

## **ЭКСПАНСИЯ МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С АНКИЛОЗИРУЮЩИМ СПОНДИЛИТОМ**

**Моренкова А.Ю., Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Баторов Е.В.,  
Сизиков А.Э., Чумасова О.А., Сулутьян А.Э., Останин А.А.,  
Черных Е.Р.**

*ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,  
г. Новосибирск, Россия*

**Резюме.** Экспансия миелоидных супрессорных клеток (МС) вследствие нарушения дифференцировки миелоидных предшественников в условиях воспаления описана при ряде аутоиммунных заболеваний, включая ревматоидный артрит, системную красную волчанку и сахарный диабет 1-го типа. Учитывая, что при анкилозирующем спондилите (АС) повышенная концентрация провоспалительных медиаторов может также вызывать нарушения миелопоэза, изучение роли МС при данной патологии представляется актуальной задачей. Целью настоящей работы явилось исследование количественного содержания субпопуляций МС у больных с различными клиническими фенотипами и активностью АС. В исследование были рекрутированы 37 пациентов, включая 10 больных, не имеющих поражения периферического скелета (центральная форма) и 27 пациентов с одновременным поражением позвоночника и периферических суставов (периферическая форма). Контрольную группу составили 32 сопоставимых по полу и возрасту донора. Оценку гранулоцитарных (Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD33<sup>+</sup>CD66b<sup>+</sup>; Г-МС), моноцитарных (CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low/-</sup>; М-МС) и МС ранних стадий дифференцировки (Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD33<sup>+</sup>CD66b<sup>-</sup>; Р-МС) проводили методом проточной цитометрии с использованием соответствующих антител (BD Biosciences, США) в популяции моноклеарных клеток периферической крови методом проточной цитофлуориметрии. В целом по группе: пациенты с АС характеризовались повышенным относительным и абсолютным количеством М-МС ( $p = 0,00002$  и  $p = 0,00003$  соответственно) и Г-МС ( $p = 0,0002$  и  $p = 0,0006$  соответственно). Пол пациентов, возраст и экспрессия HLA-B27 не оказывали значимого влияния на содержание этих клеток в периферической крови. Увеличение медианных значений М-МС выявлялось как у пациентов с центральной (Me 5,0 (3,2-6,3) против 2,4 (1,7-3,5) %;  $p = 0,001$ ), так и периферической формой (Me 5,0 (3,0-7,0) против 2,4 (1,7-3,5) %;  $p = 0,0002$ ) АС. В то же время экспансия Г-МС наблюдалась только у пациентов с вовлечением периферических суставов (Me 0,16 (0,07-0,3) % против 0,05 (0,04-0,09) %;  $p = 0,0001$ ). Относительное содержание Р-МС, М-МС и Г-МС при центральной форме АС находилось в прямой корреляционной зависимости с активностью заболевания ( $R = 0,58$ ,  $p = 0,02$ ;  $R = 0,73$ ,  $p = 0,08$  и  $R = 0,65$ ,  $p = 0,04$  соответственно). При периферической форме АС такой взаимосвязи не прослеживалось. Полученные данные свидетельствуют о причастности МС к патогенезу и фенотипической

### **Адрес для переписки:**

Моренкова Анастасия Юрьевна  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
фундаментальной и клинической иммунологии»  
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.  
Тел.: 8 (383) 236-03-29.  
Факс: 8 (383) 222-70-28.  
E-mail: anastasia.inozemceva@gmail.com

### **Address for correspondence:**

Morenkova Anastasia Yu.  
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology  
630099, Russian Federation, Novosibirsk,  
Yadrintsevskaya str., 14.  
Phone: 7 (383) 236-03-29.  
Fax: 7 (383) 222-70-28.  
E-mail: anastasia.inozemceva@gmail.com

### **Образец цитирования:**

А.Ю. Моренкова, М.А. Тихонова, Т.В. Тыринова,  
Е.В. Баторов, А.Э. Сизиков, О.А. Чумасова,  
А.Э. Сулутьян, А.А. Останин, Е.Р. Черных «Экспансия  
миелоидных супрессорных клеток в периферической  
крови пациентов с анкилозирующим спондилитом» //  
Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 2. С. 327-338.  
doi: 10.15789/1563-0625-EOM-2143  
© Моренкова А.Ю. и соавт., 2021

### **For citation:**

A. Yu. Morenkova, M. A. Tikhonova, T. V. Tyrinova,  
E. V. Batorov, A. E. Sizikov, O. A. Chumasova, A. E. Sulutyan,  
A. A. Ostanin, E. R. Chernykh "Expansion of myeloid-  
derived suppressor cells in the peripheral blood of patients  
with ankylosing spondylitis", Medical Immunology (Russia)/  
Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 2,  
pp. 327-338. doi: 10.15789/1563-0625-EOM-2143  
DOI: 10.15789/1563-0625-EOM-2143

разнородности АС. При этом обнаруженная прямая корреляционная связь между содержанием МС и активностью заболевания позволяет предполагать снижение супрессорной активности и/или появление провоспалительной активности у МС, что требует дальнейших исследований.

*Ключевые слова:* миелоидные супрессорные клетки ранних стадий дифференцировки, моноцитарные миелоидные супрессорные клетки, гранулоцитарные миелоидные супрессорные клетки, воспаление, аутоиммунные заболевания, анкилозирующий спондилит

## EXPANSION OF MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS IN THE PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS

Morenkova A.Yu., Tikhonova M.A., Tyrinova T.V., Batorov E.V., Sizikov A.E., Chumasova O.A., Sulutyan A.E., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

*Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation*

**Abstract.** Expansion of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) due to impaired differentiation of myeloid progenitor cells under conditions of inflammation was described in a number of autoimmune diseases, including rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, and type 1 diabetes mellitus. Studying the role of MDSCs in ankylosing spondylitis is an important issue, given that increased concentration of pro-inflammatory mediators in this pathology can also cause myelopoiesis disorders. The aim of present work was to study the quantitative content of MDSC subpopulations in patients with different clinical phenotypes and activity of AS. 37 patients, including 10 patients without peripheral skeletal lesions (axial form) and 27 patients with simultaneous lesions of spine and peripheral joints (peripheral form) were recruited into the study. The control group consisted of 32 age/sex-related healthy donors. Evaluation of granulocytic ( $Lin^-HLA-DR^+CD33^+CD66b^+$ ; G-MDSC), monocytic ( $CD14^+HLA-DR^{low/-}$ ; M-MDSC) and early-stage MDSCs ( $Lin^-HLA-DR^+CD33^+CD66b^-$ ; E-MDSC) was performed using corresponding antibodies (BD Biosciences, USA) in the population of peripheral blood mononuclear cells by flow cytometry. In general, the AS patients were characterized by an increased relative and absolute amount of M-MDSC ( $p = 0.00002$  and  $p = 0.00003$ , respectively) and G-MDSC ( $p = 0.0002$  and  $p = 0.0006$ , respectively). Patient gender, age, and HLA-B27 expression did not significantly affect the content of these cells in peripheral blood. An increase in the median values of M-MDSC was detected both in patients with axial (Me 5.0 (3.2-6.3) versus 2.4 (1.7-3.5) %;  $p = 0.001$ ) and peripheral form (Me 5.0 (3.0-7.0) versus 2.4 (1.7-3.5) %;  $p = 0.0002$ ) AS. At the same time, the G-MDSC expansion was observed only in patients with involvement of peripheral joints (Me 0.16 (0.07-0.3) % versus 0.05 (0.04-0.09) %;  $p = 0.0001$ ). The relative contents of E-MDSC, M-MDSC and G-MDSC in the axial form of AS was in direct correlation with the activity of the disease ( $R = 0.58$ ,  $p = 0.02$ ;  $R = 0.73$ ,  $p = 0.08$  and  $R = 0.65$ ,  $p = 0.04$ , respectively). This relationship was not observed in peripheral form of AS. The data obtained suggest a potential involvement of MDSCs in pathogenesis and phenotypic heterogeneity of AS. Simultaneously, the revealed direct correlation between the MDSC contents and the disease activity suggests a decrease in suppressive activity and/or appearance of pro-inflammatory activity in MDSC, thus requiring further research in the field.

*Keywords:* early-stage myeloid-derived suppressor cells, monocytic myeloid-derived suppressor cells, granulocytic myeloid-derived suppressor cells, inflammation, autoimmune diseases, ankylosing spondylitis

### Введение

Миелоидные супрессорные клетки (МС) представляют гетерогенную популяцию незрелых клеток миелоидного происхождения, способных подавлять реакции врожденного и при-

обретенного иммунитета [9]. По мнению ряда исследователей, МС генерируются в костном мозге из незрелых миелоидных клеток, которые при физиологических условиях быстро дифференцируются в зрелые гранулоциты, макрофаги или дендритные клетки, тогда как при патоло-

гии блокирование дифференцировки миелоидных предшественников приводит к накоплению МС [3]. У человека популяция МС включает гранулоцитарные (полиморфноядерные), моноцитарные и ранние МС (Г-МС, М-МС и Р-МС соответственно), которые различаются по морфологическим признакам, экспрессии мембранных маркеров и механизмам супрессорной активности [9]. Так, для М-МС более характерна продукция активных форм азота, нарушающих активацию IL-2-R-опосредованных сигнальных путей, и иммуносупрессорного цитокина TGF- $\beta$ . В свою очередь, Г-МС высоко экспрессируют аргиназу-1, снижающую в микроокружении концентрацию аргинина и L-цистеина, необходимых для функционирования Т-лимфоцитов, и являются активными продуцентами активных форм кислорода, ингибирующих синтез  $\zeta$ -цепи Т-клеточного рецептора.

Впервые возрастание субпопуляций МС было зарегистрировано при опухолевом росте. Исследования в этом направлении выявили важную роль МС в развитии иммуносупрессии и опухолевой прогрессии [8]. Позже экспансия МС была выявлена и при других заболеваниях неопухолевой природы, сопровождающихся воспалением, в частности при аутоиммунной патологии. Так, возрастание численности МС было продемонстрировано в моделях коллаген-индуцированного артрита у мышей [15], а также при ревматоидном артрите [5], системной красной волчанке [13], сахарном диабете 1-го типа у человека [12]. Характерно, что данные о функциональной активности МС при указанных патологиях оказались весьма неоднозначны, включая сообщения о сохранной супрессорной активности МС [5], снижении этой функции [12] или ее полном отсутствии [15]. Более того, согласно ряду исследований МС обладали провоспалительной активностью, и их количество прямо коррелировало с активностью аутоиммунного процесса [12].

Анкилозирующий спондилит (АС) среди аутоиммунных заболеваний занимает особое место в связи с выраженным аутовоспалительным компонентом. Это хроническое иммуноопосредованное заболевание, поражающее осевой скелет (и реже суставы), патогенез которого тесно связан с активацией оси IL-23/IL-17 [11]. Исследования в экспериментальных моделях ревматоидного артрита у мышей выявили способность МС индуцировать поляризацию Th17 и при адоптивном переносе усиливать прогрессию заболевания [15]. Кроме того, пул МС может являться источником макрофагов и дендритных клеток [10], которые через продукцию IL-23 способны активировать Th17 лимфоциты. Тем не менее содержание раз-

личных субпопуляций МС и их патогенетическая значимость при АС, остаются практически неисследованными.

Учитывая вышесказанное, **целью настоящей работы** явилось исследование количественного содержания субпопуляций МС у больных с различными клиническими вариантами и активностью АС.

## Материалы и методы

В исследование были включены 37 пациентов с АС (23 мужчины и 14 женщин в возрасте от 19 до 59 лет) и 32 сопоставимых по полу и возрасту здоровых донора (21 мужчина и 11 женщин в возрасте от 21 до 64 лет). Диагностика АС проводилась в соответствии с модифицированными Нью-Йоркскими критериями 1984 года.

Мононуклеарные клетки (МНК) из периферической крови выделяли стандартно методом центрифугирования цельной гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколла-верографина ( $\rho = 1,078$ ). Лизис эритроцитов по необходимости проводили раствором BD Pharm LyseTM в соответствии с инструкцией производителя (BD Biosciences, США). Относительное содержание гранулоцитарных МС (Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD33<sup>+</sup>CD66b<sup>+</sup>), моноцитарных МС (CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low/-</sup>) и МС ранних стадий дифференцировки (Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD33<sup>+</sup>CD66b<sup>-</sup>) оценивали методом проточной цитометрии с использованием анти-Lineage Cocktail 1 (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56; FITC, BD Biosciences), анти-CD14 (FITC, BD Biosciences), анти-CD33 (PE-Cy 5, BD Biosciences, США), анти-CD66b (APC, BioLegend, США), анти-HLA-DR (FITC, Сорбент, Россия; PE, PerCP/Cy 5.5, BD Biosciences) моноклональных антител. Оценку МС проводили по общепринятой методике в соответствии с рекомендациями Bronte и соавт. [1] с использованием параметров прямого и бокового светорассеяния, при этом в область гейтирования включали регион МНК (лимфоциты и моноциты). При оценке Р-МС и Г-МС стратегия гейтирования включала последовательные этапы выделения: а) региона МНК (по прямому и боковому светорассеянию), б) из МНК – гейта клеток, не несущих линейные маркеры (Lin<sup>-</sup>), в) из области (Lin<sup>-</sup>) клеток гейта CD33<sup>+</sup> клеток (по характеристикам бокового светорассеяния и экспрессии CD33), г) из гейта CD33<sup>+</sup> клеток – области HLA-DR<sup>-</sup>CD66b<sup>-</sup> клеток (Р-МС) и HLA-DR<sup>-</sup>CD66b<sup>+</sup> клеток (Г-МС). Для анализа количества М-МС в регионе МНК изучали популяцию CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low/-</sup> клеток.

Анализ проводили после накопления не менее 100 000 событий в регионе Lin<sup>-</sup> клеток, или – при оценке субпопуляции М-МС – не менее 50 000

событий в регионе CD14<sup>+</sup> клеток. Относительное содержание субпопуляций МС представлено в виде процента от общего количества МНК. Абсолютное количество МС рассчитывали исходя из данных общего анализа крови по формуле:

$[(\text{лимфоциты [кл/мкл]} + \text{моноциты [кл/мкл]}) \times \% \text{ субпопуляции МС}] / 100\%$ .

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0. Данные представлены в виде медианных значений (Me) и квартиль-

ного диапазона ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ) %. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический критерий: U-критерий Манна–Уитни. Корреляционный анализ проводили с помощью ранговой корреляции Спирмена (Rs). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты

Основные характеристики больных, включенных в исследование, представлены в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ

TABLE 1. BASELINE CHARACTERISTICS OF PATIENTS

Параметры Parameters	Общая группа Total group	Центральная форма АС Axial AS (1)	Периферическая форма АС Peripheral AS (2)	p* (1-2)
Количество (n) Number (n)	37	10	27	
Пол (муж/жен), % Sex (male/female), %	62/38	80/20	56/44	0,3
Возраст (лет), Me (min-max) Age (years), Me (min-max)	40 (19-59)	37,5 (23-59)	41 (19-59)	0,7
Длительность заболевания (лет), Me (min-max) Disease duration (years), Me (min-max)	12 (1-33)	18 (1-33)	11 (1-31)	0,5
Стадии (развернутая/поздняя), % Stages (advanced/late), %	59,5/40,5	60/40	59,3/40,7	1,0
HLA-B27 (+/-), %	70,3/29,7	90/10	63/37	0,22
ASDAS-СОЭ, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ) ASDAS-ESR, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )	2,7 (1,9-3,8)	2,0 (1,8-3,5)	2,95 (2,0-4,2)	0,3
ASDAS-СРБ, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ) ASDAS-CRP, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )	2,8 (1,9-3,8)	1,95 (1,8-3,3)	2,8 (1,9-4,0)	0,2
BASDAI, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )	3,9 (2,3-5,9)	2,75 (2,0-4,5)	4,3 (2,3-6,2)	0,1
BASFI, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )	3,6 (1,5-5,9)	2,95 (1,4-4,5)	3,8 (1,5-6,3)	0,4
Увеит (+/-), % Uveitis (+/-), %	40,5/59,5	20/80	48,2/51,8	0,2
Терапия: 1-я линия**/2-я линия***, % Therapy: 1 <sup>st</sup> line**/2 <sup>nd</sup> line***, %	59,5/40,5	40/60	66,7/33,3	0,3

Примечание. \* p – достоверность различий между подгруппами больных; \*\* – нестероидные противовоспалительные препараты +/- синтетические базисные противовоспалительные препараты; \*\*\* – нестероидные противовоспалительные препараты + генно-инженерные биологические препараты +/- синтетические базисные противовоспалительные препараты.

Note. \* p, significance of differences between subgroups of patients; \*\*, non-steroidal anti-inflammatory drugs +/- conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drugs; \*\*\*, non-steroidal anti-inflammatory drugs + biologic disease-modifying antirheumatic drugs +/- conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drugs.

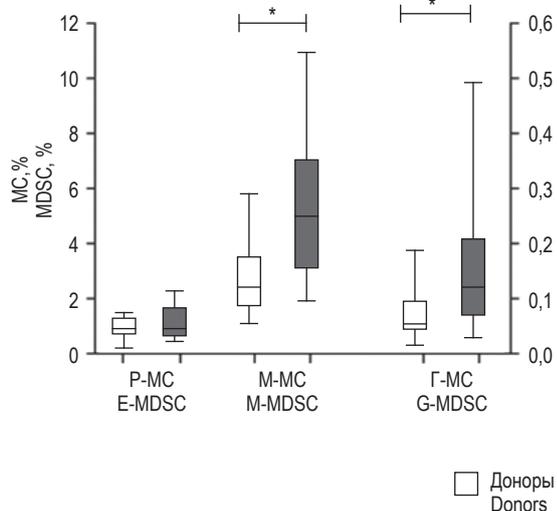
Как видно, группа больных АС состояла из 10 пациентов, не имеющих поражения периферического скелета (центральная форма), и 27 больных с одновременным поражением позвоночника и периферических суставов (периферическая форма). Пациенты указанных подгрупп не отличались по полу, возрасту, длительности заболевания, стадии, доле HLA-B27-позитивных случаев, частоте встречаемости увеита, активности заболевания и функциональным нарушениям. Значимых различий в проводимой терапии между группами также не выявлялось. Тем не менее отмечалась тенденция к более частому назначению генно-инженерной биологической терапии (ГИБТ) в группе больных с центральной формой и более частому назначению базисных противовоспалительных препаратов (метотрексат, сульфасалазин) у больных периферической формой.

Исследование субпопуляций МС (рис. 1А) выявило 2-кратное увеличение относительного количества гранулоцитарных и моноцитарных МС у больных АС при отсутствии изменений Р-МС по сравнению со здоровыми донорами. Учитывая более высокое абсолютное количество МНК

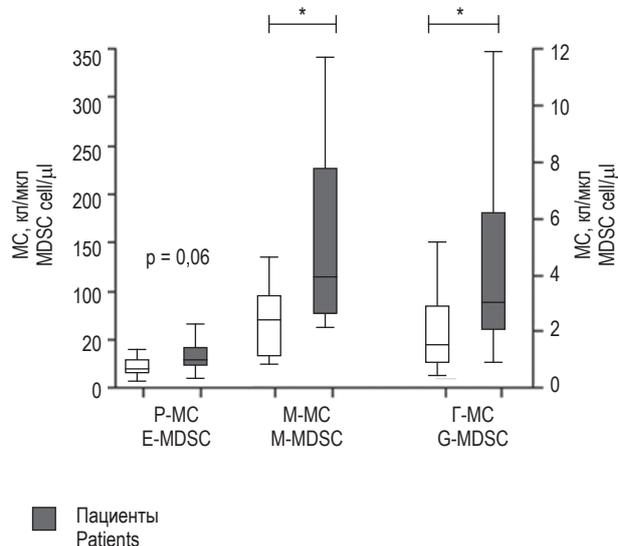
у больных (Ме 2,8 (2,4-3,2) против 2,5 (2,2-2,8)  $\times 10^3$ кл/мкл,  $p = 0,03$ ), абсолютное содержание Г-МС и М-МС было также значительно повышенным (рис. 1Б). Повышение абсолютного количества Р-МС было умеренно выраженным и проявлялось на уровне тренда.

На следующем этапе был проведен анализ взаимосвязи количества МС с такими факторами, как пол, возраст, генетическая предрасположенность и тип терапии у больных АС. Поскольку пациенты с центральной и периферической формой АС по данным показателям были сопоставимы (табл. 1), анализ проводился в общей группе пациентов (табл. 2). Относительное содержание Р-МС, Г-МС и М-МС у мужчин и женщин значительно не различалось. Также мы не выявили различий в содержании МС в зависимости от возраста. Показатели относительного и абсолютного содержания МС в подгруппах моложе и старше 40 лет (медиана возраста) были схожи. При сравнении пациентов, позитивных и негативных по HLA-B27 антигену, относительное и абсолютное содержание Г-МС и М-МС не различалось между оппозиционными подгруппами.

А (А)



Б (Б)



**Рисунок 1. Субпопуляционный состав миелоидных супрессорных клеток у здоровых доноров и больных анкилозирующим спондилитом**

Примечание. Представлены данные относительного (А) и абсолютного (Б) содержания ранних (Р-МС), моноцитарных (М-МС) и гранулоцитарных (Г-МС) миелоидных супрессорных клеток у здоровых доноров и больных анкилозирующим спондилитом. Здесь и далее данные приведены в виде медианы (Ме), интерквартильного диапазона и диапазона значений 10-90 перцентилей. \*  $p_0 < 0,05$  – достоверность различий между показателями.

Figure 1. Myeloid-derived suppressor cell subpopulations in healthy donors and patients with ankylosing spondylitis

Note. The data on the frequency (A) and absolute (B) count of early (E-MDSC), monocytic (M-MDSC) and granulocytic (G-MDSC) myeloid-derived suppressor cells in healthy donors and patients with ankylosing spondylitis are presented. Hereinafter, the data are presented as median (Me), interquartile range and 10-90% percentiles. \*  $p_0 < 0.05$ , significance of differences between parameters.

**ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ С УЧЕТОМ КЛИНИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПАЦИЕНТОВ С АНКИЛОЗИРУЮЩИМ СПОНДИЛИТОМ, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

**TABLE 2. CONTENT OF MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELL SUBPOPULATIONS IN PERIPHERAL BLOOD ACCORDING TO THE CLINICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

Параметры Parameters		P-МС E-MDSC		Г-МС G-MDSC		M-МС M-MDSC	
		%	кл/мкл cell/ $\mu$ l	%	кл/мкл cell/ $\mu$ l	%	кл/мкл cell/ $\mu$ l
Пол Sex	Мужчины Male	0,95 (0,6-1,6)	31,3 (17,3-40,5)	0,12 (0,06-0,21)	2,8 (1,5-6,2)	5,0 (3,2-6,7)	139,6 (73,4-217,3)
	Женщины Female	0,93 (0,7-1,9)	26,6 (23,9-42,9)	0,13 (0,07-0,17)	3,5 (2,2-5,2)	4,8 (3,0-7,8)	111,9 (74,6-249,5)
	p*	0,9	0,95	0,95	0,6	0,9	0,9
Возраст Age	< 40 лет < 40 years	0,96 (0,7-1,1)	28,2 (23,9-32,3)	0,12 (0,06-0,17)	2,8 (1,7-6,2)	5,0 (3,0-6,3)	112,9 (106,0-153,4)
	≥ 40 лет ≥ 40 years	0,93 (0,6-2,1)	30,3 (17,7-49,3)	0,13 (0,07-0,23)	3,5 (2,2-6,1)	5,3 (3,0-8,9)	132,2 (72,7-259,1)
	p	0,9	0,5	0,9	0,7	0,6	0,6
HLA-B27	(-)	0,98 (0,7-2,1)	28,3 (24,0-33,5)	0,15 (0,06-0,24)	3,6 (2,1-6,2)	3,0 (2,0-5,6)	108,0 (62,5-112,9)
	(+)	0,9 (0,6-1,6)	29,8 (19,6-41,5)	0,12 (0,07-0,19)	2,9 (2,0-6,1)	5,0 (3,0-7,0)	139,9 (93,3-223,4)
	p	0,8	0,9	0,9	0,9	0,1	0,1
Терапия Therapy	1-я линия** 1 <sup>st</sup> line**	0,97 (0,7-1,5)	28,4 (13,5-35,8)	0,11 (0,07-0,24)	2,9 (1,97-6,20)	4,5 (2,8-7,0)	111,9 (71,9-153,3)
	2-я линия*** 2 <sup>nd</sup> line***	0,8 (0,6-1,9)	24,9 (21,8-46,4)	0,14 (0,05-0,17)	3,5 (2,0-6,2)	5,0 (3,2-10,0)	174,3 (108,0-268,8)
	p	0,7	0,8	0,9	0,9	0,3	0,8

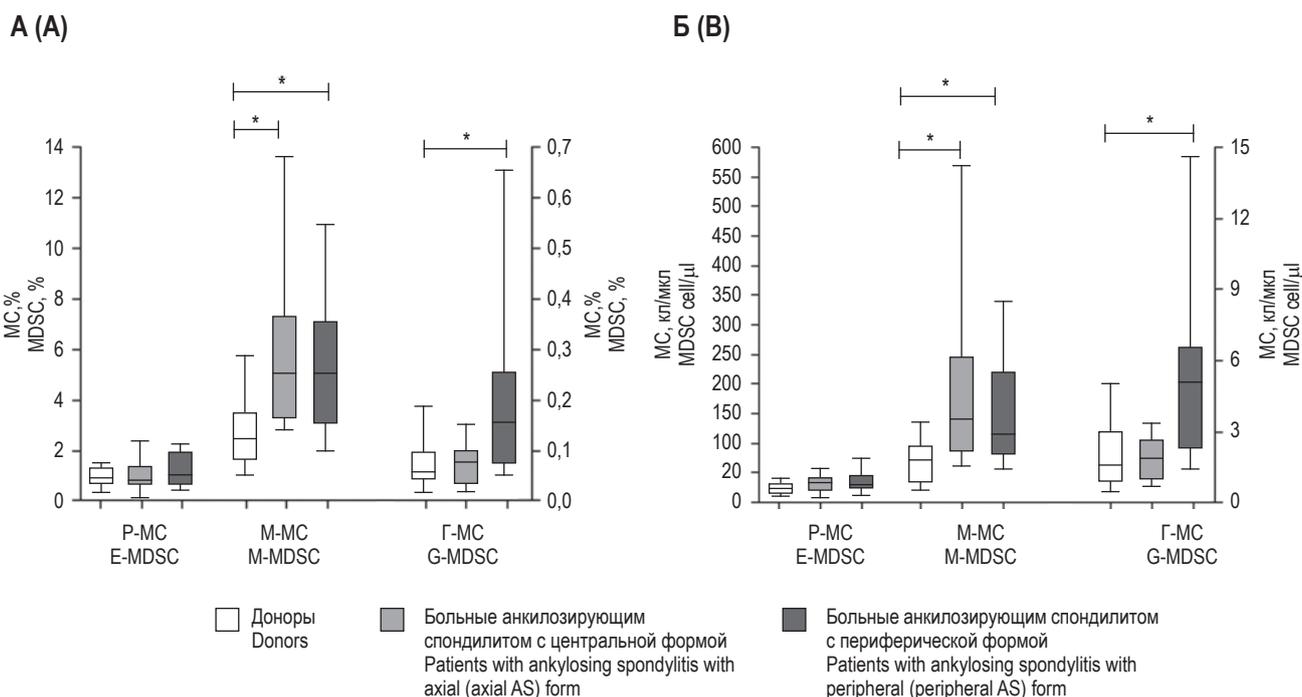
Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ГИБП в два раза чаще использовались в группе больных с центральной формой АС, поэтому мы изучили влияние лечения на содержание МС. Показатели относительного и абсолютного содержания МС не отличались в подгруппах пациентов, получающих препараты 1-й и 2-й линий.

Сравнительный анализ МС у пациентов с центральной и периферической формой АС выявил более высокое количество относительного и абсолютного количества М-МС в обеих подгруппах по сравнению со здоровыми донорами. В то же время повышенное содержание Г-МС регистрировалось только у больных АС с вовлечением периферических суставов (рис. 2).

Поскольку индексы активности ASAS и BASDAI у пациентов с периферической формой АС были выше (табл. 1), чем у больных с центральной формой, представлялось важным исследовать возможную взаимосвязь Г-МС с активностью заболевания. Для этого мы сравнили содержание Г-МС у пациентов с периферической формой АС в подгруппах с низкой и высокой активностью заболевания. Видно, что повышенное количество Г-МС отмечалось как в подгруппе пациентов с низкой/умеренной (ASDAS < 2,1), так и высокой/очень высокой активностью (ASDAS ≥ 2,1) и было сходным в сравниваемых подгруппах (рис. 3В, Г).



**Рисунок 2. Миелоидные супрессорные клетки у больных разными клиническими формами анкилозирующего спондилита**

**Примечание.** Представлены данные относительного (А) и абсолютного (Б) содержания ранних (Р-МС) и моноцитарных (М-МС) и гранулоцитарных (Г-МС) миелоидных супрессорных клеток у доноров (donors), больных анкилозирующим спондилитом с центральной (axial AS) и периферической (peripheral AS) формами. \*  $p_U < 0,05$  – достоверность различий между показателями.

Figure 2. Myeloid-derived suppressor cells in patients with different clinical forms of ankylosing spondylitis

Note. The data on the frequency (A) and absolute (B) count of early (E-MDSC), monocytic (M-MDSC) and granulocytic (G-MDSC) myeloid-derived suppressor cells in donors, patients with ankylosing spondylitis with axial (axial AS) and peripheral (peripheral AS) forms. \*  $p_U < 0.05$ , significance of differences between parameters.

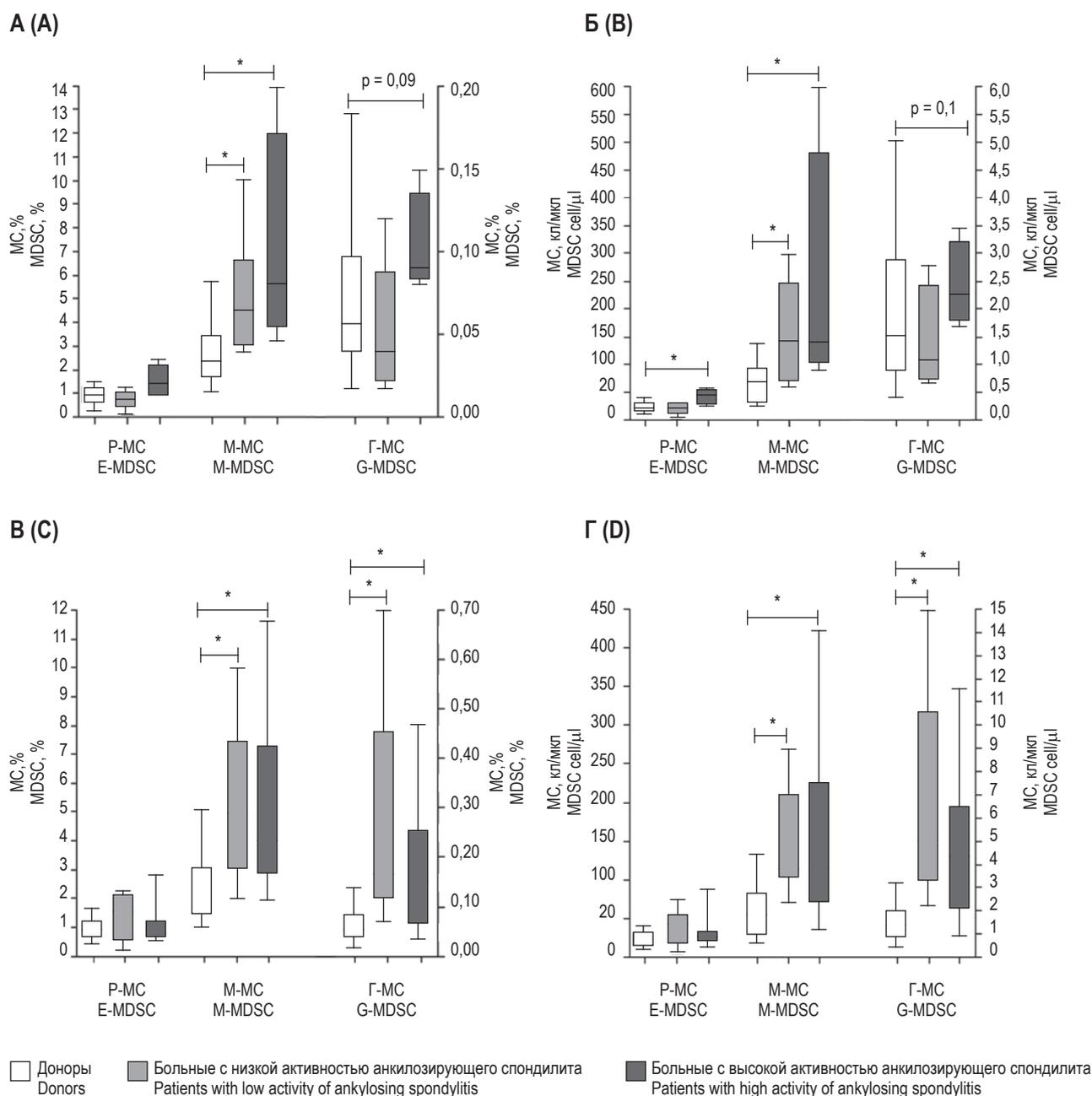
В то же время анализ взаимосвязи количества Г-МС и активности заболевания при центральной форме АС (рис. 3А, Б) показал, что пациенты с высокой/очень высокой активностью характеризовались тенденцией к более высокому относительному и абсолютному количеству Г-МС, тогда как в подгруппе с низкой/умеренной активностью изменений в количестве Г-МС не наблюдалось. Таким образом, при центральной форме АС содержание Г-МС ассоциировалось с активностью заболевания.

При анализе взаимосвязи М-МС с активностью заболевания выяснилось, что значимое увеличение количества М-МС при центральной форме АС обнаруживается у пациентов как с низкой/умеренной, так и высокой/очень высокой активностью (рис. 3А, Б). Тем не менее медианные и интерквартильный диапазон значений относительного количества М-МС в подгруппе с высокой/очень высокой активностью были выше, чем в оппозитной подгруппе, однако эти различия не были статистически значимыми ( $p = 0,3$ ). В то же

время у пациентов с периферической формой АС количество М-МС в подгруппах с низкой и высокой активностью было одинаково повышенным по сравнению с аналогичным показателем в группе здоровых доноров (Me 5,0 (3,0-7,0) и 4,0 (3,0-7,0) против 2,4 (1,6-3,5) % соответственно) (рис. 3В, Г).

Оценка содержания Р-МС среди МНК в зависимости от активности заболевания показала, что значимое повышение абсолютного количества Р-МС было характерно только для больных центральной формой АС с высокой активностью (рис. 3Б).

Обнаруженные нами особенности содержания субпопуляций МС в периферической крови больных АС с учетом активности заболевания и в зависимости от формы АС также подтверждались данными корреляционного анализа, в частности наличием значимой прямой корреляционной связи между относительным содержанием Г-МС и индексом активности BASDAI у пациентов с центральным АС и отсутствием таковой при пе-



**Рисунок 3. Миелоидные супрессорные клетки у больных разной степени активности анкилозирующего спондилита**

**Примечание.** Представлены данные относительного (А, В) и абсолютного (Б, Г) содержания ранних (Р-МС), моноцитарных (М-МС) и гранулоцитарных (Г-МС) миелоидных супрессорных клеток у доноров (donors), больных с низкой (low) и высокой (high) активностью анкилозирующего спондилита с центральной (А, Б) и периферической (В, Г) формами. \*  $p_0 < 0,05$  – достоверность различий между показателями.

Figure 3. Myeloid-derived suppressor cells in patients with varying activity scores of ankylosing spondylitis

Note. The data on the frequency (A, C) and absolute (B, D) count of early (E-MDSC), monocytic (M-MDSC) and granulocyte (G-MDSC) myeloid-derived suppressor cells in donors, patients with low and high activity of ankylosing spondylitis with axial (A, B) and peripheral (C, D) forms.

\*  $p_0 < 0.05$ , significance of differences between parameters.

риферической форме АС (табл. 3). Аналогичным образом статистически значимая положительная связь относительного содержания М-МС с ASDAS-СОЭ и на уровне тренда с СОЭ выявлялась у пациентов с центральной формой АС и

отсутствовала у больных с периферической формой АС. Прямая корреляционная взаимосвязь между содержанием Р-МС и индексами активности BASDAI, ASDAS-СРБ выявлялась на уровне тренда только при центральной форме АС.

**ТАБЛИЦА 3. КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОСВЯЗИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АКТИВНОСТИ АНКИЛОЗИРУЮЩЕГО СПОНДИЛИТА И СОДЕРЖАНИЯ МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК**

TABLE 3. CORRELATION ANALYSIS OF THE RELATIONSHIP BETWEEN THE ACTIVITY SCORES OF ANKYLOSING SPONDYLITIS AND THE FREQUENCY OF MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS

Параметры Parameters	P-МС E-MDSC		M-МС M-MDSC		Г-МС G-MDSC	
	Центральная форма Axial AS	Периферическая форма Periphereal AS	Центральная форма Axial AS	Периферическая форма Periphereal AS	Центральная форма Axial AS	Периферическая форма Periphereal AS
СОЭ ESR	0,36	-0,04	0,55	-0,04	0,26	-0,03
p*	0,3	0,85	0,098	0,86	0,47	0,87
СРБ CRP	0,47	-0,07	0,2	-0,01	0,15	0,18
p	0,17	0,73	0,58	0,96	0,67	0,37
BASDAI	0,58	-0,02	0,04	-0,17	0,65	-0,06
p	0,08	0,93	0,92	0,39	0,04	0,75
ASDAS-СОЭ ASDAS-ESR	0,23	0,06	0,73	-0,12	0,17	-0,04
p	0,53	0,77	0,02	0,55	0,65	0,85
ASDAS-СРБ ASDAS-CRP	0,56	0,004	0,3	-0,11	0,55	-0,07
p	0,09	0,98	0,38	0,58	0,1	0,71

Примечание. Данные представлены в виде коэффициента корреляции Спирмена. \* p – достоверность различий между подгруппами больных.

Note. Data are presented as Spearman's correlation coefficient. \* p, significance of differences between subgroups of patients.

## Обсуждение

Полученные нами в целом данные свидетельствуют о возрастании относительного и абсолютного количества М-МС и Г-МС при АС. Причем такие факторы, как пол пациентов, возраст и экспрессии HLA-B27, не влияют на уровень этих клеток в периферической крови. Повышенное количество М-МС регистрируется у пациентов как с центральной, так и периферической формой АС. В то же время экспансия Г-МС характерна только для пациентов с вовлечением периферических суставов. Относительное содержание Р-МС, М-МС и Г-МС при центральной форме АС прямо коррелирует с активностью заболевания, тогда как увеличение доли Г-МС при периферической форме АС не связано с активностью воспалительного процесса.

Согласно данным литературы, экспансия МС при аутоиммунном воспалении обусловлена повышенной концентрацией медиаторов воспаления (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IL-17, S100A8, S100A9) и CSF (G-CSF, GM-CSF), которые стимулируют миелопоэз, блокируют дифференцировку незрелых миелоидных предшественников на периферии, а также индуцируют супрессорную активность и выживаемость МС [9]. Другим механизмом может быть репрограммирование зрелых моноцитов и нейтрофилов в МС под действием провоспалительных медиаторов [7]. Это подтверждается возможностью генерации иммуносупрессивных М-МС из моноцитов с использованием GM-CSF в комбинации с IL-6, IL-1, IL-4 и PGE2 [2]. Поскольку АС характеризуется повышенной концентрацией многих провоспалительных медиаторов [11], что обуславливает высокую эффективность лечения ингибиторами TNF $\alpha$  и

IL-17, данная патология также может сопровождаться увеличением численности МС. Действительно, недавно появилось первое сообщение, в котором Liu с соавторами показали возрастание М-МС и Г-МС у больных АС [6], что согласуется с нашими данными. Однако в отличие от Liu мы также исследовали уровень Р-МС и показали выраженную тенденцию к возрастанию абсолютно количества этих клеток при АС. Другим новым фактом, выявленным в настоящей работе, стали данные о том, что среди различных факторов большое значение, по-видимому, имеет клинический фенотип АС, поскольку возрастание Г-МС регистрировалось только в группе пациентов с вовлечением периферических суставов.

Несмотря на то, что накопление МС в циркуляции и очагах воспаления выявлено при многих аутоиммунных заболеваниях, роль этих клеток в патогенезе аутоиммунного воспаления остается неясной, МС могут обладать как противовоспалительной, так и провоспалительной активностью [9]. Такая функциональная дихотомия МС похоже не связана с субпопуляционной принадлежностью к моноцитарным или гранулоцитарным МС, так как указанные субпопуляции, хотя и различаются по механизмам супрессорной активности [9], могут превращаются друг в друга и даже в другие клетки, например, остеокласты [14].

У больных АС доля МС по данным Liu прямо коррелировала с активностью заболевания, однако такая взаимосвязь была выявлена только в отношении М-МС. В то же время в нашем исследовании прямая корреляция с активностью заболевания прослеживалась для всех субпопуляций МС, но только у больных центральной формой

АС. Причем выявленная положительная корреляция Р-МС с показателями активности у больных центральной формой АС позволяет говорить и о вовлеченности данной субпопуляции в патогенез центральной формы АС. Полученные в нашем исследовании различия могут быть связаны с тем, что в исследовании Liu анализ проводился в общей группе пациентов без учета клинической формы. Кроме того, поскольку на сегодняшний день не существует единого подхода к характеристике фенотипа субпопуляций МС, выявленные различия также могут быть обусловлены особенностями гейтирования при оценке субпопуляций МС.

Обнаруженная прямая корреляционная связь между содержанием МС и активностью заболевания позволяет предполагать снижение супрессорной активности и/или появление провоспалительной активности у миелоидных предшественников. По данным литературы, МС в условиях хронического воспаления могут продуцировать провоспалительные цитокины [4] и способствовать дифференцировке Th17-лимфоцитов [15]. Действительно, Liu, несмотря на наличие супрессорной активности М-МС, выявил прямую корреляционную связь между долей этих клеток и уровнем IL-17 в сыворотке больных АС, основным источником которого могут являться Th17-лимфоциты. Функциональная активность МС в нашем исследовании не оценивалась, что является ограничением настоящей работы. Дальнейший анализ экспрессии молекул, опосредующих супрессорную активность (ARG-1, IDO, PDL-1) МС, позволит ответить на ряд вопросов относительно супрессорного потенциала различных субпопуляций МС у больных АС.

## Список литературы / References

1. Bronte V, Brandau S, Chen S, Colombo M.P, Frey A.B, Greten T.F, Mandruzzato S, Murray P.J, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, Rodriguez P.C., Sica A., Umansky V., Vonderheide R.H., Gabrilovich D.I. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat. Commun.*, 2016, Vol. 7, 12150. doi: 10.1038/ncomms12150.
2. Casacuberta-Serra S., Parés M., Golbano A., Coves E., Espejo C., Barquinero J. Myeloid-derived suppressor cells can be efficiently generated from human hematopoietic progenitors and peripheral blood monocytes. *Immunol. Cell Biol.*, 2017, Vol. 95, no. 6, pp. 538-548.
3. Gabrilovich D.I. Myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunol. Res.* 2017, Vol. 5, no. 1, pp. 3-8.
4. Guo C., Hu F., Yi H., Feng Z., Li C., Shi L., Li Y., Liu H., Yu X., Wang H., Li J., Li Z., Wang X. Myeloid-derived suppressor cells have a proinflammatory role in the pathogenesis of autoimmune arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2014, Vol. 75, pp. 278-285.
5. Jiao Z., Hua S., Wang W., Wang H., Gao J., Wang X. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlated negatively with Th17 cells in patients with rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.*, 2013, Vol. 42, no. 2, pp. 85-90.
6. Liu Y., Zhuang K., Chen B., Li P., Zhou X., Jiang H., Zhong L., Liu F. Expansion and activation of monocytic-myeloid-derived suppressor cell via STAT3/arginase-I signaling in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Res. Ther.*, 2018, Vol. 20, no. 1, 168. doi: 10.1186/s13075-018-1654-4.

7. Millrud C.R., Bergenfelz C., Leandersson K. On the origin of myeloid-derived suppressor cells. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 2, pp. 3649-3665.
8. Motallebnezhad M., Jadidi-Niaragh F., Qamsari E.S., Bagheri S., Gharibi T., Yousefi M. The immunobiology of myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Tumor Biol.*, 2016, Vol. 37, no. 2, pp. 1387-1406.
9. Rajabinejad M., Salari F., Karaji A.G., Rezaeiemanesh A. The role of myeloid-derived suppressor cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis; anti- or pro-inflammatory cells? *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, 2019, Vol. 47, no. 1, pp. 4149-4158.
10. Tcyganov E., Mastio J., Chen E., Gabrilovich D.I. Plasticity of myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Curr. Opin. Immunol.*, 2018, Vol. 51, pp. 76-82.
11. Tsukazaki H., Kaito T. The Role of the IL-23/IL-17 Pathway in the pathogenesis of spondyloarthritis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, Vol. 21, no. 17, 6401. doi: 10.3390/ijms21176401.
12. Whitfield-Larry F., Felton J., Buse J., Su M.A. Myeloid-derived suppressor cells are increased in frequency but not maximally suppressive in peripheral blood of type 1 diabetes mellitus patients. *Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 153, no. 1, pp.156-164.
13. Wu H., Zhen Y., Ma Z., Li H., Yu J., Xu Z.G., Wang X.-Y., Yi H., Yang Y.-G. Arginase-1-dependent promotion of TH17 differentiation and disease progression by MDSCs in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.*, 2016, Vol. 8, no. 331, 331ra40. doi: 10.1126/scitranslmed.aae048.
14. Zhang H., Huang Y., Wang S., Fu R., Guo C., Wang H., Zhao J., Gaskin F., Chen J., Yang N., Fu S.M. Myeloid-derived suppressor cells contribute to bone erosion in collagen-induced arthritis by differentiating to osteoclasts. *J. Autoimmun.*, 2015, Vol. 65, pp. 82-89.
15. Zhanga H., Wanga S., Huangb Y., Wanga H., Zhaoa J., Gaskinc F., Yanga N., Fud S.M. Myeloid-derived suppressor cells are proinflammatory and regulate collagen-induced arthritis through manipulating Th17 cell differentiation. *Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 157, no. 2, pp. 175-186.

**Авторы:**

**Моренкова А.Ю.** — аспирант лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Тихонова М.А.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Тыринова Т.В.** — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Баторов Е.В.** — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Сизиков А.Э.** — к.м.н., заведующий отделением ревматологии клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Authors:**

**Morenkova A.Yu.**, Postgraduate Student, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Tikhonova M.A.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Tyrinova T.V.**, PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Batorov E.V.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Sizikov A.E.**, PhD (Medicine), Head, Department of Rheumatology, Clinics of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Чумасова О.А.** — к.м.н., врач-ревматолог отделения ревматологии клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Сулутьян А.Э.** — к.м.н., врач-ревматолог отделения ревматологии клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Останин А.А.** — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Черных Е.Р.** — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Chumasova O.A.**, PhD (Medicine), Clinical Rheumatologist, Department of Rheumatology, Clinics of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Sulutyan A.E.**, PhD (Medicine), Clinical Rheumatologist, Department of Rheumatology, Clinics of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Ostanin A.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Main Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Chernykh E.R.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 16.10.2020  
Принята к печати 10.01.2021

Received 16.10.2020  
Accepted 10.01.2021

---