

БИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

Научная статья

УДК 616.419-089.847: [612, 622, 34: 612.111.94]-092.9

DOI: 10.17816/pmj406135-147

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКОГО β1-ГЛИКОПРОТЕИНА НА УРОВЕНЬ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ И ЛОКАЛЬНЫХ Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ ЛИМФОЦИТОВ У КРЫС WISTAR ПРИ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА

С.А. Заморина^{1,4}, М.С. Бочкова^{1,4}, В.П. Тимганова⁴, В.В. Власова^{1,4},
А.В. Любимов³, Н.П. Логинова², Ю.А. Чарушина², Н.В. Чемуризева², М.Б. Раев^{1,4}*

© Заморина С.А., Бочкова М.С., Тимганова В.П., Власова В.В., Любимов А.В., Логинова Н.П., Чарушина Ю.А., Чемуризева Н.В., Раев М.Б., 2023

тел. +7 342 280 77 94

e-mail: zamorina.sa@gmail.com

[Заморина С.А. (*контактное лицо) – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и биотехнологии, профессор кафедры микробиологии и иммунологии, ORCID: 0000-0002-6474-1487; Бочкова М.С. – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и биотехнологии, старший преподаватель кафедры микробиологии и иммунологии, ORCID: 0000-0001-5784-6224; Тимганова В.П. – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и биотехнологии, ORCID: 0000-0003-4581-1969; Власова В.В. – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии, инженер кафедры микробиологии и иммунологии, ORCID: 0000-0002-1656-7277; Любимов А.В. – доктор биологических наук, профессор, консультант, ORCID: 0009-0002-8732-4210; Логинова Н.П. – доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии, ORCID: 0000-0001-8597-2682; Чарушина Ю.А. – преподаватель кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии, ORCID: 0000-0002-2193-7463; Чемуризева Н.В. – кандидат биологических наук, начальник отдела учебно-методического и научного обеспечения, ORCID: 0009-0006-0228-0896; Раев М.Б. – доктор биологических наук, заведующий лабораторией клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, профессор кафедры микробиологии и иммунологии, ORCID: 0000-0001-6882-4928].

© Zamorina S.A., Bochkova M.S., Timganova V.P., Vlasova V.V., Lyubimov A.V., Loginova N.P., Charushina Yu.A., Chemurzieva N.V., Rayev M.B., 2023

tel. +7 342 280 77 94

e-mail: zamorina.sa@gmail.com

[Zamorina S.A. (*contact person) – Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher, of the Laboratory of Cellular Immunology and Biotechnology, Professor of the Department of Microbiology and Immunology, ORCID: 0000-0002-6474-1487; Bochkova M.S. – Candidate of Biological Sciences, Researcher of the Laboratory of Cellular Immunology and Biotechnology, Senior Lecturer of the Department of Microbiology and Immunology, ORCID: 0000-0001-5784-6224; Timganova V.P. – Candidate of Biological Sciences, Researcher of the Laboratory of Cellular Immunology and Biotechnology, ORCID: 0000-0003-4581-1969. Vlasova V.V. – junior researcher, Laboratory of Molecular Immunology, engineer of the Department of Microbiology and Immunology, ORCID: 0000-0002-1656-7277; Lyubimov A.V. – MD, PhD, Professor, consultant, ORCID: 0009-0002-8732-4210; Loginova N.P. – MD, PhD, Associate Professor, Head of the Department of Histology, Embryology and Cytology, ORCID: 0000-0001-8597-2682; Charushina Yu.A. – Lecturer, Department of Histology, Embryology and Cytology, ORCID: 0000-0002-2193-7463; Chemurzieva N.V. – Candidate of Biological Sciences, Head of the Department of Educational, Methodological and Scientific Support, ORCID: 0009-0006-0228-0896; Rayev M.B. – Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Professor of the Department of Microbiology and Immunology, ORCID: 0000-0001-6882-4928].

¹Пермский государственный национальный исследовательский университет,

²Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера,

³ООО «Имбиоком», г. Пермь,

⁴Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Российская Федерация

EFFECT OF PEPTIDES OF TROPHOBLASTIC β 1 GLYCOPROTEIN ON PERIPHERAL AND LOCAL T-REGULATORY LYMPHOCYTES LEVEL IN WISTAR RATS WITH ALLOGENEOUS BONE MARROW CELL TRANSPLANTATION

S.A. Zamorina^{1,4}, M.S. Bochkova^{1,4}, V.P. Timganova⁴, V.V. Vlasova^{1,4},*

A.V. Lyubimov³, N.P. Loginova², Yu.A. Charushina², N.V. Chemurzieva², M.B. Rayev^{1,4}

¹Perm State National Research University,

²E.A. Vagner Perm State Medical University,

³"Imbiocom" LLC, Perm,

⁴Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of RAS, Perm, Russian Federation

Цель. Сфера применения пептидных препаратов быстро расширяется, однако до сих пор не найден препарат с иммуносупрессорной активностью. Учитывая тот факт, что трофобластический β 1-гликопротеин (ТБГ) является фетоплацентарным белком с иммуносупрессорной активностью, изучали короткие пептидные фрагменты этого белка в формировании иммунного ответа в ситуации трансплантации аллогенных клеток. Изучено влияние пептидов ТБГ (YECE, YQCE, YVCS и YACS) на уровень периферических и локальных Т-регуляторных клеток (Treg) в процессе формирования иммунного ответа на введение аллогенных клеток костного мозга (КМ) в динамическом эксперименте на крысах Wistar.

Материалы и методы. В работе использовали оригинальную модель реакции «хозяин против трансплантата» на крысах-самцах Wistar без предварительного кондиционирования у реципиентов. Животным вводили композицию пептидных фрагментов ТБГ на фоне аллогенной внутрибрюшинной трансплантации клеток КМ в динамическом эксперименте, оценивая следующие параметры: уровень периферических «истинных» Treg ($CD4^+CD25^+FOXP3^+$), $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ -клеток и экспрессию FOXP3 в брыжеечных лимфатических узлах. Материал забирали на 3-и и 21-е сутки эксперимента.

Результаты. Показано, что введение пептидов ТБГ на фоне введения аллогенных клеток КМ снижало абсолютное и относительное количество Treg в периферической крови крыс на 3-и и 21-е сутки эксперимента. Пептиды ТБГ на фоне введения аллогенных клеток КМ снижали абсолютный и относительный уровень $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ клеток на 3-и сутки эксперимента. Введение пептидов ТБГ на фоне введения клеток КМ приводило к относительному снижению экспрессии FOXP3 в Т-зоне брыжеечных лимфатических узлов на 21-е сутки эксперимента.

Выводы. Таким образом, пептиды ТБГ не оказывали ожидаемого воздействия на уровень периферических и локальных Treg, более того, присутствие пептидов приводило к снижению количества этих клеток.

Ключевые слова. Короткие пептидные фрагменты, трофобластический β 1-гликопротеин, YACS, YQCE, YVCS, YECE, аллогенный трансплантат, Т-регуляторные лимфоциты, FOXP3, крысы Wistar.

Objective. The range of peptide drugs is expanding, but no drug with immunosuppressive activity has yet been found. Considering the fact that the trophoblastic β 1-glycoprotein (PSG) is a fetoplacental protein with immunosuppressive activity, short peptide fragments of this protein were studied in the formation of an immune response in a situation of allogeneic cell transplantation. To study the effect of PSG peptides (YECE,

YQCE, YVCS, and YACS) on the levels of peripheral and local T-regulatory cells (Treg) during the formation of an immune response to the introduction of allogeneic bone marrow cells (BM) in a dynamic experiment on Wistar rats.

Materials and methods. We used an original host-versus-graft model in male Wistar rats without preconditioning of recipients. Animals were injected with PSG peptide fragment composition against a background of allogeneic intraperitoneal transplantation of BM cells in a dynamic experiment, in which the following parameters were evaluated: the level of peripheral "true" Tregs ($CD4^+CD25^+FOXP3^+$), $CD4^+CD25^-FOXP3^+$ cells, and FOXP3 expression in mesenteric lymph nodes. Material was collected on days 3 and 21 of the experiment.

Results. PSG peptide administration against a background of allogeneic BM cells was found to reduce the absolute and relative amount of Treg in the peripheral blood of rats on days 3 and 21 of the experiment. PSG peptides against the background of the introduction of allogeneic BM cells reduced the absolute and relative amounts of $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ cells on the day 3 of the experiment. The introduction of PSG peptides against the background of the introduction of BM cells resulted in a relative decrease in FOXP3 expression in the T zone of mesenteric lymph nodes on the day 21 of the experiment.

Conclusions. Thus, the PSG peptides did not have the expected effect on the level of peripheral and local Treg cells; moreover, the presence of the peptides led to a decrease in the number of these cells.

Keywords. Peptides, pregnancy-specific beta 1-glycoproteins, YACS, YQCE, YVCS, YECE, allografts, regulatory T-Cells, FOXP3, Wistar rats.

ВВЕДЕНИЕ

Рынок пептидных препаратов является быстрорастущим и перспективным инновационным сегментом экономики. Разработка пептидных препаратов за последнее десятилетие значительно продвинулась вперед благодаря новым технологиям производства, модификации и анализа [1]. Короткие пептиды вызывают значительный интерес благодаря своим уникальным свойствам и большим перспективам в области инновационной биотерапии [2].

В нашей работе мы исследовали короткие линейные пептидные фрагменты плацентарного трофобластического бета-1-гликопротеина (ТБГ) (YECE, YQCE, YVCS и YACS), учитывая строение этого белка. В первичной структуре различных изоформ ТБГ выявлены тетрапептидные участки: YQCE, YECE и YACS, являющиеся консенсусным мотивом YxCx, у которого обнаружена иммуномодулирующая активность [3]. Применение коротких пептидных фрагментов ТБГ изучалось нами в качестве возможного иммуносупрессанта.

Биорегуляторные (короткие) пептиды благодаря небольшой молекулярной массе и простой структуре могут проникать внутрь клеток и под оболочку ядра без участия рецепторов на их поверхности [4].

Ситуацию, при которой необходима иммуносупрессия, моделировали путем введения аллогенных клеток костного мозга экспериментальным животным, одновременно осуществляя терапию короткими пептидами ТБГ. Чтобы оценить формирование иммунного ответа, оценивали уровень Т-регуляторных клеток (Treg), основная функция которых – контроль силы и продолжительности сложной многокомпонентной иммунной реакции. Транскрипционный фактор FOXP3 является каноническим специфическим маркером для Treg, так как он необходим для дифференцировки и функционирования этих клеток [5]. У грызунов Treg определяются как Т-клетки с фенотипом $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ [6].

Известно, что изменения в иммунной системе реципиента на введение аллогенных клеток костного мозга происходят в первые три недели после трансплантации, а уровень

Treg в данном случае является одним из ключевых показателей развития иммунного ответа [7]. Как правило, уровень Treg в ответ на введение трансплантата повышается, что приводит к подавлению иммунного ответа на аллогенные клетки [8]. Важно отметить, что Treg выполняют свои функции как непосредственно в месте введения аллогенных клеток, так и в периферической крови. Учитывая это обстоятельство, в работе оценивались Treg ($CD4^+CD25^+FOXP3^+$) в периферической крови экспериментальных животных, а также уровень экспрессии FOXP3 в области введения аллогенных клеток (брыжеечные лимфоузлы).

Цель исследования – изучение влияния пептидов ТБГ (YECSE, YQCE, YVCS и YACS) на уровень периферических и локальных Treg в процессе формирования иммунного ответа на введение аллогенных клеток костного мозга (КМ) в динамическом эксперименте на крысах Wistar.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на самцах белых крыс линии Wistar ($n = 32$) в возрасте 2–3 месяцев массой около 250 г. Животных содержали в виварии Пермского государственного национального исследовательского университета в условиях, соответствующих ГОСТ 33216-2014 («Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами»). Эксперименты проводили с соблюдением биоэтических норм в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите экспериментальных животных (86/609/ЕЕС; 1986). Выведение животных из эксперимента осуществляли на 3-и и 21-е сут; в этот момент собирали периферическую кровь, из которой выделяли мононуклеарные клетки в градиенте плотности $1,077 \text{ г/см}^3$ («Диаколл»,

«Диаэм», Россия). Выделенные клетки замораживали при температуре до минус 80°C в среде, содержащей 90 % инактивированной теплом эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС; Corning, США) и 10 % диметилсульфоксида (Thermo Fisher, США), затем переносили в жидкий азот для длительного хранения (-196°C).

В работе использовали оригинальную модель реакции «хозяин против трансплантата» (РХПТ), разработанную по аналогии с моделью реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [9].

Животные были разделены на четыре группы: 1-я ($n = 8$) – интактные животные; 2-я группа ($n = 8$) – животные, которым вводили только пептиды ТБГ; 3-я группа ($n = 8$) – которым вводили взвесь костного мозга (КМ); 4-я ($n = 8$) – животные, которым вводилась взвесь КМ в комплексе с пептидами ТБГ. Пептиды вводили внутримышечно в объеме 100 мкл физиологического раствора, в следующем режиме: на 1, 6, 9-е и 12-е сут (рис. 1).

В работе применяли пептиды ТБГ (YACS – A, YQCE – Q, YVCS – V, YECSE – E), синтезированные на заказ фирмой «Рашен пептайд» (Россия), предварительно очищенные нами от эндотоксина при помощи колонок производства Thermo Scientific. Пептиды вводили по 12.5 мкг каждого, то есть по 50 мкг смеси в 100 мкл апиrogenного физраствора.

Клетки КМ выделяли из бедренных костей, как нами описано ранее, и обрабатывались камптотецином для предотвращения реакции трансплантат против хозяина [10]. В исследованиях использовалась модель локальной аллотрансплантации. Трансплантация 10^7 клеток в объеме среды 100 мкл производилась с помощью шприца внутривенно. Трансплантацию суспензии аллогенных клеток КМ осуществляли без предварительного кондиционирования животного-реципиента.

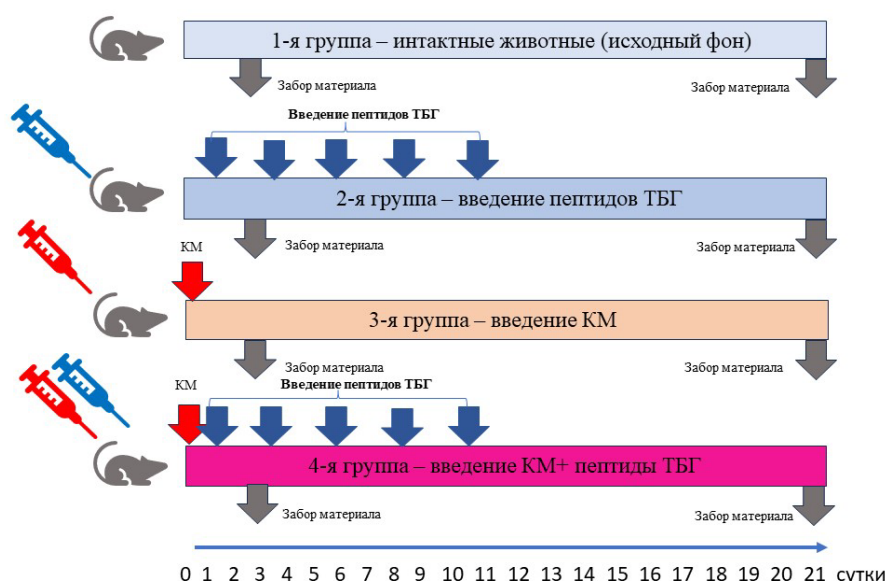


Рис. 1. Схема эксперимента *in vivo* по изучению влияния пептидов ТБГ на уровень локальных и периферических Treg

Выведение из эксперимента проводили на раннем (3-и сут) и позднем сроке (21-е сут) динамического эксперимента, забирая периферическую кровь и брыжечные лимфоузлы.

Оценка уровня лимфоцитов Treg.

Перед проведением эксперимента клетки размораживали при 37 °C и отмывали в 10 мл полной питательной среды RPMI-1640, содержащей 10 % ЭТС (Corning, США), 100 ед./мл пеницилина и 100 мкг/мл стрептомицина (Sigma, США). Размороженные мононуклеарные клетки окрашивали флуоресцентно мечеными (фикоэритрином (PE) или FITC) антителами, специфичными к поверхностным молекулам CD4 и CD25, после чего клетки фиксировали, пермеабилizировали и окрашивали антителами к внутриядерному транскрипционному фактору FOXP3. Использовали набор FlowX Rat Regulatory T Cell Kit (R&D Systems, США), включающий анти-CD25-PE, анти CD4-FITC и анти-FOXP3-AlexaFluor 647 антитела. Фенотип Treg определяли как CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ (рис. 1). Ана-

лиз проводили на проточном цитометре CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Данные представлены в виде абсолютного и относительного количества Treg в пуле CD4⁺ Т-лимфоцитов. Абсолютные значения были получены путем определения лейкоформулы и подсчета числа лейкоцитов в периферической крови.

Иммуногистохимическое исследование проводили аппаратным способом с использованием иммуногистохимических автостейнеров Autostainer 360 (Thermo, Великобритания). Для визуализации результатов использовали системы детекции EnVision FLEX+ (Dako, США). Препараты инкубировали с хромогеном DAV Plus Substrate System и докрашивали гематоксилином Майера с заключением в БиоМаунт-среду. Для оценки качества реакции использовали стекла с позитивным контролем для каждого из антигенов (Labvision, США). Для определения качественного состава использовали моноклональное антитело (Cloude-Clon Corp, США) к фактору транскрипции: FOXP3 (recombinant;

Tyr191-Glu412). Положительным результатом иммуногистохимической реакции являлось специфическое окрашивание клеток (коричневый цвет).

Исследование препаратов проводили на морфометрической установке (Olympus, Япония) с последующим анализом изображений в программе Image Pro Plus (free version) в автоматическом режиме. В оценке параметров иммуногистохимического окрашивания использовался пороговый метод бинаризации Отсу [11]. В препаратах от 4 животных в каждой экспериментальной точке (3-и сут и 21-е сут) анализировали двадцать полей зрения (10 полей Т-зоны и 10 полей В-зоны) при увеличении X900. Цифровой формат фотографии был переведен в режим бинаризации (метод Отсу), после чего в автоматическом режиме выделяли клетки с экспрессией маркера. Результаты обсчета представлены после обработки данных в программе ImageJ для автоматической морфометрии в виде количества клеток с положительной экспрессией FOXP3 в поле зрения [12].

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 8, используя двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) и post-hoc тест Тьюки для множественных сравнений. Различия считали достоверными при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка уровня периферических Treg в экспериментах *in vivo* под воздействием пептидов ТБГ. Т-регуляторные клетки (Treg, регуляторные Т-лимфоциты, Т-супрессоры) являются центральными регуляторами иммунного ответа. Именно Treg ингибируют развитие аутоиммунных заболеваний, обеспечивая доминантную иммунологическую толерантность к собственным антигенам, а также регулируют ответ на аллотрансплантат [13].

В группе животных с аллотрансплантацией КМ наблюдалось статистически значимое по отношению к интактной группе снижение абсолютного и относительного количества $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ -клеток («истинных» Treg) как на 3-и сут, так и на 21-е сут эксперимента (рис. 2). При введении пептидов ТБГ у экспериментальных животных также снижалось абсолютное и относительное количество Treg в пуле $CD4^+$ Т-лимфоцитов в ранние сроки эксперимента и спустя 21 сутки. Совместное введение пептидов ТБГ и аллогенных клеток КМ оказало аналогичный эффект на содержание Treg в $CD4^+$ Т-клетках крови крыс в обеих временных точках (см. рис. 2). Стоит отметить, что мы видим практически одинаковые результаты как на уровне абсолютных показателей Treg (см. рис. 2, а), так и при расчете относительных значений (см. рис. 2, б). Применение пептидов ТБГ, таким образом, приводит к снижению уровня Treg, что будет способствовать развитию иммунного ответа на аллогенный трансплантат.

Для углубленного анализа полученных результатов оценивали также уровень $CD25^+FOXP3^+CD4^+$ -клеток у экспериментальных животных. Роль этих клеток в регуляции иммунного ответа до сих пор не установлена. Предполагается, что клетки $CD25^+FOXP3^+$ происходят от конвенциональных Treg в присутствии высоких концентраций фактора роста TGF- β , либо относятся к Treg, недавно покинувшим тимус [14].

Установлено, что вместе с долей Treg при введении аллогенного КМ сокращается также абсолютное и относительное число $CD25^+FOXP3^+CD4^+$ -клеток в ранние сроки эксперимента (рис. 3). В то же время на 21-е сут эксперимента достоверно снижалось абсолютное количество этих клеток, но не относительное (см. рис. 3).

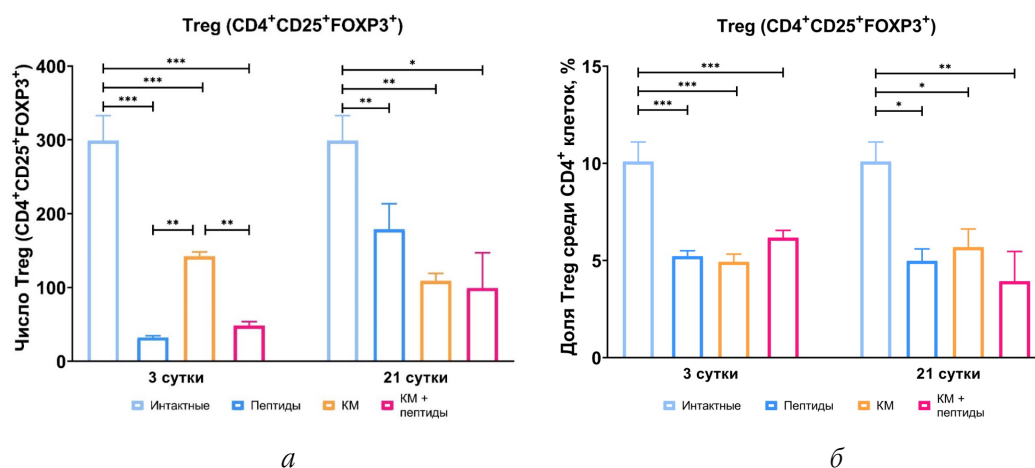


Рис. 2. Абсолютное (а) и относительное (б) количество Трег (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) в периферической крови крыс при аллотрансплантации КМ и введении пептидов ТБГ: данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего; N = 4; * – P < 0,05; ** – P < 0,01; *** – P < 0,001 (two-way ANOVA, post-hoc тест Тьюки для множественных сравнений)

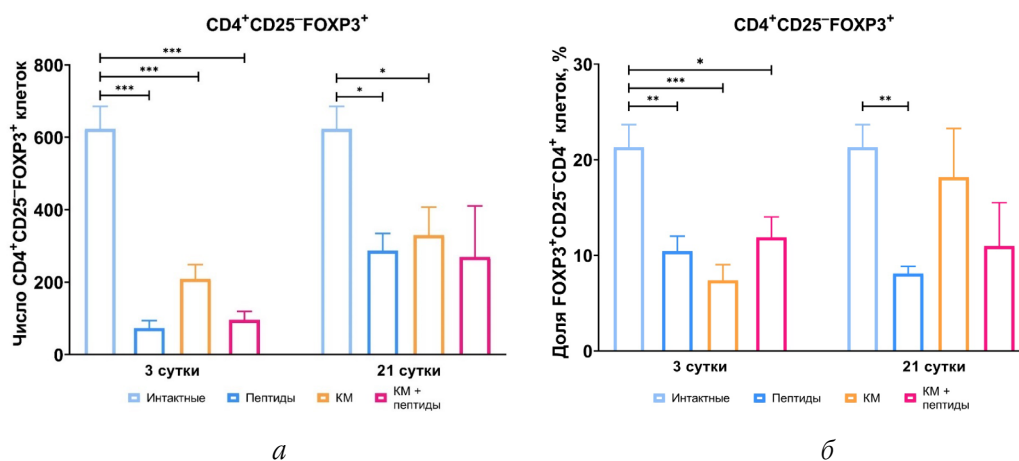


Рис. 3. Абсолютное (а) и относительное (б) количество CD4⁺CD25⁻FOXP3⁺ клеток в периферической крови крыс при аллотрансплантации КМ и введении пептидов ТБГ: данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего; N = 4; * – P < 0,05; ** – P < 0,01; *** – P < 0,001 (two-way ANOVA, post-hoc тест Тьюки для множественных сравнений)

Введение пептидов ТБГ также привело к снижению абсолютного и относительного количества CD25⁻FOXP3⁺ клеток в крови крыс в ранние сроки исследования и на 21-е сут эксперимента. Совместное введение пептидов ТБГ и аллогенных клеток КМ привело к сни-

жению уровня CD25⁻FOXP3⁺-клеток спустя 3-и сут (см. рис. 3). Однако на 21-е сут эксперимента уровень этих клеток стремился к уровню интактных животных. Обобщая результаты, установлено, что пептиды ТБГ способны снижать количество CD25⁻FOXP3⁺

CD4⁺-клеток у экспериментальных животных как на фоне аллогенной трансплантации, так и при самостоятельном применении.

Таким образом, пептиды ТБГ снижали уровень периферических Treg в ситуации трансплантации аллогенных клеток КМ. Важно отметить, что на 3-и сут эксперимента мы имеем дело с пулом Treg, который уже существует в организме, и мы видим это у интактных животных. Однако именно на 3-и сут введение пептидов ТБГ (как самих по себе, так и на фоне трансплантации КМ) привело к более выраженному снижению абсолютного числа Treg, чем трансплантация КМ. В то же время на 21-е сут эксперимента, по-видимому, мы наблюдаем антиген-специфические Treg, которые генерировались в ответ на введение аллогенных клеток. Одновременно эффект пептидов ТБГ уже не был столь выраженным. По-видимому, пептиды способны подавлять уже существующие в организме Treg, в то время антигенспецифические Treg, которые появляются в ходе эксперимента, уже не столь чувствительны к пептидам ТБГ.

Стоит отметить, что это результат, который не соответствует нашей рабочей гипотезе, так как мы предполагали, что пептиды ТБГ будут оказывать стимулирующий эффект на генерацию Treg. В то же время нельзя исключать тот факт, что локальное введение аллогенных клеток костного мозга не отразилось на уровне периферических Treg. Поэтому вторым этапом нашего исследования являлась оценка уровня локальных Treg в месте введения клеток.

Оценка уровня локальных Treg в экспериментах *in vivo* под воздействием пептидов ТБГ. В структуре коры лимфатического узла имеется две функциональные зоны. В наружной коре формируют скопления В-лимфоциты (лимфоидные узелки), и называется В-зона [15]. В зоне глубокой коры (паракортикальной зоне, Т-зона) лим-

фоциты располагаются диффузно. В этой области преобладают Т-лимфоциты, которые проходят здесь антигензависимую пролиферацию и дифференцировку. Мы изучали экспрессию FOXP3 как в Т-зоне, так и В-зоне для получения более полной картины происходящего в лимфатических узлах.

Результаты ИГХ-исследования показали, что дифференцировка лимфоцитов в направлении Treg, оцениваемая по экспрессии транскрипционного фактора FOXP3, имела следующую картину: интактные животные демонстрировали уровень экспрессии FOXP3 в количестве $299,9 \pm 24,58$ клетки, при этом распределение между наружной зоной (В-зона) и глубокой зоной (Т-зоной) было равновесным и сохранялось в динамике эксперимента (таблица).

Введение пептидов ТБГ показало, что на 3-и сут в пределах органа FOXP3 умеренно экспрессируется в лимфоидных узелках и в паракортикальной зоне, при этом их количество достоверно ниже, чем в группе контроля. Однако к 21-м сут отмечена тенденция к накоплению экспрессии маркера Treg: так, в клетках Т-зоны органа экспрессия не отличалась от таковой у интактных животных.

Введение аллогенных клеток КМ достоверно повышало число клеток, экспрессирующих FOXP3 на 3-и сут в исследуемых зонах органа, в сравнении с данными группы контроля (таблица). На этом фоне экспрессия FOXP3 верифицировалась в лимфоцитах диффузно как в В-зависимой зоне (лимфоидные узелки), так и в Т-зоне (паракортекс), распределение также было равновесным (см. таблицу). В целом это соответствует динамике иммунного ответа на введение аллогенных клеток. В частности, известно, что экспансия Treg наблюдалась именно в лимфоузлах толерантных животных, и уровень экспрессии FOXP3 коррелировал с выживаемостью трансплантата [16].

Влияние пептидов ТБГ на уровень экспрессии FOXP3 в клетках коркового вещества брыжеечных лимфатических узлов

Параметр	Значение							
Сроки, сут	3-и				21-е			
Группа	Интактные, 1-я группа	Пептиды, 2-я группа	КМ, 3-я группа	КМ+ Пептиды, 4 группа	Интактные, 1-я группа	Пептиды, 2-я группа	КМ, 3-я группа	КМ+ Пептиды, 4-я группа
Кора (вся)	299,9 ± 24,58	176,20 ± 11,90 *** (2-1)	455,70 ± 27,03 *** (3-1) *** (3-2)	282,20 ± 15,58 *** (4-3) *** (4-2)	293,90 ± 24,13	271,70 ± 6,70	400,20 ± 18,49 *** (3-1) *** (3-2)	207,60 ± 20,22 *** (4-1) * (4-3)
Наружная зона (В-зона)	128,9 ± 14,55	77,50 ± 11,40 ** (2-1)	265,30 ± 23,46 *** (3-1) *** (3-2)	149,80 ± 10,17 *** (4-3) *** (4-2)	124,8 ± 13,36	111,30 ± 7,42	165,00 ± 9,72	142,90 ± 9,92
Глубокая зона (Т-зона)	171,0 ± 21,10	98,70 ± 9,00 * (2-1)	211,20 ± 9,09 *** (3-2)	147,10 ± 8,9 *** (4-3) *** (4-2)	169,10 ± 21,2 7	160,40 ± 5,30	235,20 ± 14,92 *** (3-1) *** (3-2)	264,70 ± 14,96 *** (4-1) ** (4-3) * (4-2)

Примечание: данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего; N = 12; * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$ (two-way ANOVA, post-hoc тест Тьюки для множественных сравнений).

Введение пептидов на фоне введения клеток КМ приводило к относительному снижению экспрессии FOXP3 в Т-зоне брыжеечных лимфатических узлов на 21-е сут эксперимента. В целом к 3-м сут эксперимента уровень экспрессии FOXP3 снизился до показателя группы интактных животных (см. таблицу). Также отметим, что на 3-и сут мы фиксируем количество уже существующих в организме животных Treg, в то время как на 21-е сут это уже антиген-специфические Treg. Присутствие Treg в В-зонах лимфатических лимфоузлов может приводить к снижению продукции антител, при этом в ситуации введения аллогенного КМ наблюдается повышение уровня экспрессии FOXP3 именно в В-зоне.

Таким образом, пептиды ТБГ не оказывали ожидаемого воздействия на уровень локальных Treg в брыжеечных лимфоузлах, более того, их присутствие приводило к снижению количества этих клеток.

Стоит отметить, что ранее в аналогичных экспериментальных условиях мы про-

демонстрировали, что введение пептидов ТБГ на фоне аллогенной трансплантации КМ приводило к нормализации уровня $\alpha 2$ -микроглобулина, общего белка, креатинина и мочевины, что можно интерпретировать как противовоспалительный эффект данных пептидов [17]. В отношении цитокинового профиля было установлено, что пептиды ТБГ на фоне аллогенной трансплантации КМ увеличивали уровень IL-4, IL-10 и IL-13 на 14-е сут, а IL-13 еще и на 21-е сут после начала эксперимента. Помимо этого, введение пептидов ТБГ приводило к повышению уровня IL-2, M-CSF, MCP-1 и RANTES также на 14-е сут от начала эксперимента и постепенному снижению их уровня к концу эксперимента в сравнении с данными контрольной группы. В целом применение пептидов ТБГ в процессе развития иммунного ответа на аллотрансплантат ускоряет нормализацию концентраций подавляющего большинства исследованных цитокинов, что свидетельствует об иммунофармакологическом потенциале этих пептидов [10]. Важно

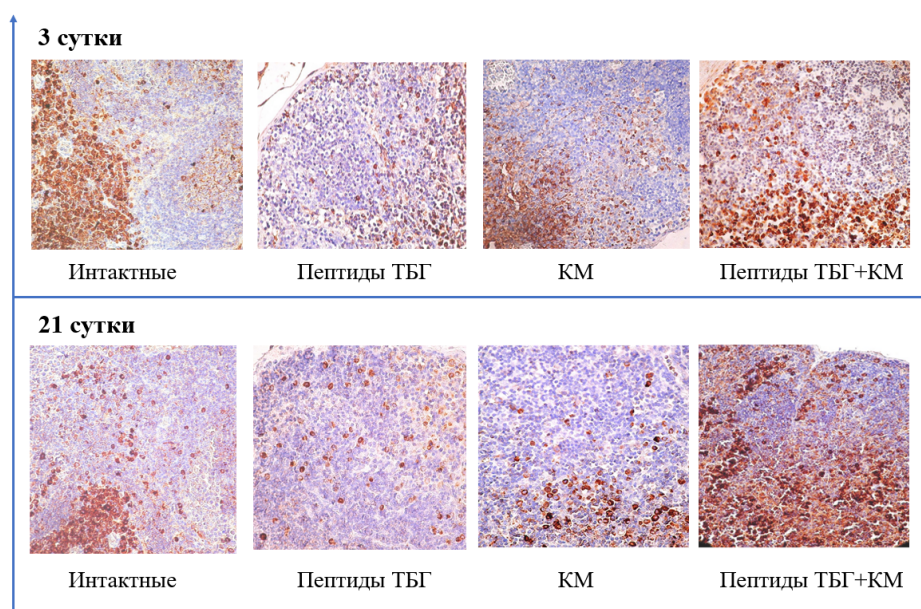


Рис. 4. Влияние пептидов ТБГ на уровень экспрессии FOXP3 в клетках коркового вещества брыжеечных лимфатических узлов на примере отдельных срезов (ув. X400)

также напомнить, что ТБГ в виде полноценной рекомбинантной молекулы в ситуации трансплантации костного мозга в эксперименте на мышах показал свою клиническую эффективность и способствовал снижению РТПХ [18]. Очевидно, выбранные нами пептиды не повторяют эффекты целой молекулы ТБГ, не являясь пептидомиметиками в полной мере. Однако полученные данные могут использоваться для разработки фармакологического препарата на основе исследуемых пептидов для коррекции дисбаланса иммунитета.

Выводы

Таким образом, показано, что введение пептидов ТБГ на фоне введения аллогенных клеток КМ снижало абсолютное и относительное количество Treg в периферической крови крыс на 3-и и 21-е сут эксперимента. Введение пептидов ТБГ на фоне введения клеток КМ также приводило к относительному снижению экспрессии FOXP3 в Т-зоне брыжеечных лимфатических узлов на 21-е сут

эксперимента. В итоге мы установили, что пептиды ТБГ не оказывали ожидаемого воздействия на уровень периферических и локальных Treg, более того, присутствие пептидов приводило к снижению количества этих клеток. Тем не менее снижение уровня этих клеток может быть необходимо в ряде клинических ситуаций, таких как снижение уровня Treg в микроокружении опухоли. Возможно, именно этот эффект может стать следующей тактикой изучения пептидных фрагментов ТБГ в качестве потенциального фармакологического препарата.

Библиографический список

1. Wang L., Wang N., Zhang W. Cheng X., Yan Z., Shao G., Wang X., Wang R. Therapeutic peptides: current applications and future directions. Sig Transduct Target Ther. 2022; 7: A48. DOI: 10.1038/s41392-022-00904-4
2. Apostolopoulos V., Bojarska J., Chai T.T., Elnagdy S., Kaczmarek K., Matsoukas J., New R., Parang K. et al. A Global Review on Short Pep-

tides: Frontiers and Perspectives. *Molecules* 2021; 26 (2): 430. DOI: 10.3390/molecules26020430.

3. Moldogazieva N.T., Mokbosoev I.M., Terentiev A.A. Pregnancy-specific β 1-glycoproteins: combined biomarker roles, structure/function relationships and implications for drug design. *Curr. Med. Chem.* 2017; 3 (24): 245–267. DOI: 10.2174/0929867324666161123090554

4. Федореева Л.И., Куреев И.И., Хавинсон В.Х., Ванюшин Б.Ф. Проникновение коротких флуоресцентно-меченных пептидов в ядро в клетках HeLa и специфическое взаимодействие пептидов с дезоксирибополигуклеотидами и ДНК in vitro. *Биохимия* 2011; 76 (11): 1505–1516.

5. Hori S. FOXP3 as a master regulator of Treg cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2021; 21: 618–619. DOI: 10.1038/s41577-021-00598-9

6. Rodríguez-Perea A.L., Arcia E.D., Rueda C.M., Velilla P.A. Phenotypical characterization of regulatory T cells in humans and rodents. *Clin. Exp. Immunol.* 2016; 185 (3): 281–91. DOI: 10.1111/cei.12804.

7. Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M. 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 2008; 133: 775–787. DOI: 10.1016/j.cell.2008.05.009.

8. Корсунский И.А., Румянцев А.Г., Быковская С.Н. Роль регуляторных Т-клеток CD4⁺CD25⁺ и мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в подавлении реакции трансплантат против хозяина. *Онкогематология* 2008; 3: 45–51.

9. Hardt F., Claësson M.H. Graft-versus-host reactions mediated by spleen cells from amyloidotic and nonamyloidotic mice. *Transplantation* 1971; 12: 36–39. DOI: 10.1097/00007890-197107000-00005

10. Тимганова В.П., Бочкова М.С., Шардина К.Ю., Ужвийок С.В., Гутина Е.В., Раев М.Б., Любимов А.В., Заморина С.А. Влияние коротких пептидных фрагментов ТБГ на цитокиновый профиль крыс Wistar при аллогенной трансплантации в эксперименте *in vivo*.

Медицинская иммунология 2022; 24 (3): 491–506. DOI: 10.15789/1563-0625-EOS-2472

11. Sellaró T.L., Filkins R., Hoffman C., Fine J.L., Ho J., Parwani A.V., Pantanowitz L., Montalto M. Relationship between magnification and resolution in digital pathology systems. *J. Pathol. Inform.* 2013; 4: 21. DOI: 10.4103/2153-3539.116866.

12. Liu X., Wang X., Ding J., Gao Y., Zhao Y., Zhao R., Sun Q., Zhang S. FOXP3 and CD25 double staining antibody cocktails identify regulatory T cells in different types of tumor tissues using tissue microarrays. *Ann Diagn Pathol.* 2019; 38: 67–70. DOI: 10.1016/j.anndiagpath.2018.11.005.

13. Martín-Moreno P.L., Tripathi S., Chandraker A. Regulatory T Cells and Kidney Transplantation. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2018; 13 (11): 1760–1764. DOI: 10.2215/CJN.01750218.

14. Zobouri M., Mehdipour F., Razmkhab M., Faghib Z., Ghaderi A. CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells: a distinct subset or a heterogeneous population? *Int. Rev. Immunol.* 2021; 40 (4): 307–316. DOI: 10.1080/08830185.2020.1797005

15. Willard-Mack C.L. Normal Structure, Function, and Histology of Lymph Nodes. *Toxicologic Pathology* 2006; 34 (5): 409–424. DOI: 10.1080/01926230600867727

16. Ochando J.C., Yopp A.C., Yang Y., Garin A., Li Y., Boros P., Llodra J., Ding Y., Lira S.A., Krieger N.R., Bromberg J.S. Lymph node occupancy is required for the peripheral development of alloantigen-specific Foxp3⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.* 2005; 174 (11): 6993–7005. DOI: 10.4049/jimmunol.174.11.6993.

17. Бочкова М.С., Тимганова В.П., Ужвийок С.В., Гутина Е.В., Раев М.Б., Любимов А.В., Заморина С.А. Влияние коротких пептидов ТБГ на маркеры воспаления при аллогенной трансплантации клеток костного мозга у крыс Вистар. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2023; 175 (5): 591–596. DOI: 10.47056/0365-9615-2023-175-5-591-596.

18. Jones K., Bryant S., Luo J., Kiesler P., Koontz S., Warren J., Malech H., Kang E., Dvek-

sler G. Recombinant Pregnancy-Specific Glycoprotein 1 Has a Protective Role in a Murine Model of Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2019; 25 (2): 193–203. DOI: 10.1016/j.bbmt.2018.09.022.

REFERENCES

1. Wang L., Wang N., Zhang W. Cheng X., Yan Z., Shao G., Wang X., Wang R. Therapeutic peptides: current applications and future directions. *Sig Transduct Target Ther.* 2022; 7: A48. doi.org/10.1038/s41392-022-00904-4
2. Apostolopoulos V., Bojarska J., Chai T.T., Elnagdy S., Kaczmarek K., Matsoukas J., New R., Parang K. et al. A Global Review on Short Peptides: Frontiers and Perspectives. *Molecules.* 2021; 26 (2): 430. DOI: 10.3390/molecules26020430.
3. Moldogazieva N.T., Mokbosoev I.M., Terentiev A.A. Pregnancy-specific β 1-glycoproteins: combined biomarker roles, structure/function relationships and implications for drug design. *Curr. Med. Chem.* 2017; 3 (24): 245–267. DOI: 10.2174/0929867324666161123090554
4. Fedoreeva L.I., Kireev I.I., Havinson V.H., Vanyushin B.F. Proniknovenie korotkih fluorescentno-mechennyyh peptidov v yadro v kletkah HeLa i specificheskoe vzaimodejstvie peptidov s dezoksiribooligonukleotidami i DNK in vitro. *Biobimiya* 2011; 76 (11): 1505–1516 (in Russian).
5. Hori S. FOXP3 as a master regulator of Treg cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2021; 21: 618–619. doi.org/10.1038/s41577-021-00598-9
6. Rodriguez-Perea A.L., Arcia E.D., Rueda C.M., Velilla P.A. Phenotypical characterization of regulatory T cells in humans and rodents. *Clin. Exp. Immunol.* 2016; 185 (3): 281–91. DOI: 10.1111/cei.12804.
7. Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M. 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 2008; 133: 775–787. DOI: 10.1016/j.cell.2008.05.009.
8. Korsunskij I.A., Rumyansev A.G., Bykovskaya S.N. Rol' regulatorynyh T-kletok CD4+CD25+ i mezenhimal'nyh stvolovyh kletok kostnogo mozga v podavlenii reakcii transplantat protiv hozyaina. *Onkogematologiya* 2008; 3: 45–51 (in Russian).
9. Hardt F., Claesson M.H. Graft-versus-host reactions mediated by spleen cells from amyloidotic and nonamyloidotic mice. *Transplantation.* 1971; 12: 36–39. DOI: 10.1097/00007890-197107000-00005
10. Timganova V.P., Bochkova M.S., SHardina K.YU., Uzhviyuk S.V., Gutina E.V., Raev M.B., Lyubimov A.V., Zamorina S.A. Vliyaniye korotkih peptidnyh fragmentov TBG na citokinovyj profil' krysa Wistar pri allogennoj transplantacii v eksperimente in vivo. *Meditsinskaya immunologiya* 2022; 24 (3): 491–506. DOI: 10.15789/1563-0625-EOS-2472 (in Russian).
11. Sellaro T.L., Filkins R., Hoffman C., Fine J.L., Ho J., Parwani A.V., Pantanowitz L., Montalto M. Relationship between magnification and resolution in digital pathology systems. *J. Pathol. Inform.* 2013; 4: 21. DOI: 10.4103/2153-3539.116866.
12. Liu X., Wang X., Ding J., Gao Y., Zhao Y., Zhao R., Sun Q., Zhang S. FOXP3 and CD25 double staining antibody cocktails identify regulatory T cells in different types of tumor tissues using tissue microarrays. *Ann Diagn Pathol.* 2019; 38: 67–70. DOI: 10.1016/j.anndiagpath.2018.11.005.
13. Martin-Moreno P.L., Tripathi S., Chandraker A. Regulatory T Cells and Kidney Transplantation. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2018; 13 (11): 1760–1764. doi.org/10.2215/CJN.01750218.
14. Zobouri M., Mehdipour F., Razmkhab M., Faghib Z., Ghaderi A. CD4+CD25-FoxP3+ T cells: a distinct subset or a heterogeneous population? *Int. Rev. Immunol.* 2021; 40 (4): 307–316. DOI: 10.1080/08830185.2020.1797005
15. Willard-Mack C.L. Normal Structure, Function, and Histology of Lymph Nodes. *Toxicologic Pathology* 2006; 34 (5): 409–424. DOI: 10.1080/01926230600867727
16. Ochando J.C., Yopp A.C., Yang Y., Garin A., Li Y., Boros P., Llodra J., Ding Y.,

Lira S.A., Krieger N.R., Bromberg J.S. Lymph node occupancy is required for the peripheral development of alloantigen-specific Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Immunol.* 2005; 174 (11): 6993–7005. DOI: 10.4049/jimmunol.174.11.6993.

17. Bochkova M.C., Timganova V.P., Uzhviyuk S.V., Gutina E.V., Raev M.B., Lyubimov A.V., Zamorina S.A. Vliyanie korotkih peptidov TBG na markery vospaleniya pri allogennoj transplantacii kletok kostnogo mozga u krysov Vistar. *Byulleten' eksperimental'noj biologii i mediciny* 2023; 175 (5): 591–596. DOI: 10.47056/0365-9615-2023-175-5-591-596 (in Russian).

18. Jones K., Bryant S., Luo J., Kiesler P., Koontz S., Warren J., Malech H., Kang E., Dveksler G. Recombinant Pregnancy-Specific

Glycoprotein 1 Has a Protective Role in a Murine Model of Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2019; 25 (2): 193–203. DOI: 10.1016/j.bbmt.2018.09.022.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке правительства Пермского края в рамках научного проекта № С-26/509.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов равноценен.

Поступила: 25.10.2023

Одобрена: 27.10.2023

Принята к публикации: 01.11.2023

Просьба ссылаться на эту статью в русскоязычных источниках следующим образом: Влияние пептидов трофобластического β 1-гликопротеина на уровень периферических и локальных Т-регуляторных лимфоцитов у крыс Wistar при аллогенной трансплантации клеток костного мозга / С.А. Заморина, М.С. Бочкова, В.П. Тимганова, В.В. Власова, А.В. Любимов, Н.П. Логинова, Ю.А. Чарушина, Н.В. Чемурзиева, М.Б. Раев// Пермский медицинский журнал. – 2023. – Т. 40, № 6. – С. 135–147. DOI: 10.17816/pmj406135-147

Please cite this article in English as: Zamorina S.A., Bochkova M.S., Timganova V.P., Vlasova V.V., Lyubimov A.V., Loginova N.P., Charushina Yu.A., Chemurzieva N.V., Rayev M.B. Effect of peptides of trophoblastic β 1-glycoprotein on peripheral and local T-regulatory lymphocytes level in Wistar rats with allogeneous bone marrow cell transplantation. *Perm Medical Journal*, 2023, vol. 40, no. 6, pp. 135-147. DOI: 10.17816/pmj406135-147