

УДК 577.122;577.29

## МУЛЬТИПЛЕКСНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОМАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЕ<sup>1</sup>

© 2020 г. С. А. Волошин<sup>а</sup>, Г. У. Фейзханова<sup>а</sup>, Е. Н. Савватеева<sup>а</sup>,  
О. В. Смолдовская<sup>а</sup>, А. Ю. Рубина<sup>а</sup>, \*

<sup>а</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: allarubina@hotmail.com

Поступила в редакцию 18.05.2020 г.

После доработки 01.07.2020 г.

Принята к публикации 10.07.2020 г.

Цитокины и белки острой фазы играют важную роль в формировании ответной иммунологической реакции при воспалительных процессах. В зависимости от типа заболевания развитие воспаления сопровождается изменениями концентраций (как уменьшением, так и увеличением) не одного, а множества биомаркеров. Нами разработан вариант мультиплексного иммуноанализа на биочипах для количественного определения восьми биомаркеров воспаления человека: острофазных белков CRP и SAA и цитокинов IL-6, IL-8, IL-17, IL-18, IP10/CXCL10 и TNF $\alpha$ . Продемонстрирована возможность использования разработанного метода для выявления биомаркеров воспаления в культуральной среде. Метод может быть использован для оценки профиля биомаркеров воспаления *in vitro*, а также его изменений, индуцируемых различными агентами, в том числе после активации клеток, их синтезирующих, и при изучении заболеваний на клеточных моделях.

**Ключевые слова:** иммуноанализ, белки острой фазы, цитокины, культуральная среда, биочипы

**DOI:** 10.31857/S0026898420060130

### ВВЕДЕНИЕ

В развитие воспалительного процесса в организме человека вовлечено множество молекул белкового происхождения, способных регулировать иммунную реакцию, развивающуюся в ответ на воздействие экзогенных (вирусы, бактерии, аллергены) или эндогенных (ревматоидный фактор, ДНК и другие аутоантигены) факторов.

К ведущим участникам развития процесса воспаления относятся цитокины – белковые молекулы с про- и противовоспалительными свойствами, которые запускают различные сигнальные каскады. При особо тяжелых воспалениях, например при сепсисе, концентрации некоторых цитокинов, таких как интерлейкин-6 (IL-6), могут существенно увеличиваться за считанные часы. Концентрации секретируемых клетками молекул воспаления могут также изменяться в зависимости от стадии заболевания и применяемой терапии [1, 2].

В настоящее время большинство экспериментов по исследованию воспалительных процессов у человека проводят на отдельных клеточных линиях, используемых в качестве *in vitro* моделей

различных патологий. Это касается изучения механизмов иммунологических процессов [3], патогенеза онкологических заболеваний [4] и поиска терапевтических мишеней [5], механизмов аллергических [6] и аутоиммунных заболеваний [7], а также оценки адекватности проводимой терапии. Таким образом, оценка концентраций биомаркеров воспаления важна как при изучении механизмов патогенеза того или иного заболевания, так и в клинической практике.

В развитии воспалительного процесса участвует множество сигнальных и эффекторных молекул, поэтому использование метода, который позволяет одновременно определять концентрации большого числа ключевых биомаркеров воспаления, может дать более полную информацию о паттернах исследуемых соединений. Следует сказать, что концентрации потенциальных маркеров воспаления могут отличаться друг от друга на несколько порядков [8], что существенно затрудняет их одновременное определение в одном образце. Кроме того, некоторые белки семейства цитокинов высокомолекулярны, что также осложняет

<sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026898420060130 для авторизованных пользователей. Сокращения: CRP – С-реактивный белок; FBS – эмбриональная телячья сыворотка; IL – интерлейкин; IP10/CXCL10 – индуцируемый интерфероном- $\gamma$  белок-10/CXC-хемокин-10; SAA – белок сывороточного амилоида А; TNF $\alpha$  – фактор некроза опухоли  $\alpha$ ; RPMI-1640 – Roswell Park Memorial Institute medium 1640.

ет поиск и выбор антител для их специфического определения в смеси аналогичных белков.

Для определения биомаркеров воспаления в культуральных средах используют как классический иммуноферментный анализ (ИФА) [9], так и появившиеся несколько позже мультиплексные иммунохимические методы. Использование моноплексных тест-систем на основе ИФА для выявления цитокинов позволяет проводить анализ с достаточной чувствительностью и высокой специфичностью, так как исключает интерференцию используемых в наборе антител. Его недостаток заключается в необходимости большого объема анализируемого образца при скрининге набора цитокинов. Мультиплексные методы анализа (например, модификация анализа вестерн-блот [10], проточная цитофлуориметрия с использованием микросфер [11] или биочипы [12]) позволяют существенно снизить необходимый объем аналита, но также обладают рядом недостатков. Так, метод иммуноблоттинга менее чувствителен, чем классический ИФА, и характеризуется более низкой воспроизводимостью, в связи с чем его можно использовать преимущественно для качественного и полуколичественного анализа. Аналитические методы с использованием микросфер отличаются высокой чувствительностью обнаружения цитокинов, но их применение связано с необходимостью работы на сложном оборудовании [13–15].

Один из методов анализа биомаркеров воспаления, который может быть использован наряду с цитофлуориметрией и другими мультиплексными

методами, – иммунофлуоресцентный анализ на биочипах [16]. В представленной работе продемонстрирована возможность использования гидрогелевых биочипов для одновременного определения концентрации 8 биомаркеров воспаления человека: двух острофазных белков и шести цитокинов – в среде для культивирования клеток RPMI-1640.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реактивы и буферы.** В работе использованы следующие реагенты: Tween-20, поливинилпирролидон (PVP) 360 кДа, поливинилпирролидон (PVP) 360 кДа, конъюгат стрептавидина с Cyanine-5 (Streptavidin-Cy5) (“GE Healthcare”, США); биотин-*N*-гидроксисукцинимидный эфир, *N,N*-диметилформамид (DMFA), сефадекс G-25 Coarse, Bind-Silane (“Sigma-Aldrich”, США); культуральная среда Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI-1640; “Панэко”, Россия); эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота (FBS; “Biological Industries”, Израиль); 10 мМ карбонатно-бикарбонатный буфер, pH 9.5 (СВВ); фосфатно-солевой буфер, pH 7.4 (PBS); PBS с 0.01% Tween 20 (PBST); буфер для разведения (PBSAP): PBS, 0.14% PVA, 0.14% PVP.

Производители препаратов белков (биомаркеров воспаления человека), которые входили в состав калибровочных проб, а также препаратов антител, выбранных для проведения мультиплексного иммуноанализа на биочипе, представлены в табл. 1.

**Таблица 1.** Антитела и антигены, использованные для проведения иммуноанализа на биочипе

Антиген <sup>а</sup>	Лот (производитель)		
	антигена	антител захвата	детектирующих антител
CRP	8C72 (“Биалекса”, Россия)	CRP78 (ВНЦМДЛ <sup>б</sup> , Россия)	CRP135 (“Биалекса”)
SAA	8SA1 (“Биалекса”)	SAA1 (“Биалекса”)	SAA15 (“Биалекса”)
IL-6	PSG180-02 (“SCI-STORE”, Россия)	DY206 <sup>с</sup> (“R&D Systems”, США)	DY206 <sup>с</sup> (“R&D Systems”)
IL-8/CXCL8	DY208 <sup>б</sup> (“R&D Systems”)	DY208 <sup>с</sup> (“R&D Systems”)	DY208 <sup>с</sup> (“R&D Systems”)
IL-18/IL1F4	DY318 <sup>с</sup> (“R&D Systems”)	D044-3 (“R&D Systems”)	DY318 <sup>с</sup> (“R&D Systems”)
TNF $\alpha$	300-01A (“PeproTech”, Великобритания)	TNF A11 (ВНЦМДЛ)	TNF A11 (ВНЦМДЛ)
IL-17A	228-10878 (“RayBiotech”, США)	B3 (ВНЦМДЛ)	H11 (ВНЦМДЛ)
IP10/CXCL10	300-12 (“PeproTech”)	500-M60 (“PeproTech”)	500-P93BT (“PeproTech”)

<sup>а</sup> CRP – С-реактивный белок; SAA – белок сывороточного амилоида А; IL – интерлейкин; IP10/CXCL10 – индуцируемый интерфероном- $\gamma$  белок-10/СХС-хемокин-10; TNF $\alpha$  – фактор некроза опухоли  $\alpha$ . <sup>б</sup>ВНЦМДЛ – Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения. <sup>с</sup> Реагенты входят в состав набора для ИФА.

**Получение конъюгатов антител с биотином.** Конъюгаты антител с биотином были получены для препаратов антител, не содержащих биотиновой метки. Для этого к 50 мкл раствора антител в СВВ (1 мг/мл) добавляли 1 мкг биотин-N-гидроксисукцинимидного эфира в DMFA (10 мг/мл) и инкубировали при 22°C в течение 1 ч при встряхивании на шейкере (550 об/мин). Удаление непрореагировавшего биотин-N-гидроксисукцинимидного эфира проводили методом гель-фильтрации на спин-колонке, содержащей сефадекс G-25, используя в качестве элюента PBS.

**Изготовление биочипов.** Подготовку стеклянных подложек, изготовление смеси гелевых мономеров, процессы полимеризации и блокировки биочипов проводили по методикам, описанным ранее [17, 18]. На активированные с помощью Bind-Silane стеклянные подложки переносили смесь гелеобразующих мономеров и иммобилизуемых белков с помощью печатающего робота QArray (“Genetix”, Великобритания). Подложки облучали ультрафиолетом (длина волны 350 нм). В результате в нанесенных на подложки полусферах происходила реакция фотоиндуцируемой сополимеризации, в ходе которой в ячейках образовывалась полимерная структура с равномерно включенными в нее белками. После завершения полимеризации биочипы отмывали от непрореагировавших компонентов и обрабатывали блокирующим раствором (1% PVA в PBS), затем промывали дистиллированной водой и высушивали центрифугированием (1000 об/мин, 5 мин, 22°C).

Для иммобилизации на биочипах использовали препараты антител без биотиновой метки, концентрация антител в полимеризационной смеси варьировала от 0.3 до 3 мг/мл. Диаметр гелевых ячеек биочипа составлял  $100 \pm 20$  мкм, расстояние между ячейками – 300 мкм. Каждый из образцов данной партии (лота) антител иммобилизовали в 4 повторях – для повышения воспроизводимости результатов анализа. Кроме того, в структуру биочипа были включены ячейки, не содержащие иммобилизованных белков, – для контроля фоновых сигналов – и ячейки с иммобилизованным флуоресцентно меченным белком для распознавания ячеек биочипа при обработке флуоресцентного изображения.

**Построение калибровочных кривых.** Для построения калибровочной кривой использовали пробы, полученные последовательными двукратными разведениями буфером PBSAP стандартного образца, содержащего известные концентрации каждого из аналитов. В качестве нулевого стандартного образца использовали буфер PBSAP.

**Образцы для анализа на биочипах.** На биочипах анализировали растворы, полученные при добавлении известных концентраций исследуемых

биомаркеров в PBSAP, культуральную среду RPMI-1640 или RPMI-1640, содержащую 10% FBS.

**Иммуноанализ на биочипах.** На ячейки биочипа наносили 65 мкл образца и инкубировали в течение 20 ч при 37°C, после чего биочипы промывали PBST (20 мин), ополаскивали дистиллированной водой и высушивали центрифугированием (30 с,  $2500 \times g$ ). На ячейки наносили 65 мкл смеси детектирующих антител в PBSAP и инкубировали в течение 1 ч при 37°C, после чего биочип промывали в PBST (20 мин), ополаскивали водой, высушивали и наносили 50 мкл раствора Streptavidin-Cy5 (5 мкг/мл). После инкубации (30 мин, 37°C) биочип промывали PBST (30 мин), ополаскивали водой, высушивали и детектировали флуоресценцию.

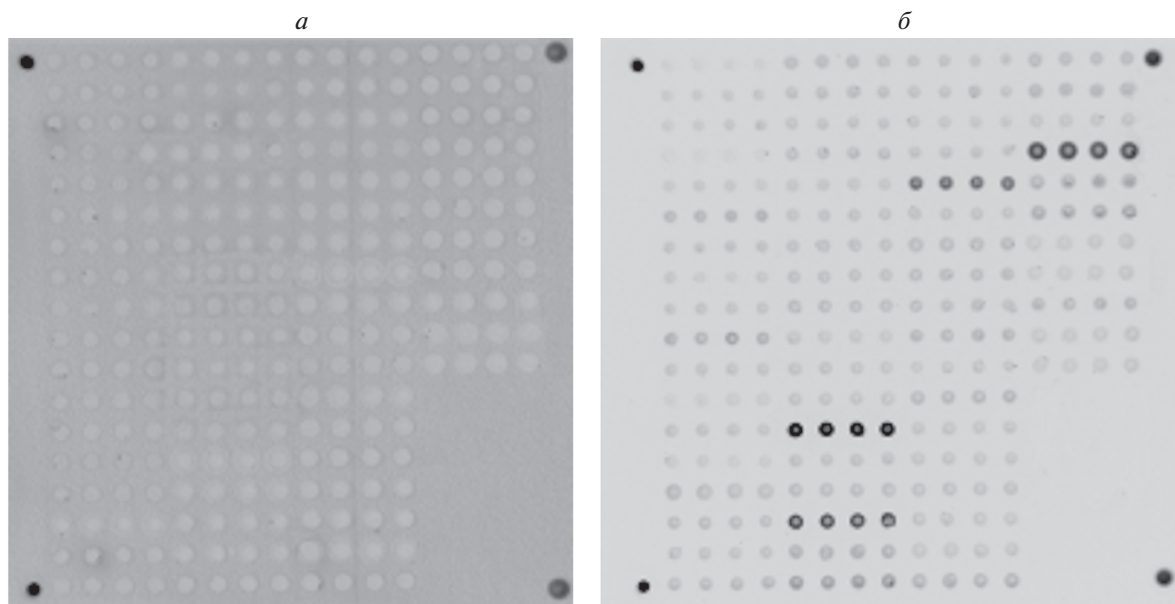
**Анализ флуоресцентных изображений.** Флуоресцентные изображения биочипов получали с помощью биочип-анализатора с лазерным возбуждением, разработанного в ИМБ РАН [19]. Анализ флуоресцентных сигналов проводили с помощью программного обеспечения ImageAssay (ИМБ РАН). Так как каждый образец антител был иммобилизован на биочипе в четырех повторях, результирующее значение флуоресцентного сигнала рассчитывали как медиану значений четырех соответствующих сигналов флуоресценции. Для сравнения расчетных и истинных значений концентрации анализируемых маркеров использовали коэффициент корреляции Пирсона.

**Оценка перекрестной реактивности антител.** На биочипы после инкубации с PBSAP, не содержащим антигенов, наносили раствор каждого из образцов биотинилированных антител и добавляли Streptavidin-Cy5. При оценке результатов анализа считали, что попарное взаимодействие между антителами отсутствует, если флуоресцентные сигналы от ячеек с иммобилизованными антителами не превышают флуоресцентные сигналы от ячеек с гелем, не содержащим иммобилизованных белков, более чем в 2 раза.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработанный метод мультиплексного определения концентраций маркеров воспаления основан на технологии гидрогелевых биочипов [20]. Нами был выбран сэндвич-вариант иммуноанализа с использованием биотиновой метки и флуоресцентной регистрацией сигналов.

При моделировании процессов воспаления в системах *in vitro* проводят измерение концентраций различных биомаркеров, количество и состав которых определяется экспериментальной задачей. При моделировании молекулярных механизмов воспаления проводят анализ определенных клеточных линий или клеток пациентов путем выявления соответствующих биомаркеров. Кон-



**Рис. 1.** Примеры флуоресцентных изображений биочипов, полученные при анализе перекрестной реактивности препаратов биотинилированных антител. На биочипах иммобилизованы антитела против CRP, SAA, IL-6, IL-8, IL-17, IL-18, IP10/CXCL10 и TNF $\alpha$  в различных концентрациях. *а* – Проявка антителами против IL-17 (клон В3) биочипа после инкубации с буфером для разведения. Флуоресцентные сигналы не видны, значит перекрестной реактивности нет. *б* – Проявка антителами против IL-4 (клон 12-08) биочипа после инкубации с буфером для разведения. Есть видимые флуоресцентные сигналы, соответствующие образованию комплекса антител 12-08 с иммобилизованными антителами, то есть присутствует перекрестная реактивность.

центрации провоспалительных цитокинов IL-6, IL-8 и TNF $\alpha$  определяют в различных клеточных линиях, в том числе в культуре клеток макрофагов [21], в ответ на определенные воздействия (провокационные испытания [22], лекарственные препараты [23]). В ряде работ проведена оценка CXCL-10 [24, 25] – хемокина, продуцируемого лейкоцитами, активированными нейтрофилами и эозинофилами, в ответ на воздействие интерферона- $\gamma$  и SAA [26, 27]. Так как IL-17 [28] и IL-18 [29] являются ключевыми факторами дифференцировки и пролиферации, их используют для индукции активации клеток в различных культурах [21, 24, 30], поэтому они также были включены в набор исследуемых антигенов. Кроме цитокинов и SAA разработанный метод апробирован и для детекции маркера воспаления CRP. Ранее показано, что его повышенные концентрации ингибируют пролиферацию клеток и даже приводят к апоптозу [31]. Таким образом, разработанный мультиплексный анализ на биочипах использован для анализа восьми белков – биомаркеров воспаления человека: CRP, SAA, IL-6, IL-8, IL-17, IL-18, IP10/CXCL10 и TNF $\alpha$ .

#### *Выбор пар антител*

Для каждого анализируемого антигена экспериментально подбирали оптимальную пару антител для проведения сэндвич-варианта иммуноанализа.

С этой целью был сконструирован биочип, на котором иммобилизовали все исследуемые антитела, не конъюгированные с биотином; при этом все исследуемые антитела были проанализированы как в роли антител захвата в различных концентрациях, так и в роли детектирующих антител (см. табл. 1S Приложения на сайте [http://www.molecbio.ru/downloads/2020/6/supp\\_Voloshin\\_rus.pdf](http://www.molecbio.ru/downloads/2020/6/supp_Voloshin_rus.pdf)).

На первом этапе проводили оценку возможных перекрестных взаимодействий между антителами (см. раздел “Экспериментальная часть” и рис. 1*а*). Оптимальными детектирующими антителами считались те, при использовании которых после инкубации нулевого стандартного образца (буфера, не содержащего каких-либо белков), в ячейках с иммобилизованными антителами захвата флуоресценция отсутствовала. В результате для ряда антител была выявлена перекрестная реактивность (рис. 1*б*), поэтому в качестве детектирующих антител в дальнейшем их не использовали.

На следующем этапе проводили анализ образцов индивидуальных антигенов в концентрации 10 нг/мл в буфере PBSAP с использованием каждого лота детектирующих антител по отдельности. В этих экспериментах оценили специфичность взаимодействия антител с соответствующим антигеном (отсутствие взаимодействия с антигеном антител, специфичных к другим ан-

тигенам). Так были выбраны детектирующие антитела для каждого антигена.

### Построение калибровочных кривых

Для измерения концентраций антигенов в анализируемых образцах провели анализ разведений стандартных образцов, содержащих смеси исследуемых белков в различных концентрациях. Диапазоны определяемых на биочипах концентраций для каждого из антигенов приведены в табл. 2.

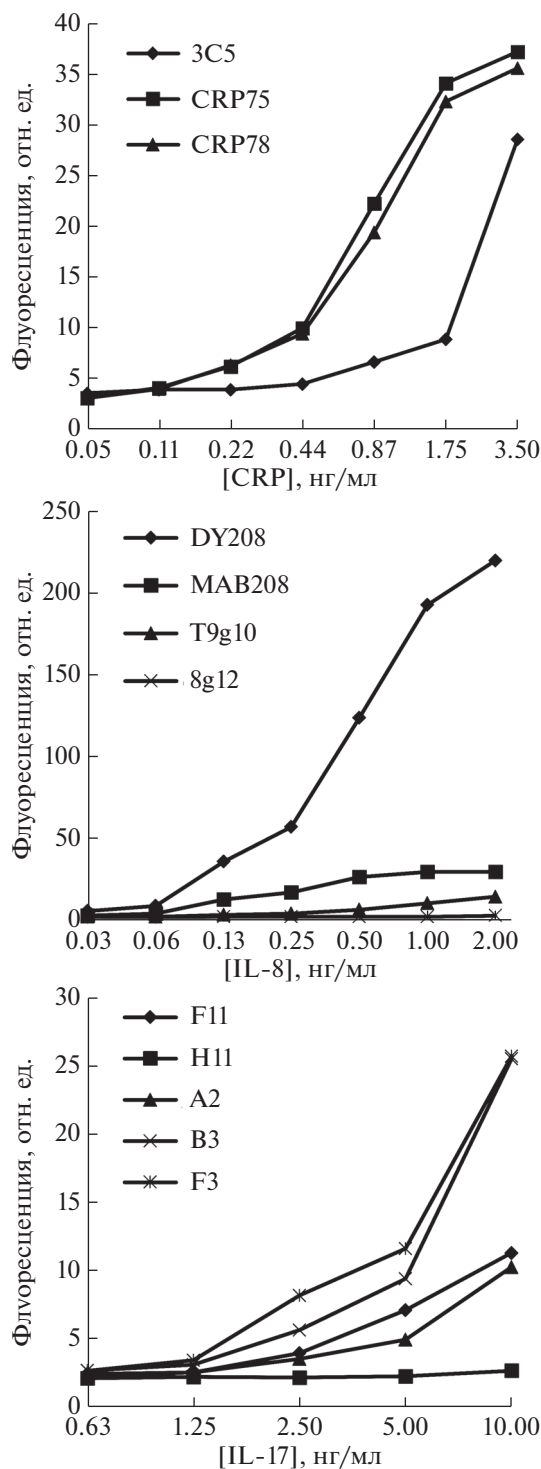
Для каждого антигена был получен набор кривых, построенных для всех иммобилизованных антител захвата к данному антигену и для выбранных на предыдущем этапе детектирующих антител. Примеры таких кривых представлены на рис. 2. После этого для каждого антигена из полученного набора выбирали калибровочную кривую с максимальным линейным участком и наибольшим углом наклона. На примере, приведенном на рис. 2, в качестве антител захвата для дальнейшей работы выбрали следующие лоты: CRP75 для CRP, DY208 для IL-8 и B3 для IL-17.

Оптимальные калибровочные кривые для 8 биомаркеров воспаления: CRP, IP10, TNF $\alpha$ , SAA, IL-6, IL-8, IL-17 и IL-18 – приведены на рис. 3. В результате были выбраны пары антител: детектирующих и захвата – для проведения сэндвич-варианта иммуноанализа.

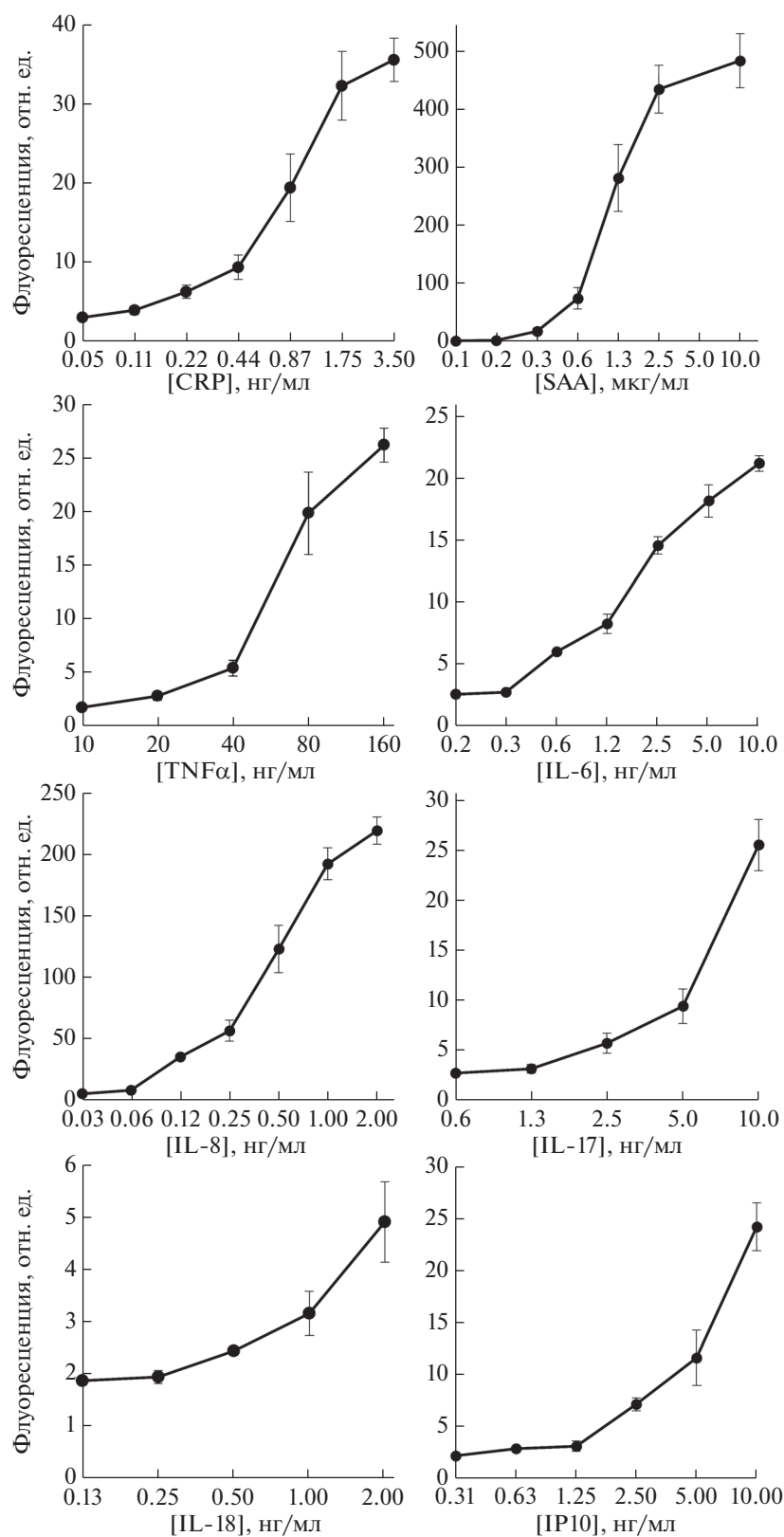
Выбор пар антител для мультиплексного иммуноанализа сопряжен с некоторыми трудностями при анализе схожих по структуре антигенов. Кроме того, большинство коммерческих антител выпускают для моноплексных анализов, поэтому не всегда удается подобрать пару антител, обладающих специфичностью, удовлетворяющей требованиям мультиплексных систем [32]. Одна из наиболее эффективных технологий, с помощью которой можно выявить среди набора антител кросс-реактивные, – биочипы [33]. Такой анализ для выбора пар антител уже был реализован Руби-

**Таблица 2.** Диапазон определяемых на биочипе концентраций антигенов

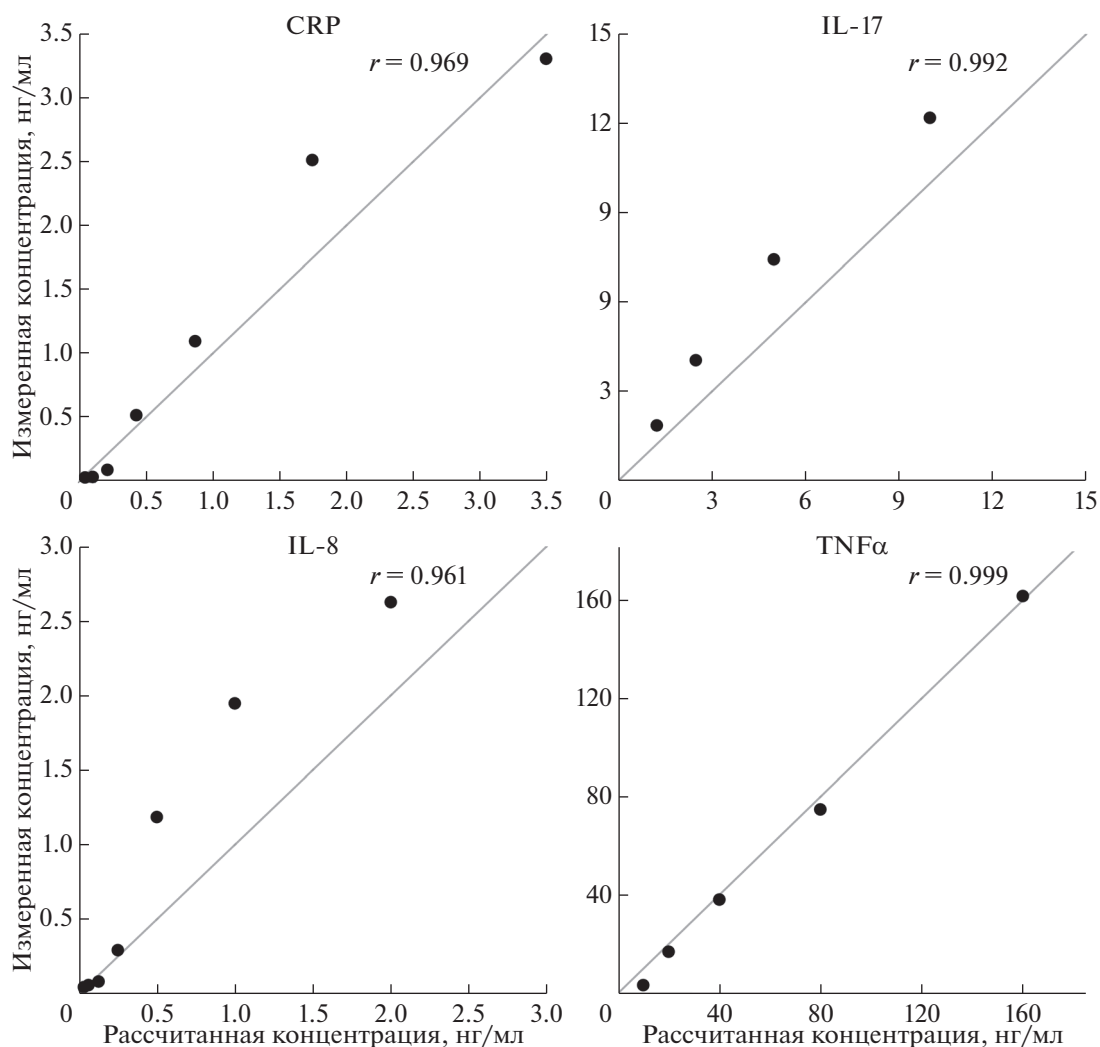
Антиген	Диапазон концентраций, нг/мл
CRP	0.05–3.50
TNF $\alpha$	10–160
IL-6	0.3–10.0
IL-8	0.03–2.00
IL-17	0.6–10.0
IL-18	0.2–2.0
IP10	0.3–10.0
SAA	150–10000



**Рис. 2.** Примеры кривых, полученных при последовательном разведении стандартных образцов на биочипах, содержащих различные иммобилизованные антитела захвата к одному и тому же антигену, на примере трех исследуемых биомаркеров воспаления: CRP, IL-8 и IL-17. Горизонтальная ось представлена в логарифмическом масштабе по основанию 2. В качестве детектирующих антител использовали лот CRP135 для CRP, DY208 для IL-8 и H11 для IL-17. На основании анализа полученных концентрационных зависимостей в качестве антител захвата выбрали лот CRP75 для CRP, DY208 для IL-8 и B3 для IL-17 (см. табл. 1S Приложения).



**Рис. 3.** Калибровочные кривые для белков воспаления, полученные при анализе стандартных образцов, содержащих точные концентрации CRP, PCT, SAA, IP10/CXCL10 (IP10), TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-17 или IL-18. Для разведений как антигенов, так и антител использован буфер PBSAP. Горизонтальная ось представлена в логарифмическом масштабе по основанию 2. Флуоресцентные значения, соответствующие концентрациям нижней границы динамического диапазона, значимо (не менее, чем на 3 стандартных отклонения) отличаются от флуоресцентных значений, получаемых для нулевого стандартного образца.



**Рис. 4.** Графики распределения рассчитанных и измеренных концентраций препарата на примере белков CRP, TNFα, IL-8 и IL-17 в культуральной среде RPMI-1640. На графиках приведены коэффициенты корреляции Пирсона.

ной с соавт. [17] на гидрогелевых биочипах при изучении бактериальных энтеротоксинов.

#### *Определение биомаркеров воспаления в культуральной среде*

Для культивирования клеточных линий во многих исследованиях используют классическую среду RPMI-1640 [34, 35]. Эта среда состоит из простых компонентов, поэтому ее удобно использовать для выращивания клеток и анализа их продукции без опасения интерференции со стороны биологически активных соединений [36]. В большинстве случаев концентрации воспалительных белков оценивают методом ИФА, при этом во многих исследованиях репертуар определяемых белков небольшой [9, 36].

При анализе биомаркеров в биологических жидкостях: сыворотке [37], слюне [38], вагинальном

смыве [39], моче [40] — следует учитывать возможные артефакты, связанные с присутствием в этих образцах белков, способных интерферировать с изучаемыми объектами, — так называемого “матричного эффекта”. Так, известно, что в зависимости от среды или буфера, в которых проводят анализ белков, в том числе цитокинов, отношение значимого сигнала к фоновому может сильно отличаться [41].

Апробация разработанного нами мультиплексного анализа проведена в среде для выращивания клеточных культур — RPMI-1640. Точность анализа оценивали путем сравнения концентраций воспалительных белков в буфере PBSAP и в культуральной среде во всем диапазоне концентраций. Для выявления возможного матричного эффекта проведено сравнение результатов анализа образцов, содержащих разные концентрации биомаркеров, в среде RPMI-1640 с добавлением и без добавле-



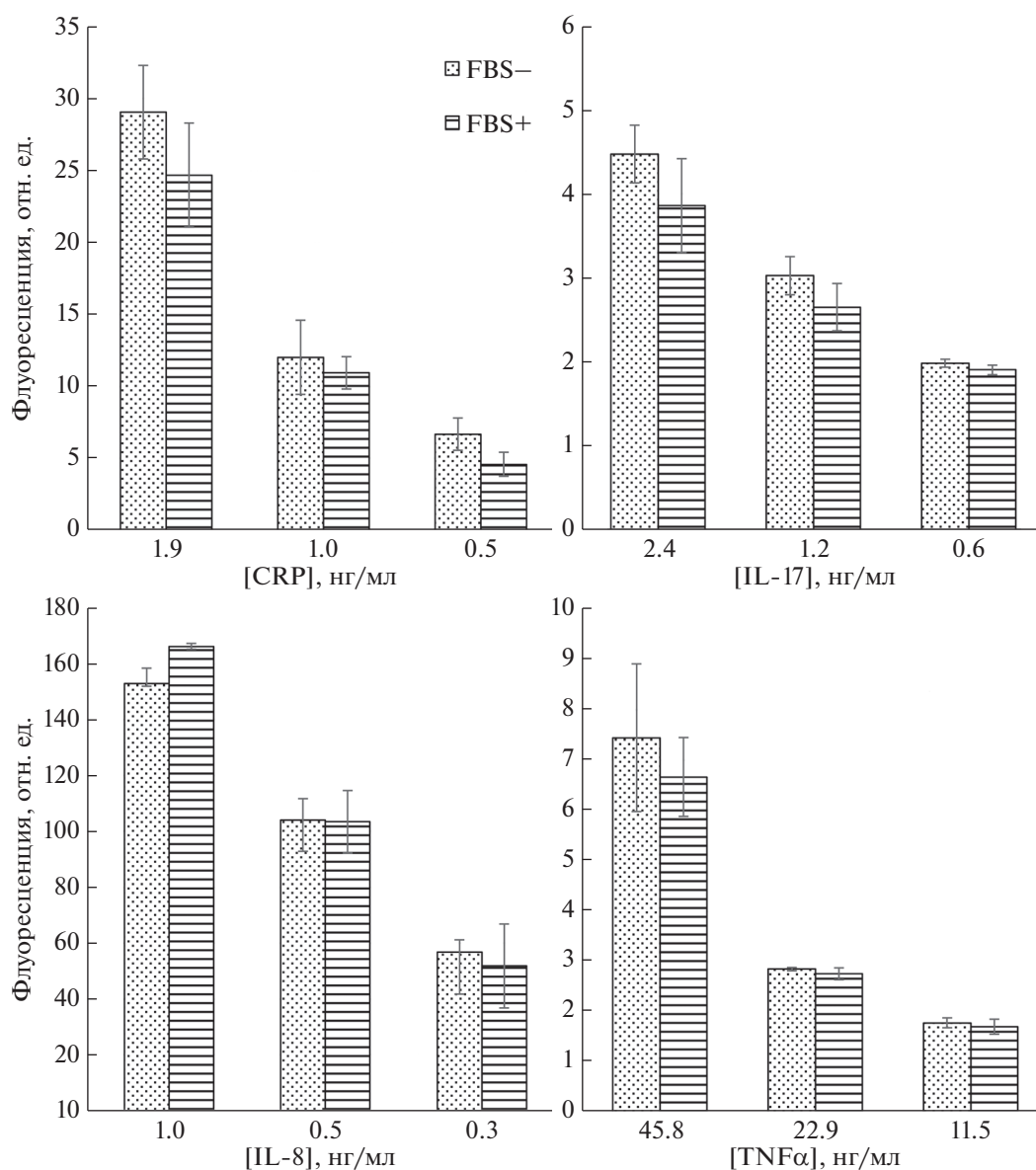


Рис. 5. Сравнительный анализ интенсивности флуоресценции при количественном определении белков CRP, TNF $\alpha$ , IL-8 и IL-17 в среде RPMI-1640 без FBS (FBS–) и с 10% FBS (FBS+).

ния FBS. По результатам проведенного анализа получена высокая корреляция значений добавленной (“истинной”) и измеренной концентраций проанализированных белков (коэффициент корреляции Пирсона 0.96–0.99 в зависимости от антигена) (рис. 4). Также выявлено отсутствие статистически значимых различий в интенсивности флуоресценции при анализе белков в среде RPMI-1640 с добавлением и без добавления FBS (рис. 5). На основании полученных данных можно сделать вывод, что, несмотря на возможное влияние среды и сыворотки животного происхождения, разработанный мультиплексный метод позволяет определять концентрацию исследованных цитокинов и острофазных белков как в

солевом буфере (PBSAP), так и в среде для культивирования клеток RPMI-1640.

Таким образом, в работе показана принципиальная возможность использования гидрогелевых биочипов в качестве аналитического инструмента для мультиплексного анализа различных биомаркеров воспаления. Панель биомаркеров может быть заменена и/или расширена в зависимости от поставленной задачи.

Технологии биочипов сейчас широко применяются как в научных исследованиях, так и в клинических лабораториях, а для получения изображений биочипов используют различные анализаторы. К достоинствам разработанного нами



метода относится возможность регистрации флуоресцентных сигналов как на биочип-анализаторе, разработанном в ИМБ РАН, так и на биочип-сканерах других производителей (например, GenePix 4200A фирмы “Molecular Devices” (США) с прилагаемым программным обеспечением). Это обусловлено тем, что при проведении анализа предполагается построение калибровочной кривой на основе результатов анализа на биочипах стандартных образцов с известным содержанием антигенов.

Описанный мультиплексный метод может стать удобным инструментом для решения исследовательских задач в экспериментах *in vitro*, моделирующих патологические процессы, происходящие в живом организме: аутоиммунные, аллергические, злокачественные и другие.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (соглашение № 19-15-00283).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований, выполненных с использованием биологических материалов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Paquette S.G., Banner D., Zhao Z., Fang Y., Huang S.S.H., León A.J., Ng D.C.K., Almansa R., Martin-Loeches I., Ramirez P., Socias L., Loza A., Blanco J., Sansonetti P., Rello J., Andaluz D., Shum B., Rubino S., de Lejarazu R.O., Tran D., Delogu G., Fadda G., Krajden S., Rubin B.B., Bermejo-Martin J.F., Kelvin A.A., Kelvin D.J. (2012) Interleukin-6 is a potential biomarker for severe pandemic H1N1 influenza a infection. *PLoS One*. **7**, e38214. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038214>
- Gabay C. (2006) Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res. Ther.* **8**, Suppl. 2(Suppl. 2): S3. <https://doi.org/10.1186/ar1917>
- Sommer A., Fabri M. (2015) Vitamin D regulates cytokine patterns secreted by dendritic cells to promote differentiation of IL-22-producing T cells. *PLoS One*. **10**, e0130395. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130395>
- De Simone V., Franzè E., Ronchetti G., Colantoni A., Fantini M.C., Di Fusco D., Sica G.S., Sileri P., MacDonald T.T., Pallone F., Monteleone G., Stolfi C. (2015) Th17-type cytokines, IL-6 and TNF- $\alpha$  synergistically activate STAT3 and NF- $\kappa$ B to promote colorectal cancer cell growth. *Oncogene*. **34**, 3493–3503. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.286>
- Smith H.O., Stephens N.D., Qualls C.R., Fligelman T., Wang T., Lin C.-Y., Burton E., Griffith J.K., Pollard J.W. (2013) The clinical significance of inflammatory cytokines in primary cell culture in endometrial carcinoma. *Mol. Oncol.* **7**, 41–54. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.07.002>
- Gonçales J.P., Nobrega C.G.O., Nascimento W.R.C., Lorena V.M.B., Peixoto D.M., Costa V.M.A., Barbosa C.S., Solé D., Sarinho E.S.C., Souza V.M.O. (2020) Cytokine production in allergic and *Trichuris trichiura*-infected children from an urban region of the Brazilian northeast. *Parasitol. Int.* **74**, 101918. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.04.015>
- Elisia I., Nakamura H., Lam V., Hofs E., Cederberg R., Cait J., Hughes M.R., Lee L., Jia W., Adomat H.H., Guns E.S., McNagny K.M., Samudio I., Krystal G. (2016) DMSO represses inflammatory cytokine production from human blood cells and reduces autoimmune arthritis. *PLoS One*. **11**, e0152538. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152538>
- Monastero R.N., Pentyala S. (2017) Cytokines as biomarkers and their respective clinical cutoff levels. *Int. J. Inflamm.* **2017**, 4309485. <https://doi.org/10.1155/2017/4309485>
- Watanabe S., Ogura N., Akutsu M., Kawashima M., Hattori T., Yano T., Ito K., Kondoh T. (2017) Pro-inflammatory cytokine production in co-culture of human monocytes and synovial fibroblasts from the human temporomandibular joint. *Int. J. Oral Med. Sci.* **15**, 107–113. <https://doi.org/10.5466/ijoms.15.107>
- Karlsen T.A., Brinchmann J.E. (2019) Expression of inflammatory cytokines in mesenchymal stromal cells is sensitive to culture conditions and simple cell manipulations. *Exp. Cell Res.* **374**, 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.11.014>
- Prunet C., Montange T., Vêjux A., Laubriet A., Rohmer J.F., Riedinger J.M., Athias A., Lemaire-Ewing S., Néel D., Petit J.M., Steinmetz E., Brenot R., Gambert P., Lizard G. (2006) Multiplexed flow cytometric analyses of pro- and anti-inflammatory cytokines in the culture media of oxysterol-treated human monocytic cells and in the sera of atherosclerotic patients. *Cytom. Part A*. **69**, 359–373. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20272>
- Manfè V., Fleckner J., Nørby Lisby P., Zhang B., Dai H.J., Keller P. (2015) Cytokine detection and simultaneous assessment of rheumatoid factor interference in human serum and synovial fluid using high-sensitivity protein arrays on plasmonic gold chips. *BMC Biotechnol.* **15**, 73. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0186-0>
- Song J., Merbs S.L., Sokoll L.J., Chan D.W., Zhang Z. (2019) A multiplex immunoassay of serum biomarkers for the detection of uveal melanoma. *Clin. Proteomics.* **16**, 10. <https://doi.org/10.1186/s12014-019-9230-8>
- Manglani M., Rua R., Hendricksen A., Braunschweig D., Gao Q., Tan W., Houser B., McGavern D.B., Oh K. (2019) Method to quantify cytokines and chemokines in mouse brain tissue using Bio-Plex multiplex immunoassays. *Methods*. **158**, 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.02.007>
- Porsch-Özcürümez M., Kischel N., Priebe H., Splettstößer W., Finke E.J., Grunow R. (2004) Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, Western blotting, microagglutination, indirect immunofluorescence assay, and flow cytometry for serological diagnosis of tularemia. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **11**, 1008–1015. <https://doi.org/10.1128/CDLI.11.6.1008-1015.2004>

16. Грядунов Д.А., Шаскольский Б.Л., Наседкина Т.В., Рубина А.Ю., Заседателев А.С. (2018) Технология гидрогелевых биочипов ИМБ РАН: 30 лет спустя. *Acta Naturae*. **10**, 4–18. <https://doi.org/10.32607/20758251-2018-10-4-4-18>
17. Rubina A.Y., Filippova M.A., Feizkhanova G.U., Shepeliakovskaya A.O., Sidina E.I., Boziev K.M., Laman A.G., Brovko F.A., Vertiev Y.V., Zasedatelev A.S., Grishin E.V. (2010) Simultaneous detection of seven staphylococcal enterotoxins: development of hydrogel biochips for analytical and practical application. *Anal. Chem.* **82**, 8881–8889. <https://doi.org/10.1021/ac1016634>
18. Бутвиловская В.И., Цыбульская М.В., Тихонов А.А., Талибов В.О., Белоусов П.В., Сазыкин А.Ю., Шварц А.М., Путляева Л.В., Суржиков С.А., Стомахин А.А., Солопова О.Н., Рубина А.Ю. (2015) Получение рекомбинантных серпинов В3 и В4 и исследование специфичности их взаимодействия с антителами на биологическом микрочипе. *Молекуляр. биология*. **49**, 790–799.
19. Lysov Y., Barsky V., Urasov D., Urasov R., Cherepanov A., Mamaev D., Yegorov Y., Chudinov A., Surzhikov S., Rubina A., Smoldovskaya O., Zasedatelev A. (2017) Microarray analyzer based on wide field fluorescent microscopy with laser illumination and a device for speckle suppression. *Biomed. Opt. Express*. **8**, 4798. <https://doi.org/10.1364/boe.8.004798>
20. Rubina A.Y., Dementieva E.I., Stomakhin A.A., Darii E.L., Pan'kov S.V., Barsky V.E., Ivanov S.M., Konovalova E.V., Mirzabekov A.D. (2003) Hydrogel-based protein microchips: manufacturing, properties, and applications. *Biotechniques*. **34**, 1008–1022.
21. Gu Y., Hu X., Liu C., Qv X., Xu C. (2008) Interleukin (IL)-17 promotes macrophages to produce IL-8, IL-6 and tumour necrosis factor- $\alpha$  in aplastic anaemia. *Br. J. Haematol.* **142**, 109–114. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07161.x>
22. Chow A.W., Liang J.F., Wong J.S., Fu Y., Tang N.L., Ko W. (2010) Polarized secretion of interleukin (IL)-6 and IL-8 by human airway epithelia 16HBE14o- cells in response to cationic polypeptide challenge. *PLoS One*. **5**, e12091. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012091>
23. Zhao X., Sun X., Gao F., Luo J., Sun Z. (2011) Effects of ulinastatin and docataxel on breast tumor growth and expression of IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$ . *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **30**(1), 22. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-22>
24. Zhao Q., Kim T., Pang J., Sun W., Yang X., Wang J., Song Y., Zhang H., Sun H., Rangan V., Deshpande S., Tang H., Cvijic M.E., Westhouse R., Olah T., Xie J., Struthers M., Salter-Cid L. (2017) A novel function of CXCL10 in mediating monocyte production of proinflammatory cytokines. *J. Leukoc. Biol.* **102**, 1271–1280. <https://doi.org/10.1189/jlb.5a0717-302>
25. Aillot L., Bonnin M., Ait-Goughoulte M., Bendriss-Vermare N., Maadadi S., Dimier L., Subic M., Scholtes C., Najera I., Zoulim F., Lucifora J., Durantel D. (2018) Interaction between Toll-like receptor 9-CpG oligodeoxynucleotides and hepatitis B virus virions leads to entry inhibition in hepatocytes and reduction of alpha interferon production by plasmacytoid dendritic cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, e01741-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01741-17>
26. Tanaka F., Migita K., Kawabe Y., Aoyagi T., Ida H., Kawakami A., Eguchi K. (2004) Interleukin-18 induces serum amyloid A (SAA) protein production from rheumatoid synovial fibroblasts. *Life Sci.* **74**, 1671–1679. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.08.025>
27. Yamada T., Wada A., Itoh K., Igari J. (2000) Serum amyloid A secretion from monocytic leukaemia cell line THP-1 and cultured human peripheral monocytes. *Scand. J. Immunol.* **52**, 7–12. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2000.00734.x>
28. Костарева О.С., Габдулхаков А.Г., Коляденко И.А., Гарбер М.Б., Тищенко С.В. (2019) Интерлейкин-17: функциональные и структурные особенности; использование в качестве терапевтической мишени. *Биохимия. Усп. биол. химии*. **59**, 393–418. <https://doi.org/10.1134/S0006297919140116>
29. Harrison O.J., Srinivasan N., Pott J., Schiering C., Krausgruber T., Ilott N.E., Maloy K.J. (2015) Epithelial-derived IL-18 regulates Th17 cell differentiation and Foxp3+ Treg cell function in the intestine. *Mucosal Immunol.* **8**, 1226–1236. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.13>
30. Okazawa A., Kanai T., Nakamaru K., Sato T., Inoue N., Ogata H., Iwao Y., Ikeda M., Kawamura T., Makita S., Uraushihara K., Okamoto R., Yamazaki M., Kurimoto M., Ishii H., Watanabe M., Hibi T. (2004) Human intestinal epithelial cell-derived interleukin (IL)-18, along with IL2, IL-7 and IL-15, is a potent synergistic factor for the proliferation of intraepithelial lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* **136**, 269–276. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02431.x>
31. Chen W., Pilling D., Gomer R.H. (2017) C-reactive protein (CRP) but not the related pentraxins serum amyloid P and PTX3 inhibits the proliferation and induces apoptosis of the leukemia cell line Mono Mac 6. *BMC Immunol.* **18**, 47. <https://doi.org/10.1186/s12865-017-0230-z>
32. Kijanka G., IpCho S., Baars S., Chen H., Hadley K., Beveridge A., Gould E., Murphy D. (2009) Rapid characterization of binding specificity and cross-reactivity of antibodies using recombinant human protein arrays. *J. Immunol. Methods*. **340**, 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2008.10.008>
33. Predki P.F., Mattoon D., Bangham R., Schweitzer B., Michaud G. (2005) Protein microarrays: a new tool for profiling antibody cross-reactivity. *Hum. Antibodies*. **14**, 7–15. <https://doi.org/10.3233/hab-2005-141-202>
34. Arora M. (2013) Cell culture media: a review. *Mater. Methods*. **3**, 175. <https://doi.org/10.13070/mm.en.3.175>
35. Yang Z., Xiong H.-R. (2012) Culture conditions and types of growth media for mammalian cells. In: *Bio-medical Tissue Culture*. Eds Ceccherini-Nelly L., Matteoli B. InTech, 1–16. <https://doi.org/10.5772/52301>
36. Galesi A.L.L., Tamashiro W.M.S.C., Moraes A.M. (2004) The effect of medium composition on interleukin-2 production by murine EL-4 thymoma cells. *Bra-*

- zilian J. Chem. Eng.* **21**, 165–173.  
<https://doi.org/10.1590/S0104-66322004000200005>
37. Datta P. (2019) Overview of other sources of interferences in immunoassays. In: *Accurate Results in the Clinical Laboratory*. Elsevier, 75–82.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813776-5.00007-8>
38. Browne R.W., Kantarci A., LaMonte M.J., Andrews C.A., Hovey K.M., Falkner K.L., Cekici A., Stephens D., Genco R.J., Scannapieco F.A., van Dyke T.E., Wactawski-Wende J. (2013) Performance of multiplex cytokine assays in serum and saliva among community-dwelling postmenopausal women. *PLoS One*. **8**, e59498.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059498>
39. Fichorova R.N., Richardson-Harman N., Alfano M., Belec L., Carbonneil C., Chen S., Cosentino L., Curtis K., Dezzutti C.S., Donoval B., Doncel G.F., Donaghay M., Grivel J.C., Guzman E., Hayes M., Herold B., Hillier S., Lackman-Smith C., Landay A., Margolis L., Mayer K.H., Pasicznyk J.M., Pallansch-Cokonis M., Poli G., Reichelderfer P., Roberts P., Rodriguez I., Saidi H., Sassi R.R., Shattock R., Cummins J.E. (2008) Biological and technical variables affecting immunoassay recovery of cytokines from human serum and simulated vaginal fluid: a multicenter study. *Anal. Chem.* **80**, 4741–4751.  
<https://doi.org/10.1021/ac702628q>
40. Wood M.W., Nordone S.K., Vaden S.L., Breitschwerdt E.B. (2011) Assessment of urine solute and matrix effects on the performance of an enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of interleukin-6 in dog urine. *J. Vet. Diagn. Investig.* **23**, 316–320.  
<https://doi.org/10.1177/104063871102300219>
41. de Jager W., Prakken B., Rijkers G.T. (2009) Cytokine multiplex immunoassay: methodology and (clinical) applications. In: *T Cell Protocols. Methods in Molecular Biology™*. Ed. De Libero G., vol. 514. Humana Press, 119–133.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-60327-527-9\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-527-9_9)

## MICROARRAY FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF INFLAMMATORY BIOMARKERS IN A CULTURE MEDIUM

S. A. Voloshin<sup>1</sup>, G. U. Feyzkhanova<sup>1</sup>, E. N. Savvateeva<sup>1</sup>, O. V. Smoldovskaya<sup>1</sup>, and A. Yu. Rubina<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

\*e-mail: allarubina@hotmail.com

Cytokines and acute phase proteins play an important role in the development of the immune response during inflammatory reactions. Depending on the type of disease, the development of inflammation is accompanied by changes in concentrations (both decrease and increase) of not one, but many biomarkers of inflammation. Here, a quantitative method for multiplex immunoassay of eight biomarkers of human inflammation, namely acute phase proteins (C-reactive protein, serum amyloid protein A) and cytokines (IL-6, IL-8, IL-17, IL-18, IP10/CXCL10, TNF $\alpha$ ) on microarrays was developed and the possibility of its use for the detection of inflammatory biomarkers in a culture medium has been demonstrated. The developed method can be used to evaluate changes of inflammatory biomarkers profile induced by different agents or to determine the concentration of biomarkers after activation of cells while studying different diseases with the help of *in vitro* models.

**Keywords:** immunoassay, inflammatory proteins, culture medium, microarray