

Научная статья

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

DOI: 10.17816/pmj415147-159

ВЛИЯНИЕ ГЛИКОДЕЛИНА НА ФОРМИРОВАНИЕ ИММУННОГО ОТВЕТА НА УРОВНЕ Т-ХЕЛПЕРОВ И Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO*

**С.А. Заморина¹, Я.Н. Тройнич², Н.П. Логинова^{2*}, Н.В. Чемурзиева²,
М.С. Бочкова¹, В.П. Тимганова¹, В.В. Власова¹, М.Б. Раев¹**

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения РАН, г. Пермь,

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

© Заморина С.А., Тройнич Я.Н., Логинова Н.П., Чемурзиева Н.В., Бочкова М.С., Тимганова В.П., Власова В.В., Раев М.Б., 2024

тел. +7 902 475 90 67

e-mail: natalitsa@yandex.ru

[Заморина С.А. – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и биотехнологии, ORCID: 0000-0002-6474-1487; Логинова Н.П. (*контактное лицо) – доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии, ORCID: 0000-0001-8597-2682; Тройнич Я.Н. – преподаватель кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии, ORCID: 0000-0002-1053-6031; Чемурзиева Н.В. – кандидат биологических наук, начальник отдела учебно-методического и научного обеспечения, ORCID: 0009-0006-0228-0896; Бочкова М.С. – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и биотехнологии, 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, ORCID: 0000-0002-1656-7277; Раев М.Б. – доктор биологических наук, заведующий лабораторией клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, ORCID: 0000-0001-6882-4928].

© Zamorina S.A., Troynich Ya.N., Loginova N.P., Chemurzieva N.V., Bochkova M.S., Timganova V.P., Vlasova V.V., Rayev M.B., 2024

tel. +7 902 475 90 67

e-mail: natalitsa@yandex.ru

[Zamorina S.A. – DSc (Biology), Leading Researcher of the Laboratory of Cellular Immunology and Biotechnology. ORCID: 0000-0002-6474-1487; Troynich Ya.N. – Lecturer of the Department of Histology, Embryology and Cytology, ORCID: 0000-0002-1053-6031; Loginova N.P. (*contact person) – DSc (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Histology, Embryology and Cytology, ORCID: 0000-0001-8597-2682; Chemurzieva N.V. – PhD (Biology), Head of the Department of Educational, Methodological and Scientific Support, ORCID: 0009-0006-0228-0896; Bochkova M.S. – PhD (Biology), Researcher of the Laboratory of Cellular Immunology and Biotechnology, ORCID: 0000-0001-5784-6224; V.P. Timganova – PhD (Biology), Researcher of the Laboratory of Cellular Immunology and Biotechnology, ORCID: 0000-0003-4581-1969; Vlasova V.V. – Junior Researcher of the Laboratory of Molecular Immunology, ORCID: 0000-0002-1656-7277; Rayev M.B. – DSc (Biology), Head of the Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology. ORCID: 0000-0001-6882-4928].

INFLUENCE OF GLYCODELIN ON THE FORMATION OF IMMUNE RESPONSE AT THE LEVEL OF T-HELPERS AND T-REGULATORY CELLS IN AN *IN VIVO* EXPERIMENT

S.A. Zamorina¹, Ya.N. Troynich², N.P. Loginova^{2*}, N.V. Chemurzieva²,
M.S. Bochkova¹, V.P. Timganova¹, V.V. Vlasova¹, M.B. Rayev¹

¹*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences ("IEGM UB RAS") – a branch of the Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm,*

²*E.A. Vagner Perm State Medical University, Russian Federation*

Цель. Исследование эффектов гликоделина на количество Т-хелперов и Treg в ходе развития иммунного ответа на введение аллогенных клеток крысам Wistar в динамике.

Материалы и методы. Учитывая тот факт, что гликоделин является фетоплацентарным белком с иммуносупрессорной активностью, изучали терапевтический потенциал этого белка в эксперименте *in vivo*. Работу проводили с использованием авторской экспериментальной модели реакции «хозяин против трансплантата». Реципиентами были самцы крыс Wistar, не подвергавшиеся предварительной цитостатической терапии. Животным вводили рекомбинантный гликоделин на фоне аллогенной внутрибрюшинной трансплантации клеток КМ в динамическом эксперименте, оценивая следующие параметры: уровень периферических Т-хелперов (CD4⁺) и Treg (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺), экспрессию CD4 и FOXP3 в селезенке и брыжеечных лимфатических узлах. Материал забирали на 3-й и 21-е сут эксперимента.

Результаты. Установлено, что в процессе развития иммунного ответа на аллоантигены гликоделин снижал абсолютное количество Т-хелперов в периферической крови крыс на 3-й и 21-й день после аллотрансплантации и увеличивал число Treg через три недели эксперимента. На 3-й сут было отмечено снижение уровня Treg в белой пульпе селезенки, в то время как на 21-е сут наблюдалось увеличение количества этих клеток при одновременном снижении Т-хелперов. В брыжеечных лимфатических узлах гликоделин также снижал уровень Т-хелперов на 21-е сут эксперимента, одновременно повышая количество Treg. В целом наблюдался однонаправленный и распределенный эффект гликоделина на формирование иммунного ответа на уровне Т-хелперов, заключающийся в снижении количества Т-хелперов, но повышении уровня Treg на 21-е сут эксперимента.

Выводы. Таким образом, гликоделин оказывал иммуномодулирующее действие на формирование Т-хелперов и Treg. Вектор полученных эффектов носил иммунодепрессивный характер и способствовал подавлению иммунного ответа на аллогенные клетки.

Ключевые слова. Гликоделин, аллогенный трансплантат, иммунный ответ, Т-хелперы, Т-регуляторные лимфоциты, FOXP3, крысы Wistar.

Objective. To study the influence of glycodelin on T-helpers and Tregs level in the process of forming an immune response to the introduction of allogeneic bone marrow (BM) cells in a dynamic experiment on Wistar rats.

Materials and methods. The original experimental model "host versus transplant reaction" on male Wistar rats without preliminary conditioning in recipients was used in the study. Animals were administered recombinant glycodelin against the background of allogeneic intraperitoneal transplantation of BM cells in a dynamic experiment. The level of peripheral T-helpers (CD4⁺) and Tregs (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺), and the expression of FOXP3 in the spleen and mesenteric lymph nodes were assessed. The material was collected on the 3rd and 21st days of the experiment.

Results. Glycodelin was shown to reduce the absolute number of T-helpers in the peripheral blood (on the 3rd and 21st days) and to increase the proportion of Tregs on the 21st day of the experiment against the background of the introduction of allogeneic BM cells. It was found out, that glycodelin reduced the level of Tregs in the white pulp of the spleen on the 3rd day of the experiment, while the number of these cells on the 21st day increased, reducing the

number of T-helpers at the same time. At the level of the mesenteric lymph nodes, glycodelin reduced the level of T-helpers on the 21st day of the experiment, simultaneously increasing the number of Tregs. In general, a unidirectional and distributed effect of glycodelin on the immune response at the level of T-helpers was observed, that was a decrease of T-helpers, but an increase of Tregs on the 21st day of the experiment.

Conclusion. Thus, glycodelin had an immunomodulatory effect on T-helpers and Tregs formation. The vector of the obtained effects was immunosuppressive in nature and contributed to the suppression of the immune response to allogeneic cells.

Keywords. Glycodelin, allogeneic transplant, immune response, T-helpers, T-regulatory lymphocytes, FOXP3, Wistar rats.

ВВЕДЕНИЕ

Гликоделин (PP14, PAEP, альфа-2-микроглобулин) – димерный гликопротеин с молекулярной массой 42–56 кДа, биомаркер рецептивности эндометрия, предопределяющий успешность имплантации. В 2018 г. А. Диксит с соавт. в эксперименте на мышах показали, что обработка аллоактивированных мононуклеарных клеток гликоделином предотвращала отторжение трансплантата [1]. Это исследование открыло для данного белка перспективы послужить основой для биопрепарата, ослабляющего посттрансплантационные осложнения. Шнайдер и соавт., например, высказали предположение о возможном применении гликоделина при пересадке легких [2]. Очевидны перспективы использования гликоделина в качестве лекарственного средства не только в трансплантологии, но и для иммунотерапии аутоиммунных заболеваний [3]. Несмотря на то что иммуносупрессивные эффекты гликоделина хорошо известны [4], его роль в регуляции иммунного ответа на уровне Т-хелперов (Th) и Т-регуляторных клеток (Treg) изучена недостаточно.

Иммунный ответ – это цепь последовательных сложных кооперативных процессов, происходящих в иммунной системе в ответ на антиген. Одну из ключевых ролей в этих процессах играют Т-клетки, а именно Т-хелперы. Эти клетки оказывают помощь В-клеткам в выработке антител, стимулируют макрофаги к усилению бактерицидной ак-

тивности, привлекают фагоциты в места инфекции и воспаления, а также при помощи цитокинов и хемокинов регулируют иммунный ответ. Т-хелперы могут дифференцироваться в разные субпопуляции, отличающиеся спектром продуцируемых цитокинов. Активация этих клеток сопровождается появлением на их мембране молекулы CD25, которая является α субъединицей рецептора интерлейкина-2 (IL-2R α) [5]. Активированные Т-хелперы (CD4⁺CD25⁺ Т-клетки) являются разнородной популяцией, включающей в себя несколько субпопуляций, отличающихся фенотипически и функционально. В том числе к ним относятся и CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ регуляторные Т-лимфоциты (Treg) [6]. Проявляя выраженные супрессивные функции, эти клетки играют важную роль во многих иммунологических процессах. Так, они поддерживают Т-клеточный гомеостаз, участвуют в предотвращении гиперчувствительности, аутоиммунных заболеваний и подавлении реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ). Регулятором дифференцировки и функционирования Tregs является экспрессирующийся только у этой субпопуляции фактор транскрипции FOXP3. Следовательно, фенотип Treg человека и грызунов можно определить как CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ [7]. Нужно подчеркнуть, что Treg функционируют не только непосредственно в месте проникновения аллоантигена и в иммунных органах, но и в периферической крови. Селезенка – важнейший вторичный орган иммунной системы. Содержание лимфоцитов в

белой пульпе селезенки достигает 85 % общего числа клеток, что составляет почти 25 % всех лимфоцитов организма [8]. Таким образом, именно селезенка наряду с лимфатическими узлами обеспечивает адекватный иммунный ответ, именно поэтому мы оценивали дифференцировку Т-хелперов и Treg и в периферической крови, и в селезенке и брыжеечных лимфоузлах.

Цель исследования – проанализировать эффект рекомбинантной формы гликоделина на количество Т-хелперов и Treg в периферической крови, селезенке и брыжеечных лимфоузлах в динамике развития иммунного ответа на введение аллогенных клеток крыс Wistar.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили в виварии Пермского государственного национально-го исследовательского университета на 2–3-месячных самцах белых крыс линии Wistar со средней массой 250 г ($n = 38$). Животные содержались в соответствующих ГОСТ 33216-2014 («Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами») условиях. Во всех экспериментах были соблюдены биоэтические нормы (Европейская конвенция по защите экспериментальных животных (86/609/ЕЕС; 1986)).

Работу проводили с использованием авторской экспериментальной модели реакции «хозяин против трансплантата», описанной ранее [9].

Клетки КМ, полученные из бедренных костей, подвергались обработке цитостатиком камптотецином для предупреждения развития иммунного ответа клеток донора на клетки реципиента (реакция «трансплантат против хозяина»). Умерщвление животных проводили путём декапитации в соответствии с международными правилами работы с экспериментальными животными на раннем

(3-и сут) и позднем сроке (21-е сут) развития иммунного ответа. При этом производили забор периферической крови, селезенки и брыжеечных лимфоузлов. Было исследовано минимум четыре различных препарата каждого органа для отдельно взятого животного.

Крыс распределили на три экспериментальных группы: первая группа ($n = 8$) – интактные крысы; вторая группа ($n = 12$) – контроль гликоделина (животным производили введение аллогенных клеток костного мозга внутрибрюшинно); третья группа ($n = 12$) – собственно опытные животные (после внутрибрюшинного введения аллогенных клеток производили внутримышечные инъекции рекомбинантного гликоделина (#MBS718444, «MyBioSource», Германия) на 1, 5, 9-е и 12-е сутки). При этом расчетная достигаемая концентрация препарата в крови животных составляла $\approx 0,75$ мкг/мл.

Оценка уровня Th и Treg. Уровень данных клеток оценивали по описанной нами ранее методике [9]. Цитометрическое определение числа клеток в субпопуляциях проводили с применением готового набора антител к поверхностным молекулам Т-клеток крыс FlowX Rat Regulatory T Cell Kit (R&D Systems, США), в который входят анти-CD25-PE, анти CD4-FITC и анти-FOXP3-AlexaFluor 647 антитела. Анализировали размороженные пробы крови, в которых отсутствовали следы гемолиза, а клетки сохраняли хорошую жизнеспособность. Для этого использовали проточный цитометр CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Результаты цитометрического анализа представлены как процент клеток в популяциях CD4⁺ (Т-хелперы), CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ (активированные Т-хелперы) и CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ (регуляторные Е-клетки). Помимо относительного количества (процент) данные пересчитаны в абсолютные значения на основе общего количества лимфоцитов в мл периферической крови.

Иммуногистохимическое исследование проводили методом, описанным ра-

нее [10]. Для определения качественного состава использовали моноклональные антитела (Cloude-Clon Corp, США) к CD4 (SP35) и FOXP3 (recombinant; Tyr191-Glu412). Положительным результатом иммуногистохимической реакции являлось специфическое окрашивание клеток. Результаты обсчета представлены в виде количества клеток с положительной экспрессией CD4 или FOXP3 в поле зрения.

Статистическую обработку данных производили в программе GraphPad Prizm 8 с применением двухфакторного дисперсионного анализа и апостериорного теста Тьюки.

Дополнительно рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона между значениями экспрессии CD4/FOXP3 и количеством хелперных и регуляторных Т-клеток. Уровень значимости принимали за 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Т-хелперы (CD4⁺Т-клетки) играют центральную роль в иммунной защите. Наивные CD4⁺ Т-клетки после встречи с антигеном могут дифференцироваться в ключевые субпопуляции Th1, Th2, Th17 и Treg-клетки под воздействием набора сигналов [6]. Treg обладают супрессивной активностью по отношению к эффекторным иммунным клеткам, контролируя сохранение аутоотолерантности, что препятствует развитию воспалительных аутоиммунных заболеваний. Помимо этого, Treg имеют важное значение в контроле иммунного ответа на аллотрансплантат [11].

Влияние гликоделина на уровень Т-хелперов и Treg в периферической крови экспериментальных животных. При анализе полученных данных установлено, что введение КМ не влияло на процентное и абсолютное содержание Т-хелперов в периферической крови крыс (рис. 1). Введение гликоделина приводило к снижению абсолютного количества этих клеток как на

3-и сут, так и на 21-е сут эксперимента. Снижение было достоверно как по отношению к интактным животным, так и по отношению к животным, которым вводили аллогенный КМ. Таким образом, гликоделин снижал уровень Th в данном эксперименте.

В то же время при анализе уровня активированных Т-хелперов (CD4⁺CD25⁺) было установлено, что трансплантация крысам КМ не влияла на уровень этих клеток. Введение гликоделина также не отразилось на содержании активированных Th (см. рис. 1).

Помимо этого, выявлено, что на третий день после введения животным аллогенных клеток процент и абсолютное количество Treg в общей популяции CD4⁺ Т-клеток существенно уменьшаются по отношению к показателям интактных крыс. Инъекции гликоделина не приводили к изменениям данных показателей (см. рис. 1). По-видимому, само введение клеток аллогенного КМ снижало количество Treg, что согласуется с данными Корсунского и соавт. [12]. На 21-е сут после введения клеток аллогенного КМ у животных 2-й группы (контроль гликоделина) процент и абсолютное количество Treg в мл крови также были ниже, чем в группе интактных животных. В то же время у животных 3-й группы (опыт) гликоделин повышал процентное содержание Treg, приближая уровень этих клеток к таковому у интактных животных (см. рис. 1). По-видимому, на 21-е сут эксперимента мы можем вести речь об антигенспецифических Treg. Таким образом, гликоделин способен повышать уровень Treg в ситуации иммунного ответа.

Таким образом, введение гликоделина на фоне трансплантации аллогенных КМ вызывало снижение абсолютного количества Т-хелперов. В то же время уровень активированных Т-хелперов в крови у экспериментальных групп животных оставался неизменным. Продemonстрировано повышение доли периферических Treg в финале эксперимента

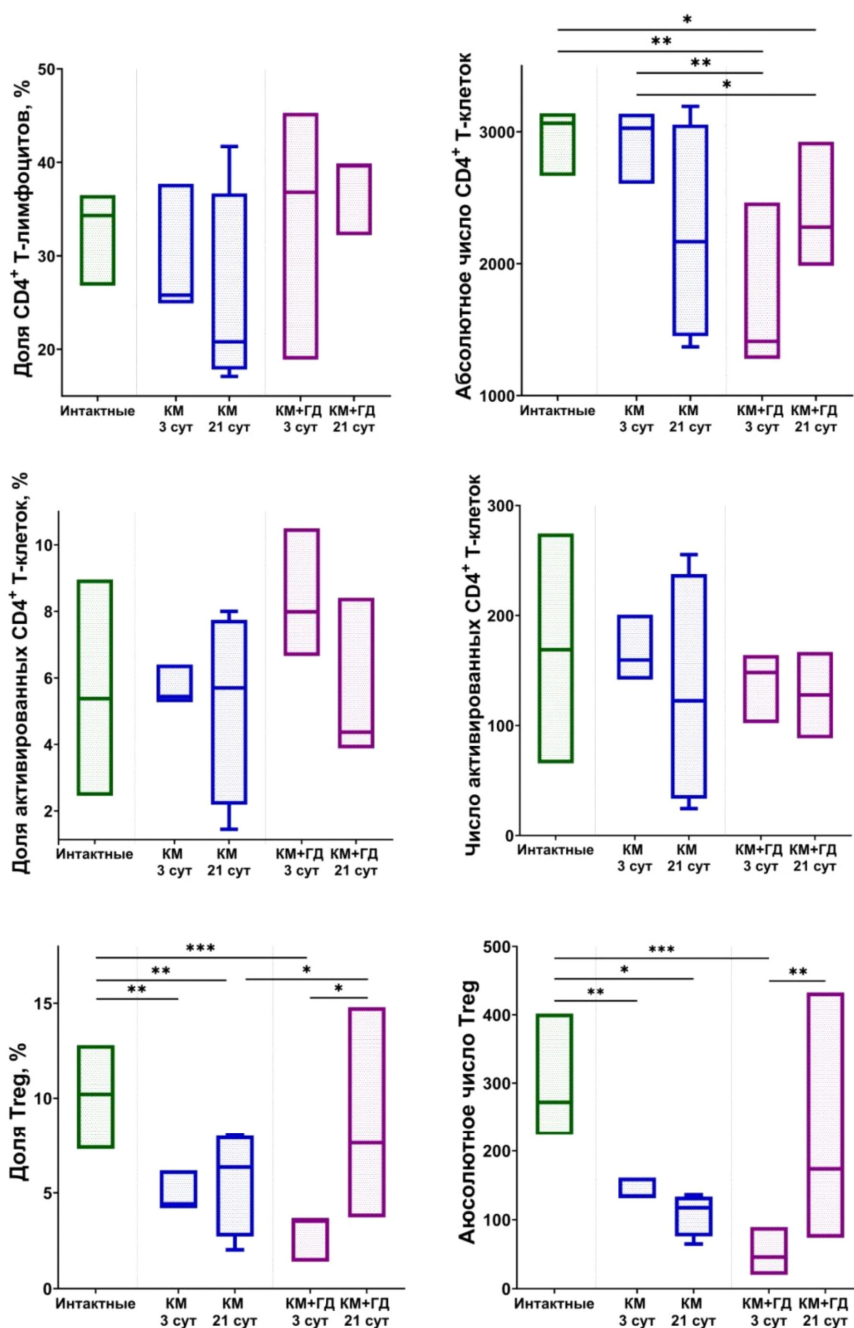


Рис. 1. Процентное содержание и абсолютное количество Т-хелперов (CD4⁺), активированных Т-хелперов (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) и Treg (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) в периферической крови крыс при введении клеток аллогенного КМ и терапии гликоделином на фоне аллогенной трансплантации ($n = 4$, $M \pm t$): данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ (двухфакторный ANOVA, апостериорный тест Тьюки для множественных сравнений)

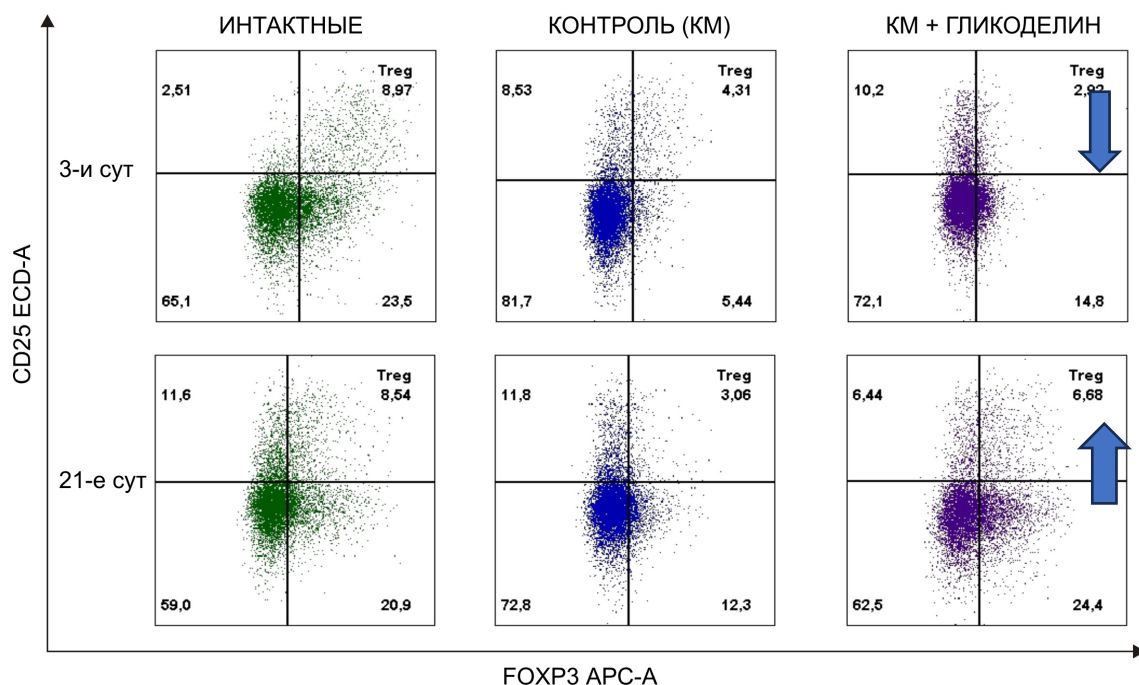


Рис. 2. Уровень Treg в крови экспериментальных животных на 3-и и 21-е сут после трансплантации КМ и введения гликоделина на примере одного эксперимента: по оси абсцисс – интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных анти-FOXP3-антителами; по оси ординат – интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных анти-CD25-антителами

(на 21-е сут) под воздействием гликоделина в сравнении с группой, которой вводили КМ. В целом повышение Treg под воздействием гликоделина является крайне важным иммуномодулирующим эффектом, приводящим к подавлению иммунного ответа на аллогенные клетки.

Влияние гликоделина на количество Т-хелперов и Treg в селезенке экспериментальных животных. В селезенке крыс, не подвергавшихся никаким воздействиям (1-я группа), были видны хорошо развитые функциональные зоны. В красной пульпе отчетливо определялись широкие заполненные клетками селезеночные тяжи, в которых наблюдалось умеренное скопление CD4⁺ лимфоцитов (Т-хелперов). Сосуды красной пульпы были умеренно расширены и заполнены клетками крови. Белая пульпа, по

визуальной оценке, занимала около трети площади органа. Периартериальная лимфоидная муфта (ПАЛМ) выглядела широкой и многоклеточной. По краю ПАЛМ лимфоциты формировали скопления с преобладанием CD4⁺-клеток. Наблюдаемые лимфоидные узелки (В-зона) различались по размеру, большая их часть была активна. В маргинальной зоне определялись скопления CD4⁺-лимфоцитов. В селезенке животных, которым вводили только аллогенный КМ (2-я группа) начиная с 3-х сут увеличивался объем белой пульпы. В её зонах наблюдалось умеренное, местами единичное присутствие положительно окрашенных CD4⁺-клеток. В маргинальной зоне обнаруживались клетки, экспрессирующие молекулу CD4. Вплоть до 21-го дня эксперимента зоны белой пульпы выглядели активными и крупными. Ви-

зуализировались множественные лимфоциты, которые формировали в пульпе диффузные скопления или лимфоцитарные муфточки вокруг кисточковых артериол. Экспрессию молекулы Т-хелперов CD4 в основном детектировали в краевой зоне белой пульпы. Более интенсивное окрашивание CD4⁺-клеток присутствовало в тяжах красной пульпы органа (рис. 3).

В селезенке крыс опытной (3-й) группы (аллогенный КМ+гликоделин) на третий день после аллотрансплантации определялись крупные и мелкие сосуды венозного русла с широким просветом и с клетками крови. Крупные скопления CD4⁺-лимфоцитов наблюдались в тяжах красной пульпы, переполненных клетками. Белая пульпа занимала более 40 % площади органа. Все её зоны выглядели развитыми и активными, В-зона была представлена крупными лимфоидными узелками, в которых обнаруживались признаки пролиферации, а Т-зоны составляли значительную часть белой пульпы, формируя плотное скопление вокруг центральной артерии. Экспрессирующие CD4-лимфоциты находились вдоль края ПАЛМ. Хотя вплоть до окончания эксперимента функциональные зоны белой пульпы пребывали в состоянии активности, размеры Т- и В-зон были уменьшены или не изменены. Визуально количество CD4⁺-клеток уменьшалось, пролиферация была немного снижена, но наблюдалось накопление Т-хелперов в тяжах красной пульпы, где обычно и завершается процесс их дифференцировки (рис. 3).

Для углубленного анализа полученных данных была проведена их статистическая обработка по сопоставлению экспрессии молекулы CD4 и транскрипционного фактора FOXP3 в белой пульпе селезенки разных групп животных. В итоге было установлено, что у интактных животных количество Т-хелперов (CD4⁺) было выше, чем Т-эффек-

торов (CD8⁺). Введение КМ (2-я группа) приводило к быстрому повышению уровня Т-хелперов в белой пульпе селезенки, которое наблюдалось на 3-и и 21-е сут эксперимента. Применение гликоделина (3-я группа) не влияло на уровень Т-хелперов, однако на 21-е сут эксперимента приводило к снижению количества этих клеток в белой пульпе селезенки. Таким образом, гликоделин снижал уровень Т-хелперов на 21-е сут эксперимента (таблица).

Показано, что введение КМ не изменяло уровень экспрессии FOXP3 в белой пульпе селезенки у экспериментальных животных. Применение гликоделина на фоне введения КМ приводило к достоверному снижению уровня FOXP3 на 3-и сут, однако на 21-е сут эффект менялся на противоположный, при этом различия были достоверными также и по отношению к группе сравнения (см. таблицу).

Таким образом, гликоделин обладает самостоятельным повышающим эффектом в отношении экспрессии маркера Treg FOXP3, что может приводить к локальному снижению иммунного ответа на аллоантигены. Именно этот аспект гликоделина более всего важен и интересен, если рассматривать данный белок с позиции иммунофармакологии.

Влияние гликоделина на уровень Т-хелперов и Treg в брыжеечных лимфатических узлах у экспериментальных животных. Оценивая динамику экспрессии CD4 в брыжеечных лимфатических узлах, показано, что при введении аллогенных клеток КМ с первых дней эксперимента в лимфоузлах верифицировали экспрессию маркера Т-хелперов в синусах коркового вещества и в виде скоплений в зонах коры. К 21-м сут позитивно окрашенные клетки группами присутствовали в глубоких слоях коркового вещества, в межузелковых пространствах и формировали крупные скопления в тяжах мозгового вещества.

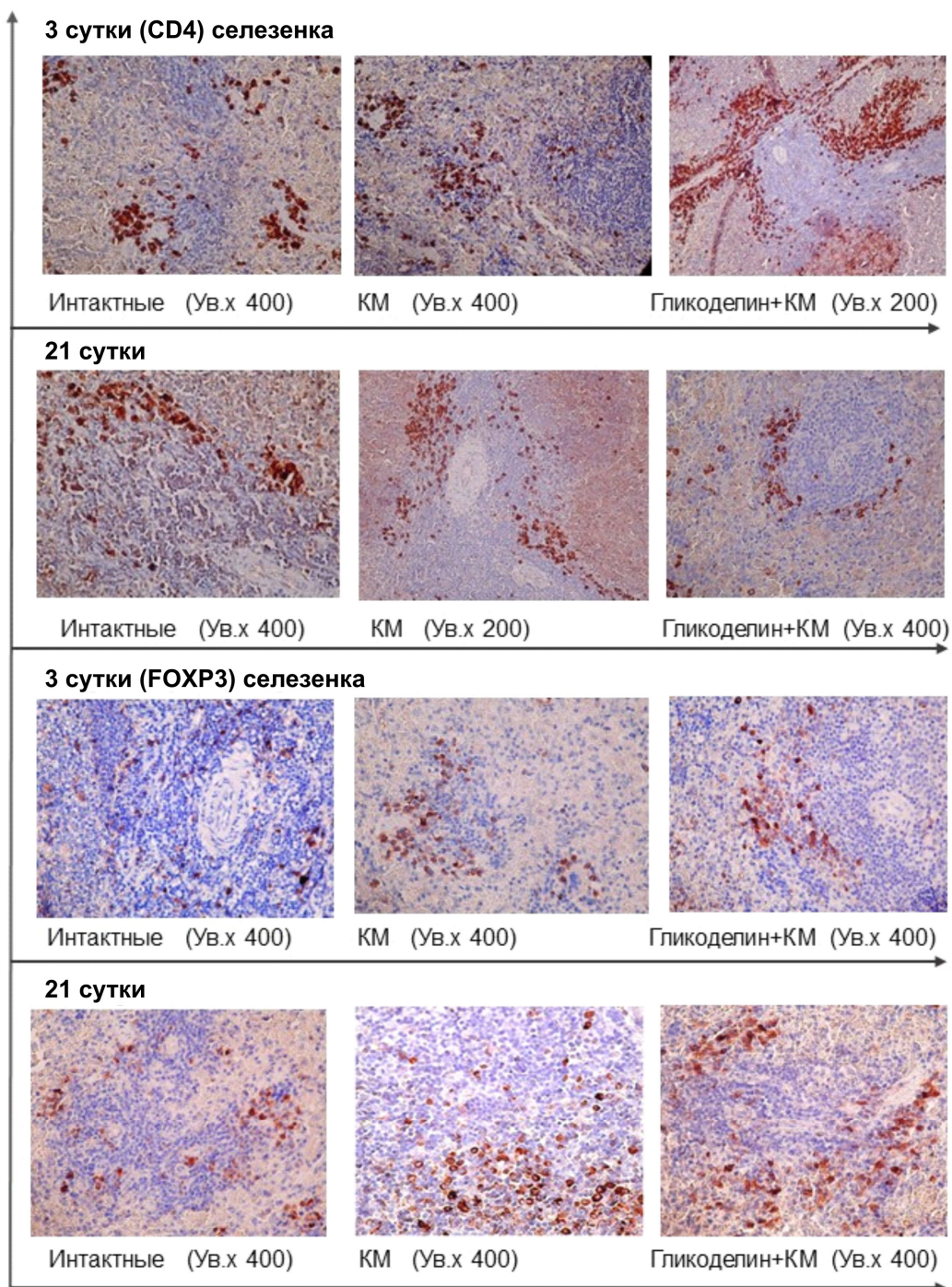


Рис. 3. Экспрессия CD4/FOXP3 в селезенке экспериментальных животных, иммуногистохимия, ув. $\times 200$, $\times 400$, на примере отдельных срезов

Влияние гликоделина на экспрессию CD4 и FOXP3 в белой пульпе селезенки, $M \pm m$

Экспрессия маркера, % клеток	Интактные, $n = 8$	КМ, 3-и сут, $n = 12$	КМ, 21-е сут, $n = 12$	КМ+ГД, 3-и сут, $n = 12$	КМ+ГД, 21-е сут, $n = 12$
<i>Селезенка</i>					
CD4	15,34 ± 4,56	25,83 ± 6,43*	29,11 ± 7,23*	21,74 ± 6,24*	20,57 ± 7,76*#
FOXP3	9,54 ± 3,13	9,06 ± 4,22	6,14 ± 2,43	6,33 ± 2,78#	12,11 ± 6,42*#
<i>Брыжеечные лимфоузлы</i>					
CD4	12,04 ± 4,87	14,68 ± 5,44	14,77 ± 6,14	22,43 ± 7,76*	15,02 ± 5,69#
FOXP3	9,76 ± 4,74	9,55 ± 5,12	7,63 ± 4,32	7,87 ± 5,02	12,66 ± 7,13*#

Примечание: # – различия между соответствующими по срокам группами КМ и КМ+ГД, * – различия по отношению к группе интактных животных, обозначены только достоверные ($p < 0,05$) различия (двухфакторный ANOVA, апостериорный тест Тьюки для множественных сравнений).

Введение гликоделина в начале эксперимента (3-и сут) не влияло на уровень Т-хелперов (CD4⁺), однако повышало этот показатель на 21-е сут. Анализ экспрессии FOXP3 показал, что введение КМ не влияло на уровень Treg на 3-и и 21-е сут. Экспрессия FOXP3 на 3-и сут отмечена в единичных клетках, расположенных диффузно в пределах коркового вещества органа, в межузелковых пространствах и в субкапсулярном синусе. К концу наблюдения (21-е сут) экспрессию FOXP3 верифицировали диффузно единично в пределах коркового вещества и в виде скоплений в субкапсулярном синусе органа. Введение гликоделина достоверно повышало экспрессию маркера Treg на 21-е сут эксперимента.

Корреляционный анализ показал, что под воздействием гликоделина между параметрами экспрессии CD4 в селезенке и брыжеечных лимфоузлах возникает тесная прямая корреляционная связь ($r = 0,88$; $p < 0,05$), при этом не обнаружено взаимосвязей с уровнем периферических Т-хелперов. В отношении экспрессии FOXP3 под воздействием гликоделина обнаружена корреляционная связь между уровнем периферических Treg и экспрессией FOXP3 в селезенке ($r = 0,74$; $p < 0,05$).

Таким образом, на уровне брыжеечных лимфатических узлов, гликоделин снижал

уровень Т-хелперов на 21-е сут эксперимента, одновременно повышая количество Treg. В целом повышение уровня Treg приводит к более успешной трансплантации аллогенных клеток.

Выводы

Установлено, что гликоделин снижал абсолютное количество Т-хелперов в периферической крови крыс на 3-й и 21-й день после аллотрансплантации и увеличивал число Treg на 21-й день эксперимента. В белой пульпе селезенки гликоделин снижал уровень Treg на 3-и сут, но повышал их количество на 21-е сут, при этом снижая число Т-хелперов. На уровне брыжеечных лимфатических узлов гликоделин снижал уровень Т-хелперов на 21-е сут эксперимента, одновременно повышая количество Treg. В целом наблюдался односторонний и распределенный эффект гликоделина на формирование иммунного ответа на уровне Т-хелперов, который заключался в снижении Т-хелперов, но повышении Treg на 21-е сут эксперимента. Очевидно, что более выраженный эффект гликоделина мы наблюдали на 21-е сут эксперимента, когда формируются антигенспецифические Treg.

В целом гликоделин снижал количество Т-хелперов как во вторичных органах им-

мунной системы, так и в периферической крови, при этом между пулом CD4⁺-клеток в селезенке и лимфоузлах возникает корреляционная связь. Что характерно для данного эксперимента: также возникает корреляционная связь между Treg на периферии и уровнем FOXP3 в селезенке.

Важно отметить, что ранее мы показали, что гликоделин в аналогичных экспериментах обеспечивал нормализацию содержания белков острой фазы воспаления (СРБ, орозомукоид и α -2М) до уровня интактных животных [9], а также снижал уровень провоспалительного цитокина IL-17A [13]. Гистологическое исследование срезов селезенки выявило, что гликоделин активировал клетки иммунной системы, стимулируя их пролиферацию (Ki-67) и их дифференцировку, что проявилось увеличением числа плазматических клеток. К концу исследования (21-е сут) существенно снижалось содержание макрофагов (CD68⁺), и наблюдалась эозинофильная инфильтрация [14]. Таким образом, гликоделин способен реализовать иммуносупрессорный эффект в отношении аллогенных клеток, что ведет к более успешному приживлению трансплантата.

Известно, что на уровне клеток человека рекомбинантный гликоделин в условиях длительного культивирования *in vitro* повышал уровень антигенспецифических Treg и экспрессию FOXP3 *de novo* с одновременным угнетением функций эффекторных Т-клеток. Авторы делают вывод о потенциальном терапевтическом эффекте гликоделина при аутоиммунных заболеваниях за счет предотвращения развития эффекторных Т-клеток и индукции антигенспецифических Treg [15]. Таким образом, полученные нами данные также демонстрируют иммунодепрессивный эффект гликоделина, что ведет к подавлению иммунного ответа на аллогенные клетки.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК / REFERENCES

1. Dixit A., Balakrishnan B., Karande A.A. Immunomodulatory activity of glycodeclin: implications in allograft rejection. *Clin Exp Immunol.* 2018; 192 (2): 213–223.
2. Schneider M., Muley T., Kabn N., Warth A., Thomas M., Herth F.J., Dienemann H., Meister M. Glycodeclin is a potential novel follow-up biomarker for malignant pleural mesothelioma. *Oncotarget.* 2016; 7 (44), 1–13.
3. Zamorina S.A., Troynich Y.N., Loginoва N.P., Charushina Y.A., Shardina K.Y., Timganova V.P. Pregnancy-Associated Proteins as a Tool in the Therapy of Autoimmune Diseases and Alloimmune Disorders (Review). In: Rocha, A., Isaeva, E. (eds) *Science and Global Challenges of the 21st Century – Science and Technology.* Perm Forum 2021. Lecture Notes in Networks and Systems, vol 342. Springer, Cham 2021.
4. Cui J., Liu Y., Wang X. The roles of glycodeclin in cancer, development and progression. *Front. Immunol.* 2017; 8, 1685.
5. Литвинова Л.С., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Кофанова К.А., Хазиахматова О.Г., Шуплецова В.В., Кайгородова Е.В., Гончаров А.Г. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов. *Медицинская иммунология* 2014; 16 (1): 7–26 / Litvinova L.S., Gutsol A.A., Sokhnevich N.A., Kofanova K.A., Khaziakhmatova O.G., Shupletsova V.V., Kaigorodova E.V., Goncharov A.G. Basic surface markers of functional activity T-lymphocytes. *Medical Immunology* 2014; 16 (1): 7–26 (in Russian).
6. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Цитометрический анализ субпопуляций Т-хелперов (Th1, Th2, Treg, Th17, Т-хелперы активированные). *Медицинская иммунология* 2011; 13 (1): 7–16 / Khaidukov S.V., Zurochka A.V. Analysis of T Helper subpopulations (Th1, Th2, Treg, Th17, Activated T-Helpers) by means of

flow cytometry. *Medical Immunology* 2011; 13 (1): 7–16 (in Russian).

7. 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.

8. Чулкова С.В., Стилиди И.С., Глухов Е.В., Гривцова Л.Ю., Неред С.Н., Тупицын Н.Н. Селезенка периферический орган иммунной системы. Влияние спленэктомии на иммунный статус. Вестн. РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН 2014; 1–2 (94) / Chulkova S.V., Stilidi I.S., Glukhov E.V., Grivtsova L.Yu., Nered S.N., Tupitsyn N.N. The spleen is a peripheral organ of the immune system. The effect of splenectomy on the immune status. *Bulletin of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences.* 2014; 1–2 (94) (in Russian).

9. Заморина С.А., Бочкова М.С., Тимганова В.П., Ужвийук С.В., Шардина К.Ю., Власова В.В., Раев М.Б. Влияние гликоделина на уровень Т-регуляторных лимфоцитов и белков острой фазы воспаления у крыс Wistar при введении аллогенных клеток костного мозга. *Цитология* 2023; 5 (65): 475–482 / Zamorina S.A., Bochkova M.S., Timganova V.P., Uzhviyuk S.V., Shardina K.Yu., Vlasova V.V., Raev M.B. The effect of glycodelin on the level of T-regulatory lymphocytes and acute phase proteins in Wistar rats with the introduction of allogeneic bone marrow cells. *Cell Tiss. Biol.* 2024; 18, 58–65 (in Russian)..

10. Заморина С.А., Бочкова М.С., Тимганова В.П., Власова В.В., Любимов А.В., Логинова Н.П., Чарушина Ю.А., Чемурзиева Н.В., Раев М.Б. Влияние пептидов трофобластического В1-гликопротеина на уровень периферических и локальных Т-регуляторных лимфоцитов у крыс wistar при аллогенной трансплантации клеток костного мозга. *Пермский медицинский журнал* 2023; 6 (4): 135–147 / Zamorina S.A., Bochkova M.S., Timganova V.P., Vlasova V.V., Lyubimov A.V., Loginova N.P., Charusheva Yu.A., Chemurzieva N.V.,

Raev M.B. Study of pregnancy specific B1-glycoprotein peptides at the level of peripheral and local T-regulatory lymphocytes in Wistar rats during allogeneic bone marrow cell transplantation. *Perm Medical Journal* 2023; 6 (4): 135–147 (in Russian).

11. Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M. 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 2008; 133: 775–787.

12. 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 / Korsunsky I.A., Rumyantsev A.G., Bykovskaya S.N. The role of regulatory T-cells CD4⁺CD25⁺ and mesenchymal stem cells of bone marrow in suppressing the graft-versus-host reaction. *Oncobematology* 2008; 3: 45–51 (in Russian).

13. Бочкова М.С., Тимганова В.П., Шардина К.Ю., Ужвийук С.В., Логинова Н.П., Тройнич Я.Н., Заморина С.А. Влияние гликоделина на цитокиновый профиль крыс при аллогенной трансплантации клеток костного мозга. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2022; 5 (173): 606–610 / Bochkova M.S., Timganova V.P., Shardina K.Yu., Uzhviyuk S.V., Loginova N.P., Troinich Y.N., Zamorina S.A. Effect of Glycodelin on the Cytokine Profile of Rats during Allogeneic Bone Marrow Cell Transplantation. *Bull Exp Biol Med.* 2022; 173: 636–640 (in Russian).

14. Тройнич Я.Н., Логинова Н.П., Заморина С.А., Раев М.Б. Влияние рекомбинантного гликоделина на структуру селезенки при введении аллогенных клеток костного мозга. *Пермский медицинский журнал* 2022; 6 (39): 125–132 / Troynich Ya.N., Loginova N.P., Zamorina S.A., Raev M.B. Effect of recombinant glycodelin on the structure of the spleen when introducing allogeneic bone marrow cells. *Perm Medical Journal* 2022; 6 (39): 125–132 (in Russian).

15. Ochanina Z., Geiger-Maor A., Dembinsky-Vaknin A., Karussis D., Tykocinski M.L., Rachmilewitz J. Inhibition of effector function but not T cell activation and increase in FoxP3 expression in T cells differentiated in the presence of PP14. PLoS One. 2010; 5 (9): e12868.

Финансирование. Статья написана в рамках НИОКТР «Изучение механизмов регуляции клеток иммунной системы и разработка методов их оценки в норме и патологии», Рег. номер: 124020500027-7 («ИЭГМ УрО РАН»).

Соблюдение этических стандартов. Содержание крыс и манипуляции с ними проведены в соответствии с «Правилами

проведения работ с использованием экспериментальных животных», с соблюдением требований Совета Европейского сообщества об использовании лабораторных животных (86/609/ЕЕС). На эксперименты получено разрешение этического комитета ИЭГМ УрО РАН (IRB00010009) от 15.02.2022.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов равноценен.

Поступила: 12.09.2024

Одобрена: 15.09.2024

Принята к публикации: 16.09.2024

Просьба ссылаться на эту статью в русскоязычных источниках следующим образом: Влияние гликоделина на формирование иммунного ответа на уровне Т-хелперов и Т-регуляторных клеток в эксперименте *in vivo* / С.А. Заморина, Я.Н. Тройнич, Н.П. Логинова, Н.В. Чемурзиева, М.С. Бочкова, В.П. Тимганова, В.В. Власова, М.Б. Раев // Пермский медицинский журнал. – 2024. – Т. 41, № 5. – С. 147–159. DOI: 10.17816/pmj415147-159

Please cite this article in English as: Zamorina S.A., Troynich Ya.N., Loginova N.P., Chemurzieva N.V., Bochkova M.S., Timganova V.P., Vlasova V.V., Rayev M.B. Influence of glycodelin on the formation of immune response at the level of T-helpers and T-regulatory cells in an *in vivo* experiment. *Perm Medical Journal*, 2024, vol. 41, no. 5, pp. 147-159. DOI: 10.17816/pmj415147-159