

На правах рукописи

Малащенко Владимир Владимирович

**ГРАНУЛОЦИТАРНЫЙ КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩИЙ
ФАКТОР В МОДУЛЯЦИИ АДАПТИВНОГО
ИММУНОГЕНЕЗА**

03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Томск – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования "Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта"

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук,
профессор

Селедцов Виктор Иванович

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук,
профессор кафедры
патофизиологии ФГБОУ ВО
СибГМУ Минздрава России

Чумакова Светлана Петровна

Кандидат биологических наук,
заведующий лабораторией
иммунорегуляции отдела
иммунологии ФГБНУ "Институт
экспериментальной медицины"

Кудрявцев Игорь Владимирович

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук

Защита состоится «___» _____ 2020 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу 634050, г Томск, Московский тракт, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России и на сайте <http://www.ssmu.ru>

Автореферат разослан _____

Ученый секретарь
диссертационного совета

Петрова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Основное назначение иммунной системы – поддержание антигенного гомеостаза организма и элиминация патогенов. Это достигается средствами сложно организованных механизмов взаимодействия врожденных и адаптивных компонентов иммунной системы, имеющих многочисленные уровни регуляции. Одними из ключевых типов клеток участвующих в иммунологических процессах являются с одной стороны, клетки миелоидного ряда, такие как гранулоциты и моноцит/макрофаги (Мц/Мф) и с другой, лимфоидные клетки, подразделяющиеся на Т- и В-лимфоциты (Gause K.T., et al., 2017). Ключевыми цитокинами участвующими в формировании и созревании различных иммунных клеток являются гемопоэтины, к которым относятся: эритропоэтин (EPO), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) (также известный как CSF2), макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF) (также известный как CSF1) и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) (также известный как CSF3). В последнее время показано, что гемопоэтины, как и многие другие цитокины обладают плеiotропным спектром действия. В частности, показано, что G-CSF, в дополнение к стимулирующему действию на гранулоцитопоз, может оказывать иммуномодулирующее воздействие на макрофагальные и лимфоидные клетки (Hollmén M., et al., 2016; Bunse C.E., et al., 2016). Однако детали этого процесса остаются малоизученными. В настоящее время, G-CSF используется в практической медицине для стимуляции врожденного, противoinфекционного иммунитета. Очевидно, что G-CSF также воздействует на адаптивный иммунитет.

Степень разработанности темы. G-CSF относится к цитокинам 1 типа, в эту группу также входят EPO, IL-6, гормон роста и онкостатин (Brooks A.J., et al., 2016). Он кодируется геном, расположенным в локусе q11.2-q12 17 хромосомы. G-CSF представляет собой 174-аминокислотный спиральный белок с 4 антипараллельными α -спиралями, пересекающимися под углом ~ 18 градусов соединёнными с помощью двух длинных и одной короткой петель (Hausberger A., et al., 2016). G-CSF является ключевым гемопоэтином в формировании колоний гранулоцитов. Он стимулирует пролиферацию поздних клеток предшественников (Bendall L.J., Bradstock K.F., 2014; Boettcher S., Manz M.G., 2017), а также регулирует функции зрелых нейтрофилов и способствует увеличению продолжительности жизни этих клеток (Bajrami B., et al., 2016; Liska M.G., dela Peña I., 2017; Marini O., et al., 2017). G-CSF продуцируется широким спектром клеток: стромальными клетками костного мозга, фибробластами, эндотелиальными клетками, астроцитами (Carr M.J., et al., 2017; Katakura F., et al., 2019), Мц/Мф и лимфоцитами (Horiguchi H., Oguma E., 2016; Pedersen C.C., et al., 2016). Продукция G-CSF в большинстве случаев является индуцибельной, то есть зависимой от клеточного микроокружения (Horiguchi H., Oguma E., 2016). Эффекты G-CSF обусловлены его высоко специфическим взаимодействием со своим рецептором G-CSFR (CD114) (Liang W., Ferrara N., 2016). Рецептор G-CSF относится к семейству цитокиновых рецепторов I-го типа. Это единственный трансмембранный белок, не обладающий собственной киназной активностью. Он состоит из цитокинового, рецепторного, иммуноглобулин (Ig)-подобного, трех фибронектин III (FNIII)-подобных доменов и консервативной цитоплазматической последовательности (Liang W., Ferrara N., 2016; Bakherad H., et al., 2017). Как уже было упомянуто, гемопоэтические клетки предшественники и нейтрофилы не единственные клетки мишени для G-CSF, его рецептор обнаружен на широком спектре клеток, включая Мц/Мф (Christopher M.J., et al., 2011; Campbell I.K., et al., 2016;

Hollmén M., et al., 2016) и лимфоциты (Touw I.P., van de Geijn G.J., 2007; MacDonald K.P., et al., 2014; Bunse C.E., et al., 2016; Peng W., 2017) G-CSF способствует клеточной миграции, пролиферации и дифференцировке посредством мультимеризации лиганд-рецепторных комплексов с последующей активацией внутриклеточных Jak/Stat/SOCS, Rac/Raf/Erk и PI3/Akt путей (Maxson J.E., et al., 2016; Zhao S., et al., 2017). Эти реакции регулируют активность различных транскрипционных факторов, тем самым оказывая влияние на белковый синтез.

G-CSF играет ключевую роль в поддержании врожденного иммунитета. Мы предполагаем, что G-CSF так же напрямую вовлечен в регуляцию адаптивного иммуногенеза на различных стадиях его развития, и эта регуляция может в значительной степени базироваться на его непосредственном влиянии на функциональную активность Мф и лимфоидных клеток. Для определения активационного статуса и функциональной активности макрофагальных клеток мы анализировали экспрессию поверхностных молекул CD16 (низкоаффинный Fc-рецептор), CD119 (рецептор IFN- γ), CD124 (рецептор IL-4), CD197 (C-C-рецептор хемокина 7), а также продукцию цитокинов IL-1 β , IL-6, IL-10, и TNF- α . Идентификацию Т-клеточных субпопуляций осуществляли по экспрессии молекул CD4, CD45RA и CD197. Активационный статус Т-клеток оценивали по экспрессии молекул CD25 (α -цепь рецептора IL-2) и CD38 (циклическая ADP рибозогидролаза) и продукции цитокинов: IL-2, IL-4, IL-10 и IFN- γ .

Цель исследования: изучить эффекты G-CSF на функциональную активность клеток, участвующих в адаптивных иммунных реакциях.

В рамках указанной цели ставились следующие задачи:

1. Охарактеризовать прямые эффекты G-CSF на Мц/Мф по количеству клеток экспрессирующих молекулы: CD16, CD119, CD124, CD197.
2. Оценить влияние G-CSF на макрофагальную продукцию иммунорегуляторных цитокинов (TNF- α , IL-10, IL-6 и IL-1 β).
3. Оценить влияние активационных процессов и G-CSF на мембранную экспрессию G-CSFR (CD114⁺) среди Т-лимфоцитов.
4. Охарактеризовать прямые эффекты G-CSF на активацию основных Т-клеточных субпопуляций (CD4-позитивных/CD4-негативных наивных Т-лимфоцитов, Т-лимфоцитов центральной и эффектроной памяти и терминально дифференцированных Т-клеточных эффекторов) по числу CD25⁺ и CD38⁺ клеток.
5. Оценить влияние G-CSF на продукцию Т-лимфоцитами провоспалительных (IL-2, IFN- γ) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов.

Научная новизна

Впервые показано, что G-CSF способен снижать число CD119-позитивных, а также количество CD197-позитивных клеток среди активированных Мф, Представленные данные свидетельствуют о непосредственном вовлечении G-CSF в регуляцию воспалительной и миграционной активности Мц/Мф. Впервые показана способность G-CSF прямо влиять на активацию Т-лимфоцитов. Установлено, что G-CSF может снижать продукцию IFN- γ и усиливать продукцию IL-4 активированными Т-лимфоцитами.

Теоретическая и практическая значимость работы

Впервые продемонстрирована значимость G-CSF в непосредственной регуляции адаптивного иммуногенеза. Показано, что G-CSF способен прямо влиять на функциональную активность как Мц/Мф, так и Т-лимфоцитов. Эти данные открывают новые перспективы использования G-CSF как иммуномодулирующего препарата. Результаты диссертационной работы используются в учебном процессе в Центре медицинских биотехнологий БФУ им. И.Канта.

Методология и методы исследования

В работе использовались современные высокоинформативные методы, позволяющие детально оценить функциональное состояние иммунокомпетентных клеток. Объектом исследования выступали первичные культуры Мц/Мф и Т-лимфоцитов, выделенные из мононуклеарных клеток (МНК) венозной периферической крови условно здоровых доноров.

В диссертационной работе использовались следующие методы исследования: градиентное центрифугирование на фиколле для выделения МНК, позитивная колоночная магнитная сепарация (получение чистых CD14 и CD3 позитивных клеток), культуральные методы, определение мембранной экспрессии молекул (CD14, CD16, CD119, CD124, CD3, CD4, CD45RA, CD197, CD25 и CD38) методом проточной цитометрии, определение концентрации цитокинов (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, IL-2, IFN- γ и IL-4) в культуральных супернатантах методом иммуноферментного анализа, методы статистического анализа результатов. Проверка гипотезы о нормальности распределения результатов по критерию Колмогорова-Смирнова. Средне выборочная характеристика: медиана (M), первый и третий квартили (Q1, Q3). Оценка статистической достоверности различий между выборками, не подчиняющимися закону о нормальном распределении, проводилась с использованием непараметрического критерия Вилкоксона для зависимых выборок.

Положения, выносимые на защиту

1. G-CSF играет значимую роль в аутокринной и паракринной регуляции функциональной активности Мц/Мф. Он препятствует развитию классической (M1) активации макрофагальных клеток.
2. G-CSF оказывает непосредственное влияние на активацию Т-лимфоцитов и способен усиливать их противовоспалительную активность.
3. G-CSF сдерживает провоспалительные макрофагальные реакции и способствует развитию иммунных процессов, опосредуемых Th 2 типа.

Степень достоверности и апробация результатов

Достаточный объем экспериментального материала, использование современного высокотехнологичного оборудования и высокоинформативных методов исследования в сочетании с адекватными критериями статистической обработки результатов позволяют говорить о высокой степени достоверности полученных результатов.

Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на Всероссийской научно-практической школе-конференции «Аллергология и клиническая иммунология (иммунодиагностика, иммунопрофилактика и иммунотерапия)» (г. Ялта, 2015 г.); I-м Калининградском научном иммунологическом форуме (г. Калининград, 2016 г.); Всероссийской научно-практической школе-конференции «Аллергология и клиническая иммунология» (г. Сочи, 2019 г.).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 8 научных работ, из них в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, определенных ВАК РФ – 6 полнотекстовых статей; в материалах конференций и симпозиумов – 2 статьи и тезиса.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 106 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 60 рисунками и 1 таблицей. Библиографический указатель включает 203 источника (8 отечественных и 195 иностранных).

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие, на всех этапах создания диссертации начиная с разработки дизайна и планирования исследования и заканчивая получением, анализом и обобщением результатов представленных в выводах.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Материалы, послужившие основой для данной работы, получены в результате исследования крови 42 условно здоровых доноров в возрасте от 21 до 40 лет, мужского и женского пола.

Критериями исключения из исследуемой группы были: период обострения хронических заболеваний, наличие онкологических, аутоиммунных, аллергических, психических, инфекционных и наследственных заболеваний; наличие наркотической или алкогольной зависимости. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом (решение № 7 от 10 марта 2015 года) и проводилось под руководством доктора медицинских наук, профессора Селедцова В.И. на базе Центра медицинских биотехнологий БФУ им. И. Канта.

В работе были использованы две исследовательские модели. Моноцит/макрофагальная и Т-клеточная модели (**Рисунок 1**) позволяли оценивать прямые эффекты G-CSF на поверхностные и цитокин-продуцирующие свойства Мц/Мф и Т-лимфоцитов.

Материалом исследования являлась венозная кровь в объеме 20 мл, полученная из локтевой вены стандартным методом с использованием вакуумных систем для забора крови «BD VACUTAINER™» (Greiner bio-one, Австрия) содержащих 20 Ед/мл гепарина. МНК получали из периферической крови путем центрифугирования на градиенте плотности фиколла (Ficoll-Paque™ PREMIUM, GE Healthcare, США), 1,077±0,001 г/мл. Для этого в пропорции 1:1 разводили гепаринизированную венозную кровь фосфатно-солевым буфером и аккуратно наслаивали клеточную суспензию в соотношении 3:1 на раствор фиколла. Далее пробирку с кровью помещали в центрифугу Eppendorf Centrifuge 5702R, (Eppendorf, Германия) и откручивали в течение 45 минут на скорости 1500 об/мин при 24°C. После данной процедуры, на границе плотностей растворов образовывалось кольцо МНК. Это кольцо собирали в стерильных условиях и помещали в предварительно подготовленную пробирку. Далее клетки отмывали несколько раз в большом объеме буфера посредством центрифугирования в течение 15 минут при 1500 об/мин. Полученный клеточный осадок разводили в фосфатно-солевом буфере и использовали для получения чистых Мц/Мф и Т-лимфоцитов.

Получение монокультур CD14⁺ клеток (Мц/Мф) и CD3⁺ клеток (Т-лимфоцитов) осуществляли методом позитивной, колоночной иммуномагнитной сепарации. В

основе использованного нами метода лежит технология MACS (magnetic-activated cell sorting), (Miltenyi Biotec, Германия), базирующаяся на использовании специфических антител, конъюгированных с суперпарамагнитными частицами MACS MicroBeads.

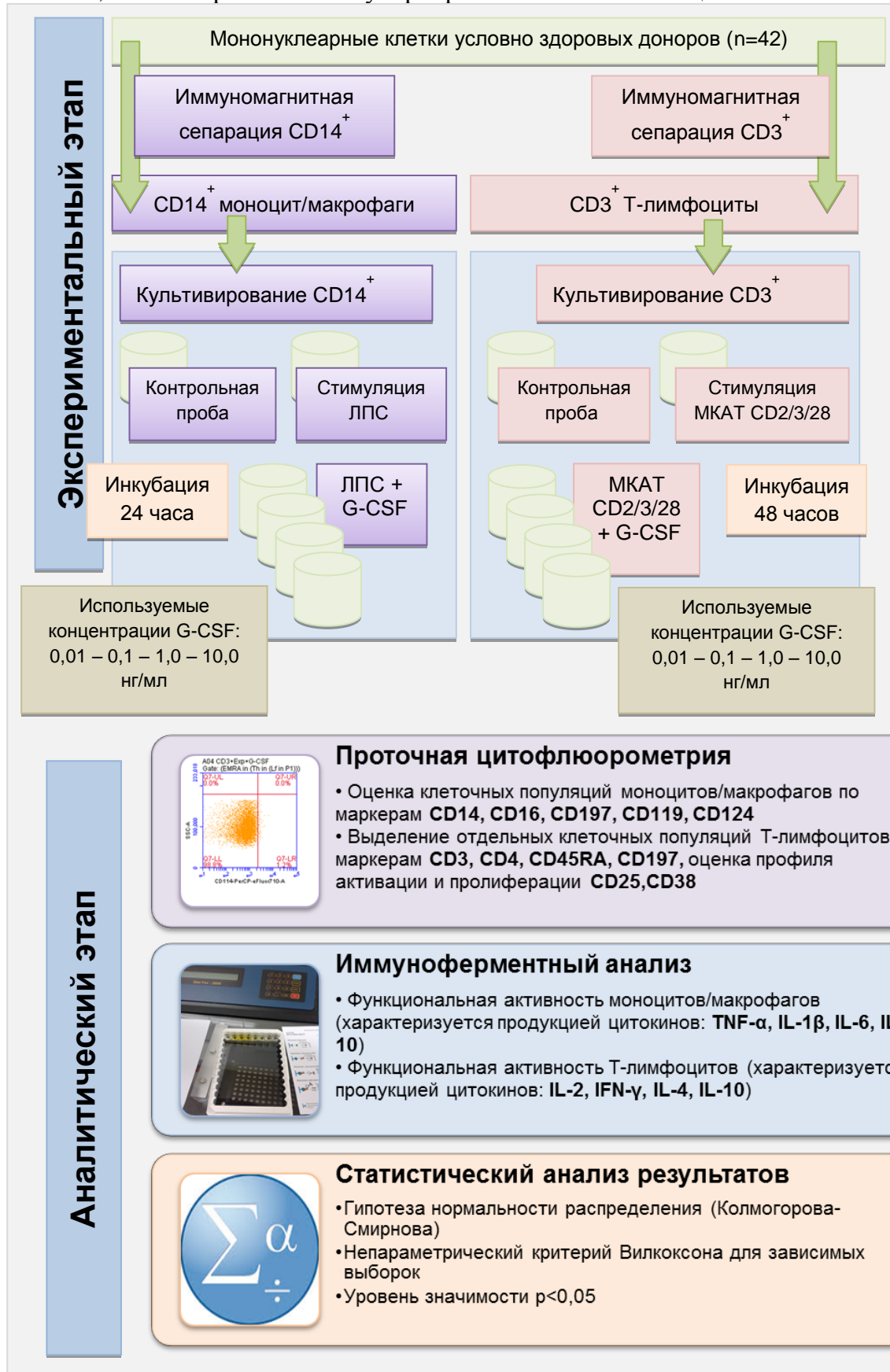


Рисунок 1 – Дизайн исследования.

В наших исследованиях мы использовали human CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Германия) и human CD3 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Германия). В соответствии с инструкцией производителя мы добавляли взвесь частиц в клеточную суспензию, где за счет высокоспецифичных взаимодействий по типу антиген-антитело, интересующие нас клетки (Мц/Мф или Т-лимфоциты) приобретали суперпарамагнитную метку. Далее клетки помещали в специальный буфер для сепарации и вносили полученную клеточную суспензию в колонки LS Columns (Miltenyi Biotec, Германия) со специальным ферромагнитным матриксом, закрепленные в магнитном сепараторе QuadroMACS™ Separator (Miltenyi Biotec, Германия). В сепараторе магнитное поле захватывало и удерживало суперпарамагнитные частицы и, соответственно, клетки, на поверхности которых располагались данные частицы. Не прикрепившиеся к колонке клетки отмывали промывочным буфером. После нескольких промывок, колонка убиралась из сепаратора, в отсутствие магнитного поля, целевая клеточная фракция выходила из колонки в небольшом объеме специального буфера. Частицы MACS MicroBeads – биodeградируемые, что позволяло минимизировать их воздействие на жизнеспособность, активационный потенциал и функциональную активность выделенных клеток. Выделенные монокультуры CD3⁺ и CD14⁺ помещали в культуральную среду TechMACS Medium (Miltenyi Biotec, Германия).

Непосредственно перед культивированием проводили подсчет клеток, оценку их жизнеспособности и чистоты. Для подсчета клеток использовали автоматический счетчик частиц Z2 COULTER COUNTER Analyzer, (Beckman coulter, США), принцип работы которого базируется на технологии распределения частиц по размеру на основе определения изменения электрического сопротивления жидкости за счет частиц, проходящих в электрическом поле через отверстие между двумя электродами (изменение сопротивления было пропорционально объему частицы). Жизнеспособность и чистоту выделенных клеток осуществляли методом проточной цитофлуориметрии на приборе BD Accuri®C6 Flow Cytometer, (BD Biosciences, США) с использованием возможностей программного обеспечения C6Flow Plus. Для определения жизнеспособности использовали флуоресцентный краситель пропидиум иодид (PI) (eBioscience, Германия). Это интерколирующий флуоресцентный краситель, который избирательно проникает через мембрану мертвых клеток. Соответственно клетки, окрашенные этим красителем, считаются мертвыми. Для определения чистоты, выделенные клетки окрашивали анти-CD14 антителами, конъюгированными с (PerCP) (eBioscience, Германия) или анти-CD3 антителами, конъюгированными с PE (eBioscience, Германия). Оценка жизнеспособности и подсчет клеток проводили до и после их культивирования.

Выделенные CD14⁺ Мц/Мф рассаживали в 24-луночный планшет и культивировали в концентрации $1,0-1,5 \times 10^6$ кл/мл в бессывороточной среде TechMACS Medium (Miltenyi Biotec, Германия), содержащей 5×10^{-5} М М2-меркаптоэтанола (Acros Organics, США), в течение 24 ч, при 37°C, во влажной атмосфере с 5% CO₂.

Для активации Мц/Мф мы использовали бактериальный ЛПС (Пирогенал, МЕДГАМАЛ ФНИЦЭМ им. Н.Ф. ГАМАЛЕИ, Россия) в концентрации 1 мкг/мл. Рекомбинантный G-CSF (human G-CSF, research grade) (Miltenyi Biotec, Германия) в концентрациях 0,01, 0,1, 1,0 10,0 нг/мл добавляли к клеткам вместе с ЛПС в самом начале их культивирования.

После культивирования клетки собирали и анализировали их поверхностные свойства методом проточной цитофлуориметрии, а надосадочную жидкость оценивали на содержание цитокинов иммуноферментным методом.

Выделенные CD3⁺ Т-лимфоциты рассаживали в 24-луночный планшет и культивировали в концентрации $1,0-1,5 \times 10^6$ кл/мл в бессывороточной среде TexMACS Medium (Miltenyi Biotec, Германия), содержащей 5×10^{-5} М 2-меркаптоэтанола (Acros Organics, США), в течение 48 ч, при 37°C, во влажной атмосфере с 5% CO₂.

Для активации Т-клеток использовали частицы, конъюгированные с антителами к молекулам CD2, CD3 и CD28 (T Cell Activation/Expansion Kit, MACS Miltenyi Biotec, Германия), которые при взаимодействии с Т-лимфоцитами имитируют действие АПК. Рекомбинантный G-CSF (human G-CSF, research grade) (Miltenyi Biotec, Германия) в концентрациях 0,01, 0,1, 1,0, 10,0 нг/мл добавляли к клеткам вместе с активирующими частицами в самом начале их культивирования.

После культивирования клетки отмывали, затем окрашивали с помощью коктейлей меченных антител, помещали в специальные пробирки и анализировали их на наличие поверхностных маркеров на проточном цитофлуориметре BD Accuri®C6 Flow Cytometer, (BD Biosciences, США).

Для окрашивания Мц/Мф использовали коктейль антител, включающий в себя PerCP-меченные анти-CD14 (eBioscience, Германия), FITC-меченные анти-CD16, PE-меченные анти-CD119, APC-меченные анти-CD124 и PE/Alexa Fluor® 488-меченные анти-CD197 антитела (BioLegend, США) (**Рисунок 2**). Окрашивание проводили строго по инструкции компании-производителя антител. Для адекватного отображения данных флуоресценции и настройки цветовых компенсаций использовали одноцветные и ФМО (флуоресценция минус один) контроли. Для выставления границ зоны позитивного окрашивания использовали неокрашенные, одноцветные и ФМО-контроли. Для анализа неспецифического связывания использовали изотип-контроли (Iso) для IgG1 и IgG2a: Iso IgG2a, меченный APC, PE, AF488 и Iso IgG1-меченный PE (BioLegend, США). Анализ и обработку полученных результатов проводили с использованием специализированного программного обеспечения CSampler Software (BD Biosciences, США).

Для идентификации Т-клеточных субпопуляций и определения их активационного статуса использовали следующие меченные флуорохромами антитела: CD114-FITC, CD4-PerCP (eBioscience, Германия), CD45RA-APC, CD197-PE (BD Pharmingen, США), CD25-FITC и CD38-AF488 (BioLegend, США) (**Рисунок 3**).

Для предотвращения возможных неспецифических взаимодействий использовали блокатор Fc-рецепторов (Miltenyi Biotec, Германия). Клетки окрашивали в точном соответствии с инструкциями компаний-производителей используемых антител. Для оценки неспецифического связывания использовали изотипические контроли, в частности: Iso MOPC-21 для IgG1 и Iso MPC-11 для IgG2b. Выставление зон негативного окрашивания проводили с использованием неокрашенных, одноцветных и ФМО-контролей. Обработку и анализ цитометрических данных проводили с помощью программного обеспечения CSampler Software (BD Biosciences, США).

Содержание цитокинов в клеточных супернатантах определяли методом ИФА с использованием коммерческих тест-систем компании «Вектор Бест», согласно приложенным инструкциям. Результаты оценивали на автоматическом

комбинированном иммуноферментном и биохимическом анализаторе «ChemWell 2910», (Awareness Technology, inc., США).

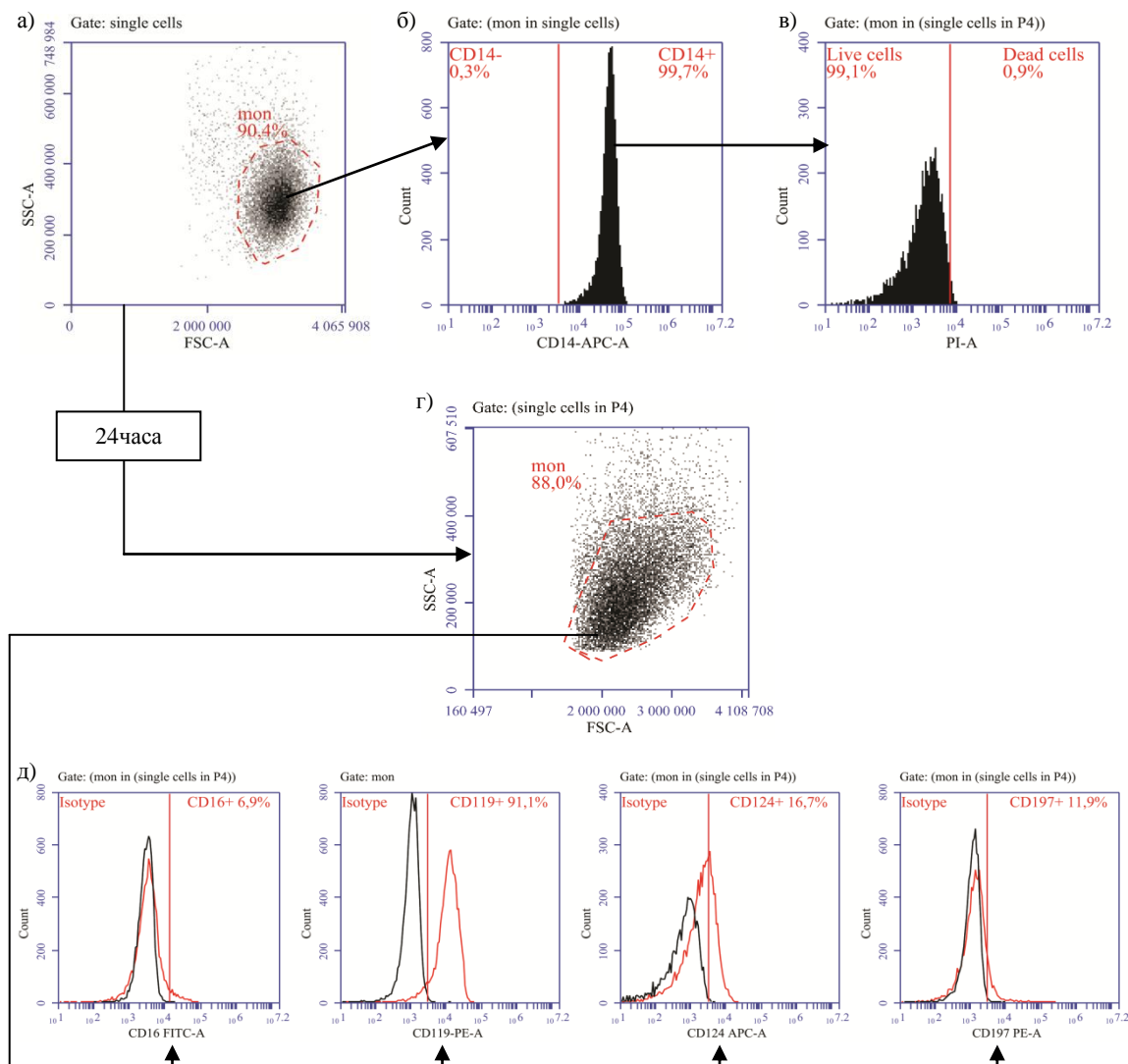


Рисунок 2 – Алгоритм цитометрического анализа Мц/Мф.

- а) Прямое светорассеяние (FSC) против бокового светорассеяния (SSC) клеток до культивирования;
- б) гистограмма CD14⁺ клеток перед культивированием;
- в) клеточная жизнеспособность, оцененная с использованием окрашивания PI: окрашенные – мертвые клетки, неокрашенные – живые клетки;
- г) прямое светорассеяние (FSC) против бокового светорассеяния (SSC) клеток после культивирования;
- д) окрашивание CD16⁺, CD119⁺, CD124⁺ и CD197⁺ клеток из общего числа Мц/Мф.

Статистический анализ данных проводили с использованием программного обеспечения IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences, США). Проверка гипотезы о нормальности распределения результатов по критерию Колмогорова-Смирнова, показала, что выборки не имели нормального распределения. Были определены: медиана (M), первый и третий квартили (Q1, Q3). Для оценки статистической достоверности различий использовали непараметрический критерий

Вилкоксона для зависимых выборок. Различия между выборками считались значимыми при уровне $p < 0,05$.

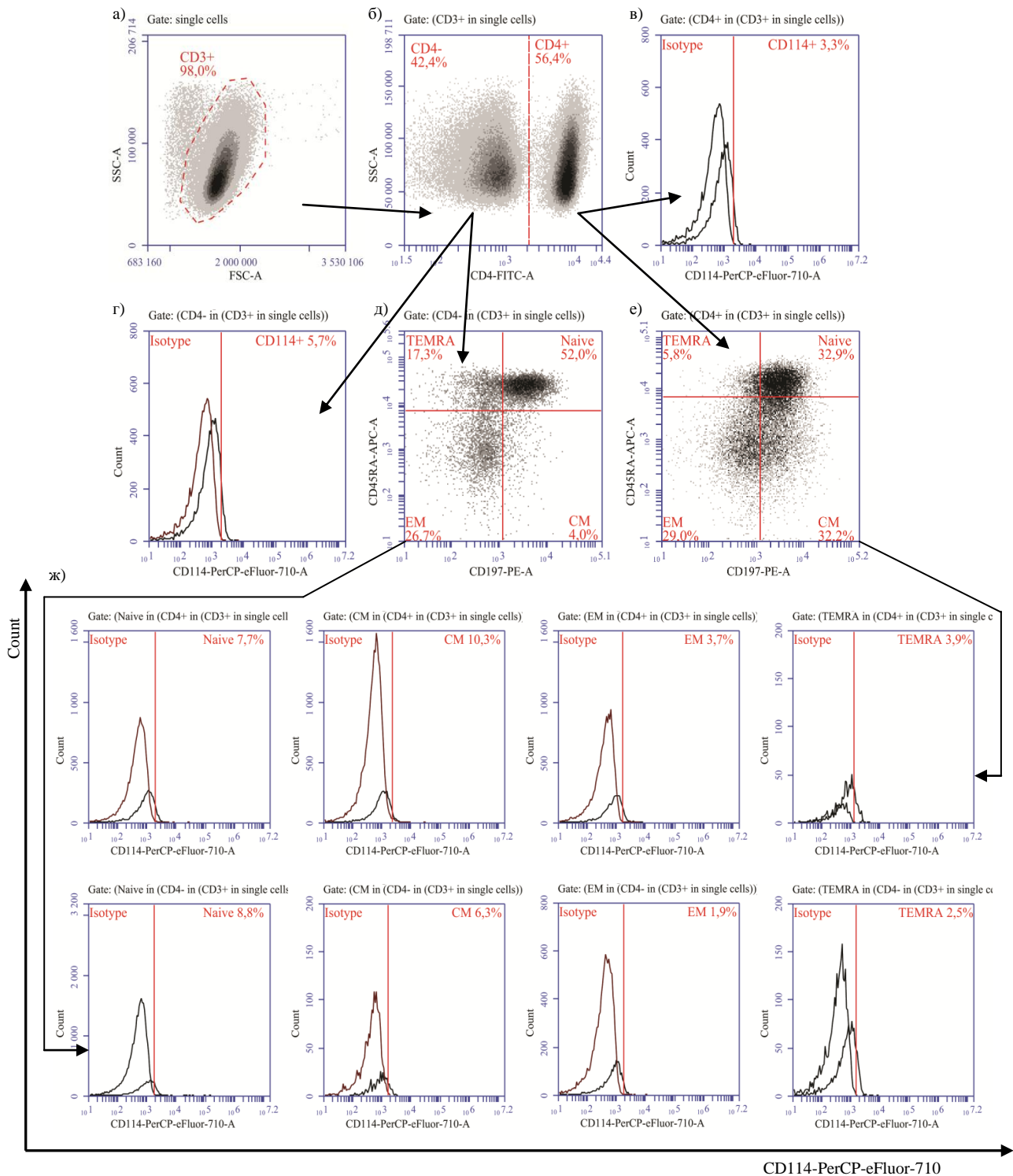


Рисунок 3 – Алгоритм цитометрического анализа экспрессии CD114 Т-лимфоцитами.

- а) прямое светорассеяние (FSC) против бокового светорассеяния (SSC);
- б) идентификация CD4-негативных и CD4-позитивных Т-клеток;
- в) окрашивание CD114⁺ Т-клеток среди CD4-позитивных Т-клеток;
- г) окрашивание CD114⁺ Т-клеток среди CD4-негативных Т-клеток;
- д) идентификация naïve Т-лимфоцитов, CM Т-лимфоцитов, EM Т-лимфоцитов и TEMRA Т-лимфоцитов среди CD4-негативных клеток по экспрессии молекул CD197 и CD45RA

- е) идентификация naïve Т-лимфоцитов, СМ Т-лимфоцитов, ЕМ Т-лимфоцитов и TEMRA Т-лимфоцитов среди CD4-позитивных клеток по экспрессии молекул CD197 и CD45RA
- ж) содержание CD114⁺ лимфоцитов среди naïve Т-лимфоцитов, СМ Т-лимфоцитов, ЕМ Т-лимфоцитов и TEMRA Т-лимфоцитов в CD4-позитивной и CD4-негативной Т-клеточных субпопуляциях.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Опосредованное G-CSF усиление лейкоцитопозеза является универсальной адаптивной реакцией не только на инфекции, но и на любые нарушения целостности органов и тканей организма. Отсюда следует, что начальные, наиболее чувствительные к иммуномодулирующим воздействиям этапы адаптивного иммунного ответа развиваются, как правило, на фоне повышенных концентраций G-CSF в клеточном микроокружении. Одним из ключевых моментов в запуске адаптивного иммунного ответа является контакт между антигенпрезентирующей клеткой и Т-лимфоцитом. В сравнении с первичным иммунным ответом, вторичный иммунный ответ имеет более выраженный характер. (Селедцов В.И., и др., 2010). В процессе формирования вторичного иммунного ответа в презентацию антигенных молекул активно вовлекаются макрофагальные клетки. После встречи с патогеном презентующие клетки активно мигрируют в Т-зависимые зоны лимфоидных органов для (Ярилин А.А., 2010; Kambayashi T., Laufer T.M., 2014). Такая клеточная миграция в значительной степени определяет дальнейшую активность как врожденного, так и адаптивного иммунитета.

Ранее в литературе была описана экспрессия G-CSFR на поверхности Мц/Мф (Hollmén M., et al., 2016). Так же стоит отметить тот факт, что ЛПС индуцирует продукцию G-CSF клетками эндотелия (Vinzens S., et al., 2017; Rizzo M.D., et al., 2019). Эти факты предполагают значимость этого цитокина в регуляции иммунных реакций на периферии.

Молекула CD16 (FcγRIII) обеспечивает вовлечение иммунокомпетентных клеток, в частности, макрофагов в процесс антителозависимой цитотоксичности (Yeap W.H., et al., 2016). В наших исследованиях не было выявлено статистически значимого изменения относительного количества CD16⁺ моноцитов/макрофагов в ответ на активационный стимул, тогда как добавление G-CSF в концентрациях 0,1 и 10,0 нг/мл к активируемым макрофагальным клеткам приводило к статистически значимому снижению относительного числа CD16⁺ клеток с 9,4 (5,2 – 21,1) % до 8,5 (4,6 – 15,1) % и до 8,8 (5,9 – 14,4) % соответственно. Это может говорить о том, что в ответ на активацию часть классических макрофагальных клеток (CD14_{high} CD16⁻), основной функцией которых является фагоцитоз (Jakubzick C.V., et al., 2017), дифференцируется в переходные CD14_{high} CD16_{low}, а в дальнейшем в не классические CD14_{low} CD16_{high}, также известные как CD14_{dim} CD16_{high} макрофаги, в большей степени специализированные на регуляции воспалительных реакций (Cros J., et al., 2010). Таким образом, можно предполагать, что на этапе формирования переходных CD14_{high} CD16_{low} макрофагов, G-CSF способен сдерживать их про-воспалительную дифференцировку.

Процесс макрофагальной активации в значительной степени определяется экспрессией на клеточной поверхности рецептора к IFN-γ (CD119) и рецептора к IL-4 (CD124). Согласно нашим данным, G-CSF во всех исследованных концентрациях способен снижать относительное количество CD119⁺ клеток (0,01 нг – с 85,5 (69,0 – 89,0) % до 81,6 (67,1 – 84,7) %; 0,1 нг – до 81,4 (67,6 – 84,9) %; 1,0 нг – до 81,2 (70,2 – 85,5) %; 10,0 нг – до 81,1 (69,5 – 85,2) %), и, таким образом, снижать

чувствительность суммарного пула макрофагальных клеток к действию INF- γ . Интересно, что при этом G-CSF не оказывал негативного влияния на количество CD124⁺ клеток, тем самым, сохраняя чувствительность моноцитов/макрофагов к противовоспалительному действию IL-4. Из этих данных следует, что G-CSF создаёт условия благоприятные для альтернативной, противовоспалительной активации макрофагов за счет изменения баланса чувствительности к про и противовоспалительным цитокинам.

Известно, что классическая макрофагальная активация характеризуется повышением экспрессии CD197 (CCR7) – хемокинового рецептора, обеспечивающего миграцию клеток в лимфоидную ткань и их последующее вовлечение в адаптивный иммуногенез (Zhang Z. et al., 2011). В наших экспериментах, под действием активационного стимула наблюдалось увеличение числа клеток эспрессирующих молекулы CCR7. Интересно, что добавление G-CSF в концентрациях 0,01, 0,1 и 1,0 нг/мл к активируемым макрофагам приводило к статистически значимому снижению относительного числа CD197⁺ клеток с 17,1 (12,2 – 21,0) % до 16,2 (10,7 – 20,3) %, 15,1 (9,0 – 18,7) % и 13,6 (6,4 – 17,6) % соответственно. Таким образом, G-CSF способен снижать миграционный потенциал контактировавших с антигеном макрофагальных клеток относительно лимфоидной ткани и, тем самым, сдерживать развитие адаптивных иммунных процессов. В свете полученных данных можно предполагать, что G-CSF играет значимую роль в иммунорегуляторных механизмах, предотвращающих развитие иммунных реакций на антигенные “шумы”, которые не представляют угрозы для организма, но при высокой чувствительности иммунной системы к их действию могут разбалансировать иммунную защиту.

Ранее было показано, что G-CSF, системно вводимый человеку, снижал продукцию TNF- α , IL-1 β , IL-12 и IFN- γ МНК (Carr M.J., et al., 2017). В наших экспериментах мы не наблюдали под действием G-CSF статистически значимого снижения продукции TNF- α активированными моноцитами/макрофагами. В то же время G-CSF в максимальной концентрации приводил к статистически значимому снижению макрофагальной продукции IL-1beta с 359,40 (255,60 – 542,40) пг/мл до 298,80 (63,00 – 522,00) пг/мл. Возможно, что в данных описанных ранее, снижение продукции провоспалительных цитокинов имело опосредованный характер, обусловленный снижением продукции IFN- γ Т-лимфоцитами. Стоит отметить, что при прямом воздействии G-CSF в концентрациях 0,01, 0,1 и 1,0 нг/мл на моноциты/макрофаги увеличивалась продукция IL-6 с 7805,15 (2535,43 – 12618,86) пг/мл до 9830,57 (6558,14 – 18000,00), 11337,43 (7344,00 – 17888,57) и 11373,72 (5956,50 – 13489,50) пг/мл соответственно. Это цитокин, активно продуцируемый разными типами клеток, участвует как в воспалительных и противоиных инфекционных ответах, так и в регуляции метаболических, а также регенеративных процессов (Scheller J., et al. 2011). Усиление продукции IL-6 макрофагами могло бы, по-видимому, так же способствовать формированию условий благоприятных для развития противовоспалительных реакций. В тоже время в концентрациях 0,01, 0,1 и 1,0 нг G-CSF не оказывал значимого влияния на продукцию IL-10 активированными макрофагами, однако при максимальной концентрации гемопоетина наблюдалось статистически значимое снижение продукции этого цитокина с 132,60 (106,25 – 191,35) пг/мл до 107,40 (84,12 – 134,05) пг/мл (**Рисунок 4, Таблица 1.**)

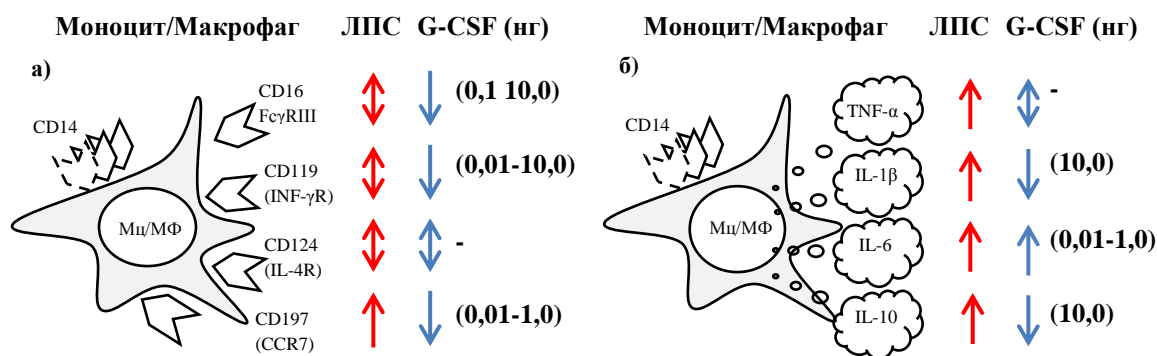


Рисунок 4 – Влияние процессов активации и G-CSF (нг/мл) на Мц/Мф

а) Общая популяция Мц/Мф

б) Продукция цитокинов Мц/Мф

Обозначения: ↑↓ – статистически значимые изменения ↑ – отсутствие изменений

Таблица 1 – Влияние процессов активации и G-CSF (нг/мл) на Мц/Мф

Рецепторы и цитокины	Моноцит/макрофаги					
	Без активации	Активация	Активация + G-CSF (0,01 нг)	Активация + G-CSF (0,1 нг)	Активация + G-CSF (1 нг)	Активация + G-CSF (10 нг)
CD16⁺ Мц (%)	7,71 (4,91 – 14,02)	9,35 (5,22 – 21,08)	8,20 (5,03 – 19,15)	8,52 (4,55 – 15,11)	8,77 (5,90 – 14,42)	10,05 (5,25 – 14,26)
CD119⁺ Мц (%)	86,72 (79,67 – 89,85)	85,53 (68,95 – 89,00)	81,57 (67,09 – 84,65)	81,44 (67,61 – 84,87)	81,23 (70,21 – 85,50)	81,08 (69,54 – 85,23)
CD124⁺ Мц (%)	14,18 (6,08 – 25,08)	17,44 (7,23 – 27,85)	18,76 (5,96 – 28,82)	17,73 (4,71 – 26,49)	17,05 (6,50 – 25,90)	15,20 (5,66 – 24,26)
CD197⁺ Мц (%)	11,23 (8,48 – 14,52)	17,08 (12,17 – 21,05)	16,23 (10,71 – 20,31)	15,10 (8,96 – 18,67)	13,60 (6,42 – 17,52)	14,95 (8,00 – 19,19)
IL-1β (пг/мл)	0,00 (0,00 – 0,00)	359,40 (255,60 – 542,40)	368,40 (298,80 – 488,91)	423,00 (111,60 – 486,17)	334,20 (91,80 – 517,71)	298,80 (63,00 – 522,00)
IL-6 (пг/мл)	0,00 (0,00 – 146,15)	7805,15 (2535,43 – 12618,86)	9830,57 (6558,14 – 18000,00)	11337,43 (7344,00 – 17888,57)	11373,72 (5956,50 – 13489,50)	9706,29 (3088,50 – 11808,00)
IL-10 (пг/мл)	0,00 (0,00 – 0,00)	132,60 (106,25 – 191,35)	158,19 (113,98 – 192,00)	150,30 (108,15 – 181,29)	130,97 (103,25 – 166,09)	107,40 (84,12 – 134,05)
TNF-α (пг/мл)	23,79 (10,28 – 89,41)	1415,00 (624,85 – 1999,13)	1418,50 (678,80 – 1693,50)	1237,40 (714,93 – 1786,42)	1557,15 (1037,63 – 1912,86)	1062,50 (815,20 – 1488,62)

Таким образом, G-CSF стимулирует дополнительную выработку IL-6, активированными Мц/Мф, а в максимальной концентрации, способствует снижению производства некоторых как про-, так и противовоспалительных цитокинов. Такой разнонаправленный эффект возможно обусловлен гетерогенностью популяции Мц/Мф. Однако, в целом, среди G-CSF обусловленных эффектов преобладают эффекты противовоспалительной направленности.

В настоящее время, G-CSF активно применяется в регенеративной медицине. Репаративные эффекты этого гемопоэтина связывают преимущественно с мобилизацией и вовлечением стволовых и низкодифференцированных клеток в процессы тканевого морфогенеза. На основании представленных данных можно предположить, что опосредованная G-CSF модуляция активности моноцитов/макрофагов так же может вносить значимый вклад в репаративные процессы.

Основное влияние на динамику субпопуляционного состава Т-лимфоцитов оказывают активационные процессы, в частности они приводят к уменьшению доли CD4-позитивных клеток (с 80,22 (74,06 – 90,48) % до 73,03 (58,79 – 77,40) %) и смещению Т-клеточного баланса в сторону CD4-негативных популяций. В то же

время добавление G-CSF не оказывало значимого влияния на этот процесс. Согласно нашим данным, экспрессия G-CSFR носит индуцибельный характер, что соответствует литературным данным (Bunse С.Е., et al., 2016). Так в присутствии активационного стимула доля CD114⁺ клеток среди CD4-позитивных Т-лимфоцитов возрастала с 0,9 (0,5 – 1,4) % до 2,5 (1,4 – 4,1) %, а среди CD4-негативных – с 1,6 (0,5 – 2,9) % до 3,4 (1,5 – 4,4) %. Добавление G-CSF к активированным Т-лимфоцитам не приводило к статистически значимым изменениям числа CD25⁺ клеток. Это говорит об отсутствии прямого влияния гемопоетина на CD25-зависимые Т-клеточные процессы и, в частности, на пролиферативную активность Т-клеток. С другой стороны, функциональная активность Т-клеток также связана с другим активационным маркером CD38 (гликозилированный мембранный белок с эффектами эктонуклеотидазы), который обладает свойствами рецептора и эктофермента, участвующего как во внутриклеточном сигнальном гомеостазе, так и во внеклеточной связи между иммунными клетками различного происхождения (Qian Y., et al., 2018). Активность CD38 аналогична активности, проявляемой ADP-рибозилциклазой (Quarona V., et al., 2013) она опосредует синтез аденозиндифосфат рибозы (ADPR) и циклической ADPR из никотинамидадениндинуклеотида, который необходим для мобилизации цитозольного кальция из внутриклеточных депо (Okamoto H., et al., 2017). CD38 играет также важную роль в поддержании адгезии и трафика лимфоцитов по эндотелию с помощью CD31-зависимого механизма (Villegas-Ospina S., et al., 2017). Важным представляется то, что высокий уровень экспрессии CD38 на Т-клетках может ассоциироваться с их низкой пролиферативной активностью и высоким уровнем продукции ими IL-2 и IFN-γ (Seledtsov V.I., Seledtsova G.V., 2012; MacDonald R.J., et al. 2017). В наших экспериментах, для CD4-позитивных Т-лимфоцитов продемонстрировано увеличение числа CD38⁺ клеток в культурах активированных Т-лимфоцитов с добавлением G-CSF (0,01 нг/мл и 0,1 нг/мл) с 21,20 (20,50 – 25,40) % до 27,90 (25,15 – 32,95) % и 29,40 (27,30 – 31,15) % соответственно, что говорит об увеличении функциональной активности этих клеток. В тоже время активация приводила к некоторому статистически значимому уменьшению относительного числа CD4- позитивных Т-лимфоцитов, однако, роль G-CSF в этом процессе была не значима (**Рисунок 5, Таблица 2**).

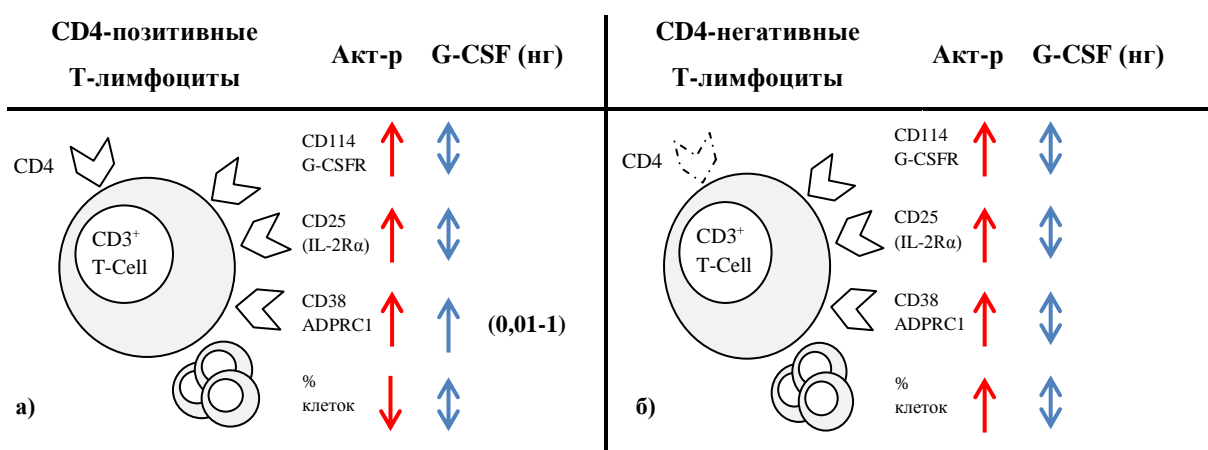


Рисунок 5 – Влияние процессов активации и G-CSF (нг/мл) на Т-лимфоциты

а) Субпопуляция CD4⁺

б) Субпопуляция CD4⁻

Обозначения: ↑ ↓ – статистически значимые изменения ↑ ↓ – отсутствие изменений

Таблица 2 – Влияние процессов активации и G-CSF (нг/мл) на Т-лимфоциты

Субпопуляции (%)	Без активации	Активация	Активация + G-CSF (0,01 нг)	Активация + G-CSF (0,1 нг)	Активация + G-CSF (1 нг)	Активация + G-CSF (10 нг)
Т-лимфоциты (CD25)						
CD3⁺CD4⁺	0,20 (0,08 - 1,15)	11,00 (7,50 - 17,35)	10,25 (7,73 - 14,88)	10,50 (5,90 - 14,43)	13,65 (7,90 - 16,78)	11,50 (7,08 - 15,15)
CD3⁺CD4⁻	0,40 (0,25 - 0,45)	28,90 (21,65 - 37,75)	29,40 (25,00 - 34,95)	28,90 (21,70 - 34,48)	28,20 (23,98 - 32,68)	30,40 (24,50 - 34,05)
Т-лимфоциты (CD38)						
CD3⁺CD4⁺	7,60 (5,25 - 12,00)	21,20 (20,50 - 25,40)	27,90 (25,15 - 32,95)	29,40 (27,30 - 31,15)	25,80 (22,30 - 30,35)	22,90 (17,15 - 30,80)
CD3⁺CD4⁻	9,00 (2,98 - 11,03)	17,70 (13,30 - 27,35)	21,00 (17,10 - 30,23)	20,00 (18,18 - 29,13)	16,85 (15,45 - 23,40)	15,80 (11,43 - 30,45)

Рисунок 6 и Таблица 3 отражают данные, характеризующие непосредственное влияние G-CSF на активацию наивных Т-клеток, центральных и эффекторных Т-клеток памяти, а также терминально дифференцированных Т-клеточных эффекторов.

Наивные Т-лимфоциты – это клетки прошедшие антигеннезависимую дифференцировку в тимусе, но не прошедшие антигензависимую дифференцировку во вторичных лимфоидных органах. Они являются активными продуцентами IL-2. В наших экспериментах среди наивных CD4-позитивных Т-лимфоцитов наблюдалось увеличение числа CD114⁺ клеток в ответ на активационный стимул с 1,5 (0,3 – 1,9) % до 2,3 (1,8 – 2,6) %. G-CSF не оказывал влияния на этот процесс. Похожая ситуация складывалась и с числом CD25-позитивных клеток. В тоже время относительное число CD38⁺ Т-лимфоцитов дополнительно увеличивалось в ответ на добавление G-CSF (0,01 нг/мл и 0,1 нг/мл) с 44,3 (24,0 – 54,35) % до 51,9 (27,75 – 62,00) % и 49,2 (34,3 – 60,5) % соответственно. Относительная численность субпопуляции наивных Т-лимфоцитов снижалась с 35,75 (29,33 – 38,99) % до 31,26 (18,04 – 34,74) %. Таким образом, G-CSF не оказывал влияния на CD25-опосредованную пролиферативную активность наивных Т-лимфоцитов, но увеличивал их функциональную активность и способствовал их дифференцировке в более зрелые формы (**Рисунок 6 б**).

Центральные Т-клетки памяти в отличие от наивных клеток уже прошли антигензависимую дифференцировку во вторичных лимфоидных органах, но еще сохраняют молекулу CD197 на своей поверхности. Они характеризуются высоким уровнем продукции IL-2, а также в моделях *in vitro* показывают наиболее выраженный ответ на активацию (Nielsen B.R. et al, 2017). CD4-позитивные центральные Т-клетки памяти характеризуются наиболее выраженной способностью к гомеостатической пролиферации (Tian Y., et al., 2017) и считаются наиболее долгоживущей популяцией Т-лимфоцитов (Opata M.M., et al., 2018). В нашей работе показано, что в пуле центральных Т-клеток памяти в ответ на активационный стимул увеличивалось число CD114, CD25 и CD38 позитивных клеток. Однако G-CSF способствовал только увеличивать числа CD114⁺ клеток среди Т-клеток центральной памяти с 1,0 (0,4 – 1,9) % до 2,17 (1,7 – 2,6) % (**Рисунок 6 г**).

Субпопуляция CD4-позитивных эффекторных Т-клеток памяти включает в себя продуцентов как IFN- γ , так и IL-4 (Tompa A., et al., 2018). Эта группа также характеризуется высоким уровнем экспрессии поверхностных маркеров, отвечающих за миграцию клеток в очаг воспаления: рецепторов хемокинов CCR5, CCR6 и CXCR3, а также молекул адгезии CD11a, CD11c, CD18, CD29 и др. (Cossarizza A., et al., 2017).

В наших экспериментах для CD4-позитивных эффекторных Т-клеток памяти продемонстрирована сходная с CD4-позитивными центральными Т-клетками памяти реакция на активационный стимул. Однако выявлено более значительное увеличение CD38⁺ Т-лимфоцитов (с 11,90 (11,10 – 19,00) % до 17,40 (12,15 – 21,90) %, 19,10 (12,35 – 21,45) % и 17,20 (11,40 – 20,05) %) в ответ на G-CSF в широком спектре доз (0,01, 0,1 и 1,0 нг/мл соответственно). Таким образом, G-CSF оказывает преимущественное влияние на более коротко живущие, но функционально более значимые эффекторные Т-клетки памяти (**Рисунок 6 в**).

CD4-позитивные терминально дифференцированные Т-клеточные эффекторы чувствительны к влиянию IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 и других провоспалительных цитокинов продуцируемых Мц/Мф (Larkin В., et al., 2017). В наших экспериментах среди терминально дифференцированных Т-клеток в ответ на G-CSF наблюдалось увеличение как CD114 (с 0,9 (0,2 – 1,3) % до 1,2 (0,8 – 1,6) %), так и CD38 положительных лимфоцитов (с 30,10 (29,55 – 44,90) % до 41,20 (34,00 – 50,95) %). В тоже время число CD25-позитивных клеток статистически не изменялось. Вероятно, это говорит об усилении функциональной активности терминально дифференцированных Т-клеток в результате прямого воздействия G-CSF (**Рисунок 6 а**). Хочется отметить, что G-CSF в дополнении к прямым эффектам направленным на эту клеточную субпопуляцию *in vivo* будет оказывать и опосредованное влияние, обусловленное усилением продукции IL-6 Мц/Мф, о чем говорилось ранее.

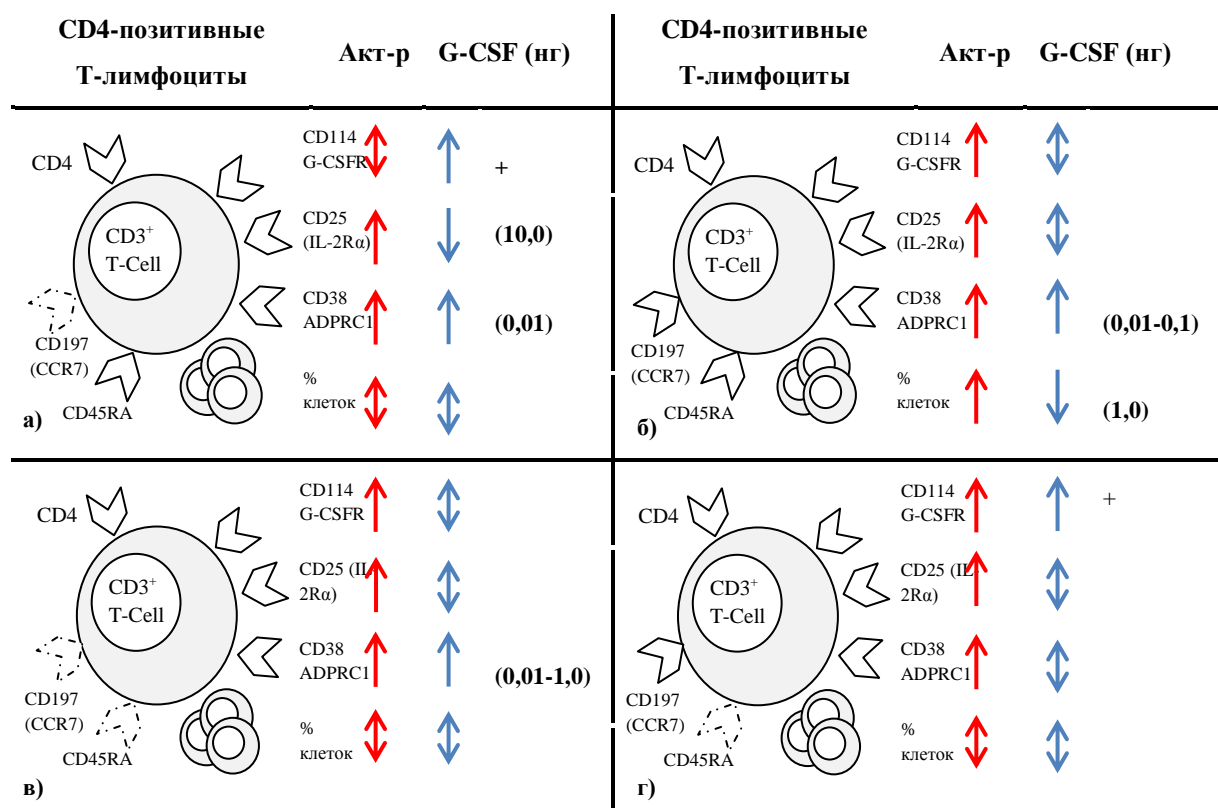


Рисунок 6 – Влияние процессов активации и G-CSF (нг/мл) на CD4⁺ Т-лимфоциты

а) Субпопуляция TEMRA Т-лимфоцитов

б) Субпопуляция naïve Т-лимфоцитов

в) Субпопуляция EM Т-лимфоцитов

г) Субпопуляция CM Т-лимфоцитов

Обозначения: ↑ ↓ – статистически значимые изменения ↔ – отсутствие изменений

Таблица 3 – Влияние процессов активации и G-CSF (нг/мл) на CD4⁺ Т-лимфоциты

Субпопуляции (%)	Без активации	Активация	Активация + G-CSF (0,01 нг)	Активация + G-CSF (0,1 нг)	Активация + G-CSF (1 нг)	Активация + G-CSF (10 нг)
Т-лимфоциты (CD25)						
CD3 ⁺ CD4 ⁺ N	0,00 (0,00 - 0,13)	4,10 (1,05 - 6,05)	4,25 (1,20 - 5,43)	3,00 (0,83 - 5,05)	4,50 (1,73 - 8,18)	3,25 (1,20 - 6,95)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CM	0,10 (0,00 - 1,25)	11,30 (1,85 - 19,78)	10,60 (2,13 - 17,00)	9,10 (2,10 - 14,78)	13,55 (2,40 - 17,80)	13,30 (2,58 - 15,60)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ EM	0,60 (0,10 - 5,58)	35,45 (6,53 - 47,38)	33,85 (6,90 - 41,38)	31,40 (7,08 - 44,18)	40,10 (6,45 - 45,03)	36,85 (6,88 - 47,25)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ TEMRA	0,05 (0,00 - 1,60)	44,60 (2,78 - 63,95)	38,50 (3,28 - 58,08)	36,85 (2,80 - 61,35)	37,70 (1,05 - 63,53)	34,15 (2,03 - 55,93)
Т-лимфоциты (CD38)						
CD3 ⁺ CD4 ⁺ N	23,30 (12,70 - 24,10)	44,30 (24,00 - 54,35)	51,90 (27,75 - 62,00)	49,20 (34,30 - 60,50)	47,70 (26,85 - 52,50)	38,20 (20,70 - 55,25)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CM	9,05 (3,20 - 12,80)	27,10 (24,28 - 33,73)	28,85 (24,65 - 37,65)	28,70 (26,85 - 34,23)	26,30 (21,80 - 33,60)	26,95 (21,18 - 35,18)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ EM	3,30 (2,00 - 5,30)	11,90 (11,10 - 19,00)	17,40 (12,15 - 21,90)	19,10 (12,35 - 21,45)	17,20 (11,40 - 20,05)	12,00 (9,70 - 17,85)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ TEMRA	6,90 (5,05 - 13,55)	30,10 (29,55 - 44,90)	41,20 (34,00 - 50,95)	40,40 (32,80 - 50,45)	37,50 (26,60 - 51,40)	38,10 (19,85 - 48,50)

Среди CD4-негативных Т-лимфоцитов, под влиянием G-CSF наблюдались эффекты, представленные на **рисунке 7**.

Согласно литературным данным CD4-негативные наивные Т-лимфоциты малочувствительны к IL-7 и IL-15 и способны продуцировать высокие уровни IL-2 (Henning A.N., et al., 2018). Их активация усиливает процессы гомеостатической пролиферации. В нашей работе в ответ на активацию было отмечено уменьшение доли наивных клеток среди CD4-негативных лимфоцитов (с 35,62 (33,15 – 44,53) % до 24,33 (14,86 – 38,07) %), что в сочетании с увеличением числа CD38⁺ клеток (с 9,00 (2,98 – 11,03) % до 17,70 (13,30 – 27,35) %) может говорить о стимуляции дифференцировочных процессов. Согласно нашим данным G-CSF не оказывал значимого влияния на эти процессы (**Рисунок 7 б**).

CD4-негативные центральные Т-клетки памяти при длительном культивировании могут дифференцироваться как в эффекторные Т-клетки памяти, так и в терминально дифференцированные Т-клетки (Younes S.A., et al., 2016; Portero-Sainz I., et al., 2017). В нашей работе продемонстрировано увеличение числа CD25, CD38 и CD114 позитивных клеток среди CD4-негативных Т-лимфоцитов центральной памяти в ответ на антигензависимую активацию. Внесение G-CSF в культуру клеток приводило к статистически значимому увеличению числа CD38⁺ Т-лимфоцитов (с 18,70 (14,70 – 26,10) % до 22,80 (19,70 – 28,60) %). Это может указывать на усиление функциональной активности, данной Т-клеточной субпопуляции (**Рисунок 7 г**).

CD4-негативные Т-лимфоциты эффекторной памяти характеризуются достаточно высокой гетерогенностью и включают в себя, как незрелые клетки эффекторной памяти 1-го типа, не способные осуществлять эффекторные функции, так и клетки эффекторной памяти 3-го типа которые по своим свойствам близки к полноценным эффекторным клеткам (Van den Broek T., et al., 2018). В нашей работе показано, что активация приводит к увеличению числа CD25 и CD38 позитивных клеток в этой субпопуляции. Добавление G-CSF не приводило, к каким-либо статистически значимым количественным и маркерным изменениям среди этих клеток (**Рисунок 7 в**).

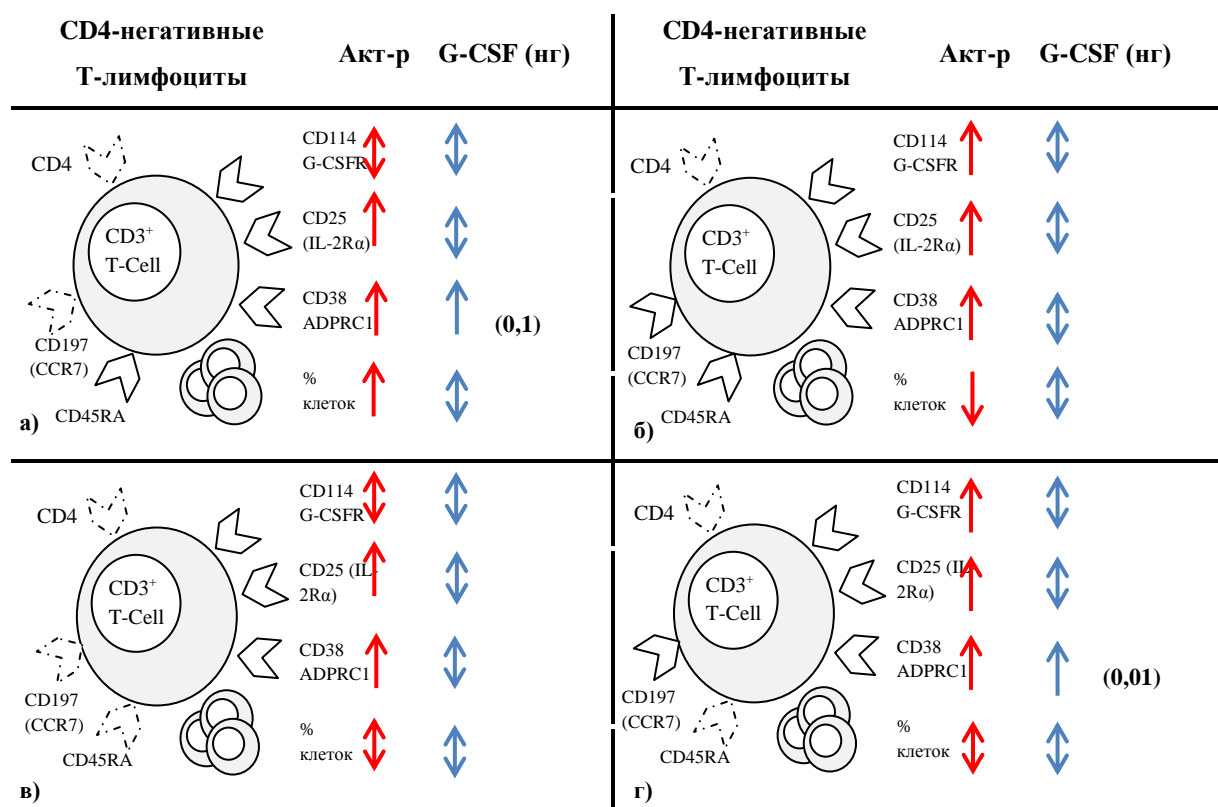


Рисунок 7 – Влияние процессов активации и G-CSF (нг/мл) на CD4⁻ Т-лимфоциты

а) Субпопуляция TEMRA Т-лимфоцитов

б) Субпопуляция naïve Т-лимфоцитов

в) Субпопуляция EM Т-лимфоцитов

г) Субпопуляция CM Т-лимфоцитов

Обозначения: ↑↓ – статистически значимые изменения ↑ – отсутствие изменений

Таблица 4 – Влияние процессов активации и G-CSF (нг/мл) на CD4⁻ Т-лимфоциты

Субпопуляции (%)	Без активации	Активация	Активация + G-CSF (0,01 нг)	Активация + G-CSF (0,1 нг)	Активация + G-CSF (1 нг)	Активация + G-CSF (10 нг)
Т-лимфоциты (CD25)						
CD3 ⁺ CD4 ⁻ N	23,30 (12,70 - 24,10)	44,30 (24,00 - 54,35)	51,90 (27,75 - 62,00)	49,20 (34,30 - 60,50)	47,70 (26,85 - 52,50)	38,20 (20,70 - 55,25)
CD3 ⁺ CD4 ⁻ CM	9,05 (3,20 - 12,80)	27,10 (24,28 - 33,73)	28,85 (24,65 - 37,65)	28,70 (26,85 - 34,23)	26,30 (21,80 - 33,60)	26,95 (21,18 - 35,18)
CD3 ⁺ CD4 ⁻ EM	3,30 (2,00 - 5,30)	11,90 (11,10 - 19,00)	17,40 (12,15 - 21,90)	19,10 (12,35 - 21,45)	17,20 (11,40 - 20,05)	12,00 (9,70 - 17,85)
CD3 ⁺ CD4 ⁻ TEMRA	6,90 (5,05 - 13,55)	30,10 (29,55 - 44,90)	41,20 (34,00 - 50,95)	40,40 (32,80 - 50,45)	37,50 (26,60 - 51,40)	38,10 (19,85 - 48,50)
Т-лимфоциты (CD38)						
CD3 ⁺ CD4 ⁻ N	7,40 (2,45 - 12,80)	25,70 (13,90 - 34,48)	27,95 (18,13 - 38,18)	26,90 (20,33 - 36,93)	22,30 (17,40 - 31,05)	21,90 (14,60 - 37,88)
CD3 ⁺ CD4 ⁻ CM	5,90 (2,15 - 9,60)	15,20 (10,80 - 15,40)	17,10 (13,50 - 17,60)	17,30 (14,75 - 19,95)	13,50 (12,60 - 16,15)	13,20 (9,50 - 16,95)
CD3 ⁺ CD4 ⁻ EM	2,15 (0,95 - 4,85)	9,60 (6,05 - 17,60)	9,35 (6,85 - 21,60)	9,75 (7,13 - 22,38)	9,80 (4,53 - 19,88)	8,25 (6,90 - 18,90)
CD3 ⁺ CD4 ⁻ TEMRA	5,90 (2,15 - 9,60)	15,20 (10,80 - 15,40)	17,10 (13,50 - 17,60)	17,30 (14,75 - 19,95)	13,50 (12,60 - 16,15)	13,20 (9,50 - 16,95)

Субпопуляция CD4-негативных терминально дифференцированных Т-лимфоцитов включает в себя наиболее дифференцированные и функционально активные клетки (Takata H., et al., 2012). В наших экспериментах антигензависимая активация приводила к увеличению числа CD38⁺ и CD25⁺ Т-лимфоцитов. G-CSF статистически значимо увеличивал число CD38⁺ Т-лимфоцитов среди активированных терминально дифференцированных Т-клеток (с 15,20 (10,80 – 15,40) % до 17,30 (14,75 – 19,95) %) (**Рисунок 7 а**), что говорит о вовлеченности этого гемопоэтина в процесс регуляции функциональной активности CD4-негативных терминально дифференцированных Т-лимфоцитов.

Таблица 5 отражает концентрацию цитокинов активированными Т-лимфоцитами под влиянием G-CSF в широком спектре доз.

Таблица 5 – Влияние процессов активации и G-CSF (нг/мл) на концентрацию цитокинов в Т-клеточных супернатантах

Цитокины	Без активации	Активация	Активация + G-CSF (0,01 нг)	Активация + G-CSF (0,1 нг)	Активация + G-CSF (1 нг)	Активация + G-CSF (10 нг)
IL-2 (пг/мл)	0,0 (0,0 - 0,0)	1164,0 (572,0 - 1309,5)	892,0 (434,0 - 1742,0)	1144,0 (485,0 - 2150,0)	1026,0 (206,0 - 2058,5)	1008,0 (192,0 - 1974,5)
INF-γ (пг/мл)	0,0 (0,0 - 0,0)	5094,0 (4039,8 - 9688,3)	2743,0 (2190,0 - 5630,0)	3310,0 (2615,0 - 7678,5)	5812,0 (3853,5 - 9050,5)	6304,0 (3716,0 - 9352,0)
IL-4 (пг/мл)	0,0 (0,0 - 0,1)	16,1 (6,4 - 27,5)	13,3 (0,5 - 32,6)	11,7 (2,8 - 29,5)	24,5 (5,4 - 32,6)	23,2 (12,8 - 30,8)
IL-10 (пг/мл)	0 (0 - 0,75)	556,5 (242,4 - 635,5)	577,7 (452,7 - 668,4)	679,5 (430,2 - 732,3)	685,2 (366,9 - 934,8)	701,4 (322,2 - 769,5)

IL-2 играет ключевую роль в процессах клеточной пролиферации и активации Т-лимфоцитов (Yong C., 2017). В нашей работе было продемонстрировано усиление продукции IL-2 активированными Т-клетками, что соответствует литературным данным (Селедцов В.И. и др., 2010; Liao W. et al., 2013). Уровень продукции цитокина при добавлении G-CSF не изменялся.

Одним из цитокинов с ярко выраженным провоспалительным эффектом является IFN-γ. Это интерферон II-го типа, который участвует в процессах активации макрофагов и индукции экспрессии молекулы МНС-II, так же он играет ключевую роль в развитии и реализации противовирусных иммунных реакций. К основным продуцентам этого цитокина относят Th1-клетки, цитотоксические лимфоциты, НК-клетки и NKT-клетки (Parker B.S., et al., 2016; Negishi H., et al., 2018). В наших экспериментах G-CSF снижал продукцию IFN-γ, осуществляемую активированными Т-лимфоцитами с 5094,0 (4039,8 – 9688,0) пг/мл до 2743,0 (2190,0 – 5630,0) пг/мл.

IL-10 является иммуносупрессорным цитокином (Zarour H.M., 2016; Ouyang W., O'Garra A., 2019). Активация Т-лимфоцитов стимулировала продукцию IL-10. Активированные Т-лимфоциты под влиянием G-CSF продемонстрировали тенденцию к дополнительному усилению продукции IL-10 (с 556,5 (242,4 – 635,5) пг/мл до 701,4 (322,2 – 769,5) пг/мл), что возможно обусловлено продукцией этого цитокина Т-регуляторными клетками под действием G-CSF (Perobelli S.M., et al., 2016). Но эта тенденция не подтверждалась статистической достоверностью.

IL-4 – противовоспалительный цитокин, продуцируемый преимущественно Th2-клетками. IL-4 является ключевым стимулятором альтернативной активации Mφ (Van Dyken S.J., Locksley R.M., 2013). Он подавляет функциональную активность провоспалительных Th1-клеток. В наших экспериментах G-CSF (1,0 нг/мл и 10,0 нг/мл) был способен усиливать T-клеточную продукцию IL-4 (с 16,1 (6,4 – 27,5) пг/мл до 24,5 (5,4 – 32,6) пг/мл и 23,2 (12,8 – 30,8) пг/мл соответственно). Таким образом, в целом, полученные данные указывают на способность G-CSF поддерживать адаптивные иммунные процессы противовоспалительной направленности и стимуляцию репаративных процессов.

ВЫВОДЫ

1. G-CSF сдерживает развитие классической (M1) активации макрофагов, о чём свидетельствует снижение относительного количества активированных макрофагов, экспрессирующих CD16, CD119 и CD197, и стимуляция макрофагальной продукции IL-6 и снижение продукции IL-10 и IL-1β под действием G-CSF.
2. G-CSF вовлечен в T-клеточный иммуноадаптогенез, о чём говорит индукция мембранной экспрессии G-CSFR (CD114⁺) под влиянием T-клеточной активации.
3. G-CSF не оказывает прямого влияния на IL-2-зависимый T-клеточный рост, о чём свидетельствует отсутствие влияния G-CSF на экспрессию CD25 (рецептор IL-2) и продукцию IL-2 активированными T-лимфоцитами.
4. Прямое влияние G-CSF на активацию T-клеток определяется их субпопуляционной принадлежностью, о чём свидетельствует более выраженное увеличение относительного числа CD38⁺ клеток среди активированных CD4-позитивных T-лимфоцитов, но не среди CD4-негативных.
5. G-CSF поддерживает T-хелперные реакции 2 типа, о чём говорит снижение продукции INF-γ и усиление выработки IL-4, осуществляемое активированными T-лимфоцитами под действием G-CSF.
6. G-CSF в рамках адаптивного иммуногенеза сдерживает провоспалительные (M1) макрофагальные реакции и способствует развитию противовоспалительных иммунных процессов, опосредуемых T-хелперами 2-го типа.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Малашенко В.В.**, Шмаров В.А., Меняйло М.Е., Газатова Н.Д., Мелашенко О.Б., Мельников А.Е., Тодосенко Н.М., Исмаилова А.З. Экспрессия рецептора к G-CSF на различных популяциях T-лимфоцитов // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17, № 5. – С. 366 (IF- 0,787)
2. Гончаров А.Г., Шмаров В.А., **Малашенко В.В.** Прямое влияние гемопоэтинов на функциональную активность T-лимфоцитов // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9. № 3. – С. 49 (IF- 0,514)

3. **Малашенко В.В.**, Газатова Н.Д., Меняйло М.Е., Шмаров В.А., Тодосенко Н.М., Мелашенко О.Б., Мельников А.Е., Мельников А.Е., Исмаилова А.З., Гончаров А.Г., Селедцов В.И. Прямое влияние гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора на Т-клеточную реактивность // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9(18). № 2-1. – С. 84-85 (IF- 0,514)
4. Гончаров А.Г., Шмаров В.А., **Малашенко В.В.**, Меняйло М.Е., Газатова Н.Д., Тодосенко Н.М., Мельников А.Е., Мелашенко О.Б., Мархайчук А.З., Швецова Е., Шунькин Е.О. Цитокин-опосредованная (IL-7, G-CSF, GM-CSF, EPO, IL-8) регуляция активационного статуса Т-лимфоцитов человека // Российский иммунологический журнал. – 2016. – Т. 10(19). № 2-1. – С. 159-161. (IF- 0,514)
5. Селедцов В.И., Гончаров А.Г., Шмаров В.А., **Малашенко В.В.**, Меняйло М.Е., Газатова Н.Д., Тодосенко Н.М., Мельников А.Е., Мелашенко О.Б., Мархайчук А., Швецова Е. Влияние гемопоэтических ростовых факторов на активационный статус и функциональную активность Т-лимфоцитов человека // Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. Серия: Естественные и медицинские науки. – 2016. – № 2. – С. 60-72 (IF- 0,149)
6. **Malashchenko V.V.**, Menyailo M.E., Shmarov V.A., Gazatova N.D., Melashchenko O.B., Goncharov A.G., Seledtsova G.V., Seledtsov V.I. Direct anti-inflammatory effects of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on activation and functional properties of human t cell subpopulations in vitro // Cellular Immunology. – 2018. – Т. 325. – С. 23-32 (IF- 2.89)
7. Меняйло М.Е., **Малашенко В.В.**, Мархайчук А.З., Газатова Н.Д., Мелашенко О.Б., Шунькин Е.О., Мельников А.Е., Гончаров А.Г. Цитокин-опосредованная (IL-8, G-CSF, EPO) регуляция функциональной активности моноцитов/макрофагов // Российский иммунологический журнал. – 2018. – Т. 12(21). № 4. – С. 701-703 (IF- 0,514)
8. Seledtsov V.I. **Malashchenko V.V.**, Meniailo M.E., Gazatova N.D., Seledtsova G.V. Granulocyte colony-stimulating factor downregulates interferon-gamma receptor expression and stimulates interleukin-6 production in activated human macrophages // Growth Factors. – 2019. – Т. 37(3-4). – С. 164-169 (IF- 1.86).

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

CD – кластердифференцировки (cluster of differentiation)	CD14 – мембранный белок, экспрессированный на клетках миелоидного ряда
CD45 – общелейкоцитарный рецептор	CD16 – низкоаффинный Fc-рецептор (Fc-гаммаRII)
CD45RA – высокомолекулярная изоформа рецептора CD45	CD119 – рецептор 1 к интерферону гамма
МНК – мононуклеарные клетки	CD124 – рецептор к интерлейкину 4
АПК – антигенпрезентирующие клетки	TNF- α – фактор некроза опухоли α (tumor necrosis factor α)
ЛПС – липополисахарид	CD3 – корецептор Т-клеточного рецептора
МКАТ – моноклональные антитела	CD4 ⁺ – популяция Т-клеток, несущие молекулу CD4 (CD4-позитивные)
Мц/Мф – моноцит/макрофаги	CD4 [–] – популяция Т-клеток, не экспрессирующие молекулу CD4 (CD4-негативные)
ДК – дендритные клетки	CD25 – α - цепь IL-2 рецептора
Th – Т-хелперы	CD38 – рецептор-фермент, участвующий во внутриклеточном сигналинге и межклеточной коммуникации
CTL – цитотоксические Т-лимфоциты	Ig – иммуноглобулин (immunoglobulin)
TCR – Т-клеточный рецептор (T-cellreceptor)	naïve – наивные Т-лимфоциты с фенотипом CD3 ⁺ /CD45RA ⁺ /CD197 ⁺
PPR, PRRs – паттерн распознающие рецепторы (pattern recognition receptors)	СМ – центральные Т-лимфоциты памяти с фенотипом CD3 ⁺ /CD45RA [–] /CD197 ⁺
ПАМП, PAMP – патоген ассоциированные молекулярные паттерны (pathogen-associated molecular pattern)	ЕМ – эффекторные Т-лимфоциты памяти с фенотипом CD3 ⁺ /CD45RA [–] /CD197 [–]
DAMP – damage-associated molecular pattern	TEMRA – терминально-дифференцированные клетки эффекторы с фенотипом CD3 ⁺ /CD45RA ⁺ /CD197 [–]
МНС – главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex)	
IL – интерлейкин	
G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор	
G-CSFR – рецептор гранулоцитарного колониестимулирующего фактора	
FITC – флуоресцеинизотиоцианат	
PE – фикоэритрин	
APC – аллофикоцианин	
PerCP – перидинин хлорофилл	

Подписано в печать _____
формат 60X90 1/16. Усл. печ. листов 0,65. Тираж 100 экз. Заказ №
Отпечатано полиграфическим отделом
Издательства Балтийского федерального университета им. И. Канта
236041, г. Калининград, ул. А. Невского 14