью поиска путей повышения эффективности применения аутологических дендритноклеточных онковакцин для пациентов с раком молочной железы.

Работа выполняется в рамках федерального проекта «Развитие человеческого капитала в интересах регионов, отраслей и сектора исследований и разработок» Национального проекта «Наука и университеты», шифр тематики FSRG-2022-0009 «Разработка и испытание новых биомедицинских клеточных продуктов, композиционных медицинских изделий».

Литература

1. Созревание *in vitro* дендритных клеток здоровых лиц и пациентов с хроническим остеомиелитом, вызванным *Staphylococcus aureus* / Ю. П. Рубцова, Д. Я. Алейник, О. П. Живцов [и др.] // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1. С. 87–94.
2. *In vitro* dendritic cell maturation isolated from healthy people and patients with *Staphylococcus aureus* caused chronic osteomyelitis / J.P. Rubtsova, D.Ya. Aleynik, O.P. Zhivtsov [et al.] // Infection and immunity. 2019. Vol. 9. No. 1. P. 87–94. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-87-94
3. Толерогенные дендритные клетки созревание и функции в экспериментах *in vitro* / М.Э. Цатуров, В.Ю. Талаев, А.В. Матвейчев [и др.] // Медицинский альманах. 2010. № 2. С. 263–266.
4. Tolerant dendritic cells maturation and functions in *in vitro* experiments / M.E. Tsaturov, V.Y. Talaev, A.V. Matveichev [et al.] // Medical almanac. 2010. No. 2. P. 263–266.
5. Banchemreau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y.J., Pulendran B., Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. Annu. Rev. Immunol. 2000. No 18. P. 767–811.
6. Dudek A.M., Martin S., Garg A.D., Agostinis P. Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity. Frontiers in immunology. 2013. No 4. P. 438.
7. Grimmett E., Al-Share B., Basem Alkassab M [et al.] // Cancer vaccines: past, present and future; a review article. Discover Oncology. 2022. Volume 13. Article number: 31 https://doi.org/10.1007/s12672-022-00491-4
8. Liu K, Nussenzweig MC. Origin and development of dendritic cells. Immunol Rev. 2010 Mar;234(1):45–54. doi: 10.1111/j.0105-2896.2009.00879.x. PMID: 20193011.
9. Kim M.K, Kim J. Properties of immature and mature dendritic cells: phenotype, morphology, phagocytosis, and migration. RSC Adv. 2019 Apr 10;9(20):11230–11238. doi: 10.1039/c9ra00818g. PMID: 35520256; PMCID: PMC69063012.
10. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol. 1991;9:271–96. doi: 10.1146/annurev.iy.09.040191.001415. PMID: 1910679.
11. Tan Y., Meng Y., Wang Z., Shan F., Wang Q., Zhang N. Maturation of morphology, phenotype and functions of murine bone marrow-derived dendritic cells (DCs) induced by polysac-

charide Kureha (PSK). Hum Vaccin Immunother. 2012 Dec 1; 8(12): 1808–1816

10. Tanoue S, Chang LY, Li Y, Kaplan DE. Monocyte-derived dendritic cells from cirrhotic patients retain similar capacity for maturation/activation and antigen presentation as those from healthy

subjects. Cell Immunol. 2015 May;295(1):36–45. doi: 10.1016/j.cellimm.2015.02.008. Epub 2015 Feb 25. PMID: 25734547; PMCID: PMC4405471

11. Wculek S.K, Cueto F.J, Mujal A.M, Melero I, Krummel M.F, Sancho D. Dendritic cells in cancer immunology and immuno-

therapy. Nat Rev Immunol. 2020;20(1):7–24

12. Xu W, Liu H, Wang X, Yang Q. Surfactin Induces Maturation of Dendritic Cells in vitro. Biosci Rep. 2016 Oct 6;36(5):e00387. doi: 10.1042/BSR20160204. PMID: 27534429; PMCID: PMC5052710.

С.А. Федорова, С.А. Попова, М.Л. Мордосова,
М.И. Старостина

ДЛИНА ПОКОЛЕНИЯ В ЯКУТСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ В XVIII-XIX ВВ.

DOI 10.25789/YMJ.2023.83.05

УДК 613.31:616-018

Впервые определена длина поколения у саха (якутов) в XVIII-XIX вв. на основании анализа генеалогических данных 712 семей из Намского, Верхнеколымского, Среднеколымского, Нижнеколымского и Эльгетского улусов. Длина мужского поколения у якутов составила в среднем 35,7 года, женского - 30,5 года, что намного выше усредненных общепопуляционных значений, использованных ранее в генетических исследованиях при расчете времени генетической дивергенции по Y-хромосоме (31-32 года) и мтДНК (25-28 лет).

Ключевые слова: длина поколения, якуты, популяция.

The intergenerational time interval in the Sakha people (Yakuts) was determined for the first time by an analysis of genealogical data of 712 families from Namsky, Verkhnekolymsky, Srednekolymsky, Nizhnekolymsky and Elgetsky districts recorded in the 18th – 19th centuries. The male generation interval in the Yakuts averaged 35.7 years, the female generation interval was 30.5 years, which is much higher than the mean general intervals used earlier in population-genetic studies for calculating the time of genetic divergence by the Y chromosome (31-32 years) and mtDNA (25-28 years).

Keywords: generation length, Yakuts, population.

Введение. Длина поколения (generation interval) является важнейшим параметром при вычислении скорости мутирования микросателлитных повторов в Y-хромосоме и аутосомных локусах, в митохондриальной ДНК, а также при расчете времени генетической дивергенции. В ранних генетических исследованиях чаще всего использовались значения длины поколения 25 и 30 лет для Y-хромосомы, наследуемой по отцовской линии, 20 лет для мтДНК, передающейся по материнской линии, 20 и 25 лет для аутосом [15]. В частности, в основополагающей работе Л.А. Животовского при оценке скорости возникновения мутаций в STR-локусах Y-хромосомы в популяциях с документированной историей - у маори Новой Зеландии и цыган Болгарии, было принято значение длины мужского поколения, в среднем равное 25 годам [19]. Это значение было использовано многими авторами для расчета времени возникновения наименее древнего общего предка по

мужской линии (time of the most recent common ancestor) при реконструкции генетической истории различных этносов [1,10-12,14]. Позднее более обоснованной для мужских поколений стала считаться оценка около 30 лет, а для женских – 25–28 лет [1,15]. Лишь в одной работе по изучению генетической истории иберийской популяции, по данным Y-хромосомы, длина поколения была принята равной 35 годам [16].

Тем не менее следует учитывать разницу в брачных традициях и демографических параметрах у различных народов (возраст вступления в брак, уровень смертности у взрослых), которые могут сильно влиять на значения межпоколенного интервала. С целью уточнения значения данного показателя для якутской популяции мы провели определение длин мужских и женских поколений по генеалогическим данным якутов XVIII-XIX вв.

Материалы и методы исследования. Длины поколений были рассчитаны прямым методом по генеалогиям центральных и северных саха, восстановленных по ревизским сказкам от 1768, 1795, 1816, 1858 гг., церковным метрическим книгам за период с 1768 по 1918 гг. и материалам переписи 1917 г. [6-9]. В выборку были включены генеалогические данные 120 семей Модутского наслега [8, Табл. 1-14] и 64

семей Хатырыкского наслега [9, Табл. 1-2] Намского улуса, 58 семей I Байдунского наслега [6, Табл. 88-93] и 96 семей IV Мятюжского наслега [6, Табл. 94-101] Верхнеколымского улуса, 187 семей II Байдунского наслега [6, Табл. 1-12] и 90 семей I Кангаласского наслега [6, Табл. 14-22] Среднеколымского улуса, 55 семей I Мятюжского наслега Нижнеколымского улуса [6, Табл. 102-104], 42 семей индигирских якутов Эльгетского* улуса [7, табл. 2, 4]. (*Эльгетский улус был основан позднее 1770 г., занимал огромную территорию в бассейне верхней, средней и нижней Индигирки. С 1930-х гг. большая часть территории Эльгетского улуса относится к современным Абыйскому и Момскому улусам, а меньшая — Аллаховскому улусу. Название Эльгетского улуса на сегодняшний день почти забыто).

Интервал мужского поколения I_m (отец-дети), представляющий интерес для изучения Y-хромосомы, рассчитывается как средний возраст отца при рождении всех детей. Длина женского поколения I_f (мать-дети), используемая при изучении мтДНК, определяется как средний возраст матери при рождении всех детей. Для популяции в целом длина поколения в заданный временной период равна средневзвешенным величинам общих поколенческих интервалов для входящих в нее

Ин-т естествен. наук Северо-Восточного федеральн. ун-та им. М.К. Аммосова: **ФЕДОРОВА Сардана Аркадьевна** – д.б.н., гл.н.с.; с.н.с. ЯНЦ КМП, sardana.fedorova@mail.ru, **ПОПОВА Сарыалла** – студентка, **МОРДОСОВА Мария** – студентка; **СТАРОСТИНА Мария Ивановна** – к.ист.н. Ин-т психологии СВФУ.