

На правах рукописи

Шардина Ксения Юрьевна

**РОЛЬ ФЕТОПЛАЦЕНТАРНЫХ БЕЛКОВ В РЕГУЛЯЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И
ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК**

3.2.7. Иммунология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Екатеринбург – 2024

Работа выполнена на базе Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук.

Научный руководитель

Доктор биологических наук, доцент

**Заморина
Светлана Анатольевна**

Официальные оппоненты

Доктор биологических наук, заведующая
клинико-диагностической лабораторией
Государственного автономного учреждения
здравоохранения Свердловской области
«Областная детская клиническая больница»

**Пашнина
Ирина Александровна**

Доктор биологических наук, профессор,
профессор кафедры клинической
иммунологии, аллергологии и лабораторной
диагностики факультета повышения
квалификации и переподготовки
специалистов, ФГБОУ ВО «Кубанский
государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской
Федерации

**Колесникова
Наталья Владиславовна**

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» (г. Санкт-Петербург).

Защита диссертации состоится «___» _____ 2024 года в _____ часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук 24.1.063.01 на базе ФГБУН Института иммунологии и физиологии УрО РАН по адресу: 620078, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке УрО РАН по адресу: 620078, г. Екатеринбург, ул. Софьи Ковалевской/Академическая, 22/20 и на сайте ИИФ УрО РАН (<http://iir.uran.ru>), с авторефератом – там же и на сайте ВАК РФ (<http://vak2.ed.gov.ru>).

Автореферат разослан _____ 2024 г.

Ученый секретарь Совета 24.1.063.01
на базе Института иммунологии и физиологии УрО РАН,
кандидат биологических наук

Ю.А. Журавлёва

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Миелоидные супрессорные клетки (myeloid-derived suppressor cells, MDSC) - гетерогенная популяция клеток, обладающих мощной подавляющей активностью в отношении врожденного и адаптивного иммунитета. У здоровых людей MDSC составляют менее 0,5 % среди всех мононуклеарных клеток периферической крови (Пономарев А.В., 2016), однако, уровень этой популяции увеличивается при многих патологических состояниях, включая воспаление, сепсис, травматический шок, аутоиммунные расстройства, онкологические заболевания, а также беременность.

Большая часть информации об иммуносупрессивной популяции MDSC была получена из исследований на моделях опухолей и онкологических больных. Несмотря на это, постоянный интерес ученых также нацелен на значимость этих клеток при различных патологических, а также физиологических состояниях. Известно, что MDSC играют двойственную роль в организме. С одной стороны, индуцируют рост опухоли, стимулируя инвазию и метастазирование, с другой - имеют решающее значение в течение 1 триместра беременности. Предполагается, что MDSC могут быть объединяющим звеном, способствующим формированию иммунной толерантности, а их индукция способствует успешной беременности у женщин, склонным к рекуррентным абортам или невынашиванию беременности (Ostrand-Rosenberg S., 2018).

Поскольку формирование иммунной толерантности во время беременности не ограничивается клетками и тканями, одним из подходов изучения этого феномена является понимание функционирования регуляторного континуума, формируемого белками беременности (Харченко Е.П., 2011). Важность участия фетоплацентарных белков в формировании иммунной толерантности подтверждается тем, что продукция компонентов белкового комплекса возрастает в динамике беременности. Белково-пептидные гормоны плаценты присутствуют на всех этапах гестации, выполняя разнообразные биологические функции, включая иммуномодулирующую. При этом очевидно, что в основе действия гормонов лежит трансдукция сигналов внутрь иммунных клеток через наличие на поверхности клеток рецепторов к этим пептидным гормонам.

Концепция настоящей работы заключается в установлении взаимодействия важных белков беременности – альфа-фетопротейна (АФП), гликоделина (ГД) и хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) с MDSC, поскольку этот вопрос на данный момент не исследован. Рабочая гипотеза заключается в том, что белки беременности должны стимулировать развитие и функциональную активность этих клеток, поскольку в период беременности возникает необходимость подавлять иммунный ответ материнского организма на эмбриональные антигены. Важно отметить, что иммуносупрессивное действие этих белков уже продемонстрировано на разных клеточных звеньях иммунитета, включая регуляторные Т-клетки.

Актуальность выбранной темы имеет несколько уровней – фундаментальный аспект заключается в исследовании вклада конкретных белков беременности (АФП, ГД и ХГЧ) в формирование иммунной толерантности к полуаллогенному эмбриону посредством их

влияния на дифференцировку «истинных» супрессоров иммунитета – MDSC. Прикладной аспект исследования заключается в потенциальной возможности применять белки беременности в направленной модуляции иммунной толерантности в виде фармакологического препарата. В целом, манипулирование MDSC является перспективным в терапии как аутоиммунных, так и онкологических заболеваний (Draghiciu O., Lubbers J., Nijman H.W. et al., 2015). Известно, что MDSC уже используют в качестве мишени для терапевтического воздействия – так, обнаружены агенты, способствующие дифференцировке MDSC в зрелые миелоидные клетки – транс-ретиноевая кислота и витамин D3 (Пономарев А.В., 2016). Кроме того, удаление этих клеток из микроокружения опухоли при помощи токсических агентов в настоящее время служит одной из стратегий противораковой терапии (De Cicco P., Catani M.V., Gasperi V. et al., 2019).

На сегодняшний день принято выделять следующий иммунофенотип MDSC: CD33⁺CD11b⁺HLA-DR⁻Lin⁻. Lin (linage cocktail) - смесь линейных маркеров Т-лимфоцитов (CD3), В-лимфоцитов (CD19) и NK-клеток (CD56). MDSC принято подразделять на две субпопуляции, основанные на наличии маркеров CD14 и CD66b. Так, выделяют моноцитарные MDSC (M-MDSC) - CD33⁺CD11b⁺HLA-DR⁻Lin⁻CD14⁺CD66b⁻ и полиморфноядерные или гранулоцитарные (PMN-MDSC) - CD33⁺CD11b⁺HLA-DR⁻Lin⁻CD14⁻CD66b⁺. Поскольку поверхностные маркеры MDSC экспрессированы также на мембранах других типов клеток, для их идентификации дополнительно необходимы функциональные характеристики, выражающиеся в подавлении иммунного ответа. Для этих целей в настоящей диссертационной работе были измерены уровни двух важных ферментов MDSC – аргиназы-1 (Арг 1) и индоламин-2,3-диоксигеназы (ИДО). Эти ферменты участвуют в разложении двух необходимых для формирования иммунного ответа Т-клеток аминокислот – аргинина и триптофана.

Цель работы - оценка роли белков беременности альфа-фетопротеина, гликоделина и хорионического гонадотропина человека в регуляции дифференцировки и функциональной активности миелоидных супрессорных клеток человека путем иммунофенотипирования, измерения внутриклеточной экспрессии индоламин-2,3-диоксигеназы и аргиназы-1 с одновременной оценкой цитокинового профиля.

Задачи исследования:

1. Разработать схему генерации миелоидных супрессорных клеток в условиях *in vitro* методом направленной цитокиновой индукции CD33⁺-клеток периферической крови человека.

2. Разработать схему генерации миелоидных супрессорных клеток в условиях *in vitro* методом направленной цитокиновой индукции CD11b⁺-клеток периферической крови человека.

3. Оценить влияние альфа-фетопротеина, гликоделина и хорионического гонадотропина человека на дифференцировку CD33⁺-клеток в фенотип миелоидных супрессорных клеток, учитывая полиморфноядерные и моноцитарные субпопуляции миелоидных супрессорных клеток.

4. Проанализировать влияние альфа-фетопротеина, гликоделина и хорионического гонадотропина человека на дифференцировку CD11b⁺-клеток в фенотип миелоидных

супрессорных клеток, учитывая полиморфноядерные и моноцитарные субпопуляции миелоидных супрессорных клеток.

5. Оценить влияние альфа-фетопротеина, гликоделина, хорионического гонадотропина человека на внутриклеточную продукцию ферментов аргиназы-1 и индоламин-2,3-диоксигеназы миелоидными супрессорными клетками, сгенерированными в результате культивирования CD11b⁺-клеток *in vitro*.

6. Измерить цитокиновый профиль супернатантов культур в обеих разработанных экспериментальных схемах – из CD33⁺-клеток и из CD11b⁺-клеток.

Методология и методы исследования. Работа выполнена с использованием методов культивирования *in vitro*, а также иммунологических и статистических методов. Для достижения цели и выполнения поставленных задач были осуществлены: теоретический анализ литературы, лабораторные исследования и статистическая обработка данных. Объектами исследования были белки беременности – альфа-фетопротеин, гликоделин и хорионический гонадотропин человека, а также MDSC.

Популяцию MDSC получали методом направленной цитокиновой индукции (IL-6, GM-CSF/GM-CSF, IL-1 β и липополисахарид (ЛПС)). Оценку иммунофенотипа культуры производили методом проточной цитофлуориметрии, для определения уровней аргиназы-1 и индоламин-2,3-диоксигеназы фиксировали и пермеабелизировали клеточную мембрану. Мультиплексный анализ цитокинов осуществляли по технологии Luminescence xMAP®.

Результаты исследования обрабатывали MS Office Excel, Microsoft (США); GraphPad Prism 8.0, GraphPad Inc (США); CytExpert Software 1.2, Informer Technologies Inc. (США); Belysa Analysys Software 1.2 (Sigma Aldrich, Германия).

Степень достоверности, апробация, личное участие автора. Достоверность результатов подтверждается проведением всех этапов работы с использованием современных методов исследования на сертифицированном оборудовании. Сформулированные в тексте диссертации выводы основаны на фактических результатах, которые проиллюстрированы рисунками и сопровождаются таблицами. Статистический анализ данных проведён с использованием современных методик обработки с помощью прикладных компьютерных программ MS Office Excel, Microsoft (США), GraphPad Prism (GraphPad Software, США). Проверка первичной документации, проведенная независимой комиссией (создана по приказу директора Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (ИЭГМ УрО РАН), д.м.н., проф. С.В. Гейна № 1252/17 от 20.04.2023), получила позитивное заключение. Получено разрешение этического комитета ИЭГМ УрО РАН (IRB00010009) от 21.04.2023.

Основные положения диссертационной работы представлены и обсуждены на следующих конференциях: 24-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых учёных «Биология - наука 21 века» (Пушино, 2020); XII Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов с международным участием Симбиоз-Россия (Пермь, 2020); Российской конференции с международным участием «Экспериментальная и компьютерная биомедицина» (Екатеринбург, 2021); IX Всероссийской конференции «Иммунология репродукции» (Красногорск, 2021); Всероссийской научной конференции с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты биоинформатики, биотехнологии и недропользования» (Пермь, 2021), XIII Международной конференции ученых-биологов

«СИМБИОЗ-РОССИЯ 2022» (Пермь, 2022); 12-ой международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2023).

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования. Основная идея, планирование научной работы, включая формулировку рабочей гипотезы, определение методологии и общей концепции диссертационного исследования проводились совместно с научным руководителем – ведущим научным сотрудником ИЭГМ УрО РАН, доцентом Замориной Светланой Анатольевной.

Цель и задачи сформулированы совместно с научным руководителем. Дизайн исследования разработан лично диссертантом. Анализ современной отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме проведен диссертантом совместно с научным руководителем.

Получение и интерпретация данных осуществлялись лично диссертантом.

Диссертационное исследование выполнено в лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии ИЭГМ УрО РАН - филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН (ПФИЦ УрО РАН), зав. лабораторией – д.б.н., доцент Раев Михаил Борисович.

Статистическая обработка первичных данных, интерпретация и анализ полученных результатов, написание и оформление рукописи диссертации, представление результатов работы в научных публикациях осуществлялись соискателем лично.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработка двух схем дифференцировки миелоидных супрессорных клеток человека в системе *in vitro* позволила достигнуть в среднем 52,3 % популяции миелоидных супрессорных при дифференцировке CD33⁺-клеток и 44,8 % - при дифференцировке CD11b⁺-клеток среди всех клеток культуры.

2. Гликоделин угнетает дифференцировку CD33⁺-клеток, а хорионический гонадотропин человека, наоборот, усиливает дифференцировку CD11b⁺ в фенотип общего пула миелоидных супрессорных клеток; гликоделин и альфа-фетопротеин стимулируют дифференцировку CD33⁺ - и CD11b⁺ -клеток, а альфа-фетопротеин только CD33⁺ -клеток в фенотип моноцитарной субпопуляции миелоидных супрессорных клеток в системе *in vitro*.

3. Альфа-фетопротеин и хорионический гонадотропин человека не влияют, а гликоделин усиливает продукцию индоламин-2,3- диоксигеназы миелоидными супрессорными клетками в культуре *in vitro*; созданные экспериментальные условия не способствуют внутриклеточной продукции аргиназы-1 в миелоидных супрессорных клетках человека.

4. Гликоделин стимулирует синтез IL-20 клеточной культурой CD33⁺ - клеток; альфа-фетопротеин угнетает синтез IL-19, а гликоделин снижает уровни IL-26, IL-19, TWEAK и IFN- α 2 в культуре CD11b⁺ -клеток.

Научная новизна. В рамках диссертационного исследования разработаны две собственные схемы получения MDSC из клеток периферической крови здорового человека при помощи направленной цитокиновой индукции. Первый метод основан на дифференцировке CD33⁺-клеток, а второй – CD11b⁺-клеток. Впервые исследовано влияние белков беременности – альфа-фетопротеина, гликоделина и хорионического гонадотропина на

дифференцировку общего пула MDSC и его субпопуляций M-MDSC и PMN-MDSC, а также проведена оценка влияния фетоплацентарных белков на функциональное состояние MDSC с помощью измерения внутриклеточной экспрессии ферментов аргиназы-1 и индоламин-2,3-диоксигеназы. Используемые экспериментальные подходы позволили впервые продемонстрировать модулирующее влияние фетоплацентарных белков на цитокиновый профиль в культурах клеток, индуцированных в фенотип MDSC.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость настоящей работы состоит в оценке влияния белков фетоплацентарного комплекса на иммуносупрессорную популяцию MDSC. Полученные данные позволят глубже понимать вклад фетоплацентарных белков в формирование толерантности при беременности и изучить механизмы их взаимодействия с MDSC. Прикладной аспект исследования заключается в потенциальной возможности использовать белки фетоплацентарного комплекса в качестве иммунофармакологических препаратов. Разработка собственной модели получения MDSC путем последовательной цитокиновой стимуляции также имеет теоретическую значимость, фиксируя особенности генерации этих клеток из периферической крови здорового человека. Прикладное значение данной модели заключается в потенциальном использовании MDSC в клеточной терапии.

Внедрение результатов исследования в практику. Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс на кафедре микробиологии и иммунологии Пермского государственного национального исследовательского университета (ПГНИУ) в курс «Иммунология». Использование модели генерации MDSC внедрено в деятельность ИЭГМ УрО РАН для реализации темы ГЗ АААА-А19-119112290007-7 и гранта РФФИ № 22-25-00378.

Конкурсная поддержка исследования. Работа выполнена при поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований № 20-315-90001 и № 19-29-04055, а также ГЗ АААА-А19-119112290007-7.

Публикации. По результатам диссертационной работы опубликовано 15 статей, из них 6 статей – в журналах, включенных в Перечень ВАК для публикации результатов диссертационных исследований по специальности 3.2.7. Иммунология и/или индексируемых в МБД Scopus, WoS и RSCI.

Объем и структура работы. Работа изложена на 120 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения результатов исследования, выводов, списка сокращений, списка литературы и приложений. Список литературы включает 190 источников, среди которых 11 русскоязычных и 179 англоязычных. Работа проиллюстрирована 14 рисунками и 5 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Материалы и методы исследования. В экспериментах использовали физиологические концентрации фетальных белков, соответствующие уровням в периферической крови матери в период беременности: нативного АФП (Биалекса, Россия) – 10, 50, 150 МЕ/мл (I, II, III триместры беременности соответственно); рекомбинантного

гликоделина (MyBioSource, США) - 0,2 мкг/мл (конец I триместра), 2 мкг/мл (максимальная концентрация II триместра), 10 мкг/мл (фармакологическая концентрация); рекомбинантный ХГЧ (Овитрель, Израиль) - 10 и 100 МЕ/мл. На 10-12 неделе беременности концентрация гормона ХГЧ достигает 100 МЕ/мл, а в дальнейшем концентрация ХГЧ падает до 10 МЕ/мл и держится до окончания беременности.

Белки разводили *ex tempore* полной питательной средой (ППС) (RPMI-1640, 10% FBS, 10 mM Heps (ICN Ph., США), 2 mM L-глутамин (ICN Ph., США) и 100 мкг/мл пенициллина-стрептомицина-амфотерицина (100 мкл на 10 мл среды, BI, Израиль)).

Фракционирование мононуклеарных клеток периферической крови. Для выделения мононуклеаров периферической крови (МПК) была использована цельная венозная кровь, полученная от доноров-добровольцев (n=20). МПК выделяли путем наслаивания разведенной в два раза крови на градиент плотности Диаколл (1,077 г/см³) (ДиаМ, Россия) с дальнейшим центрифугированием 40 минут при 400 g. После центрифугирования собирали образовавшееся мононуклеарное кольцо из каждой пробирки и дважды отмывали раствором Хэнкса. После отмывок осуществляли подсчет общего количества МПК, а также определяли их жизнеспособность с использованием трипанового синего. Подсчет производили в камере Нейбауэра, процент живых клеток при описанных условиях составлял не менее 92%.

Для того чтобы из полученной клеточной суспензии выделить клетки с определённым поверхностным маркером, был использован метод позитивной иммуномагнитной сепарации по технологии MACS® (Miltenyi Biotec, Германия). К полученной суспензии МПК добавляли парамагнитные микрочастицы, конъюгированные с мышиными моноклональными антителами против молекулы CD33 или CD11b человека (Miltenyi Biotec, Германия). Полученную смесь инкубировали 15 минут при 4°C. После инкубации к смеси клеток с MicroBeads-частицами производили отмывку центрифугированием в течение 10 минут при 300g и 4°C. После этого удаляли супернатант и ресуспендировали клетки в буфере. Полученную суспензию вносили в колонку, находящуюся в магнитном поле. Колонку трижды промывали буфером, затем, извлекая ее из магнитного поля сепаратора, элюировали CD33⁺-или CD11b⁺- клетки. В результате процедуры сепарации чистота выделения CD11b⁺-клеток составляла 87,23±3,56 %, а чистота выделения CD33⁺-клеток - 89, 18 % ±4,13 %.

Схема культивирования MDSC из CD33⁺-клеток периферической крови. Полученные методом иммуномагнитной сепарации монокультуры CD33⁺-клеток в концентрации 1x10⁶ клеток/мл засеивали в 96-луночный планшет (рисунки 1). CD33⁺-клетки культивировали в ППС с добавлением рекомбинантных цитокинов IL-6 (10 нг/мл) и GM-CSF (10 нг/мл) (Miltenyi Biotec, Германия) в CO₂ – инкубаторе при 5 % CO₂ и 37 °C. Замена среды производилась на 4-е сутки, тогда же вносили белки во всех выбранных концентрациях. Затем клетки культивировали еще 3 суток, после чего их собирали при помощи аккутазы согласно рекомендации производителя (Corning Scientific, Германия).

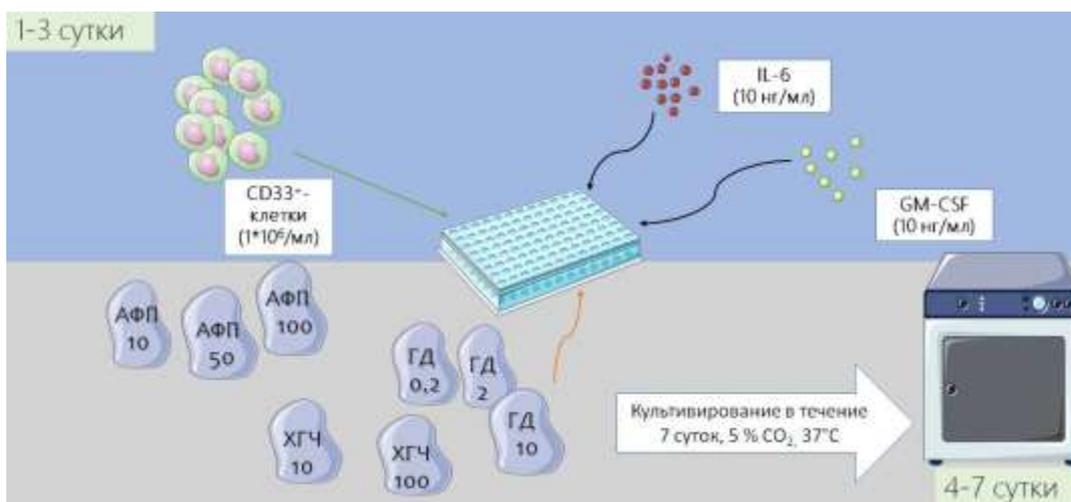


Рисунок 1- Модель культивирования MDSC из CD33⁺-клеток

Схема культивирования MDSC из CD11b⁺-клеток периферической крови. Для направленной дифференцировки MDSC из CD11b⁺-клеток была использована двухстадийная система добавления цитокинов (M.V. Lutz, I.N. Eckert, 2021). Выделенные из МПК доноров (n=7) CD11b⁺-клетки в концентрации $1 \cdot 10^6$ клеток/мл засеивали в 96-луночный планшет в ППС, добавляя GM-CSF (MiltenyiBiotec, Германия) в концентрации 20 нг/мл (рисунок 2). После этого клетки инкубировали двое суток в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂ и 37°C. По окончании первого этапа культивирования клеток производили смену среды. Затем в культуральную среду добавляли провоспалительный цитокин ИЛ-1β в концентрации 20 нг/мл (MiltenyiBiotec, Германия) и ЛПС в концентрации 0,1 мкг/мл (Sigma Aldrich, США). На следующий день добавляли АФП, ГД и ХГЧ во всех выбранных концентрациях. После добавления активационных молекул и белков клетки культивировали еще трое суток в тех же условиях. Спустя 7 суток культивирования, клеточные культуры собирали с использованием аккутазы, дополнительно промывая лунки ледяным фосфатно-солевым буфером Дальбекко (DPBS) (Thermo Fisher Scientific, США) для более качественного сбора.

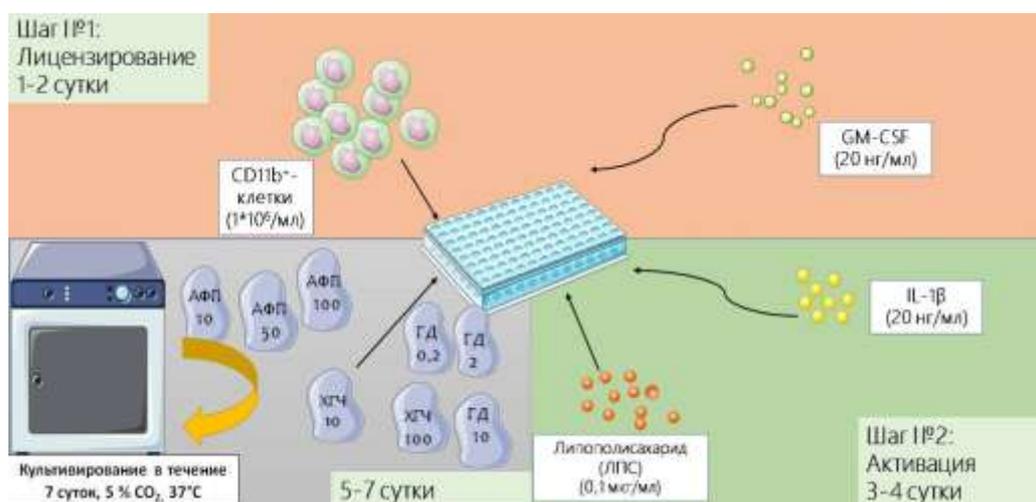


Рисунок 2 - Модель культивирования MDSC из CD11b⁺-клеток

Определение иммунофенотипа миелоидных супрессорных клеток в культурах методом проточной цитометрии. Фенотипирование культуры проводили с использованием панели моноклональных антител к CD3, CD56, CD19, CD33, CD11b, HLA-DR, CD14, CD66b человека (R&D Systems, США). В качестве контролей, определяющих негативные популяции, использовали FMO (fluorescence minus one) пробы.

После культивирования клетки осаждали 10 минут при 310 g и замораживали супернатант культур с целью дальнейшего мультиплексного анализа цитокинов. После этого клетки собирали в пробирки для анализа и производили отмывку 1 мл DPBS, центрифугируя пробирки с культурами 10 минут при 350 g. Далее осуществляли окрашивание культуры для определения их жизнеспособности красителем Zombie Aqua (ZA) (Biolegend, США). Для этого сливали надосадочную жидкость и добавляли 100 мкл 1000-кратного разведения ZA, инкубируя клетки 30 минут в темноте. После инкубации отмывали клетки в 2 мл DPBS в течение 10 минут при 350 g. Затем добавляли по 1 мкл моноклональных антител всех видов в каждую пробирку, инкубируя суспензии 30 минут в темноте. По истечении времени инкубирования, клетки отмывали дважды 2 мл буфера для окрашивания (Staining Buffer) и переходили к внутриклеточному окрашиванию, в случаях, где это было необходимо. После этого пробы анализировали на проточном цитофлуориметре Cytotex S (Beckman Coulter, США), а после в программе «CytExpert 2.4 software» (Beckman Coulter, США).

Оценку внутриклеточной экспрессии ферментов ИДО и Arg 1 производили пермеабиллизацией клеток с использованием моноклональных антител к ИДО (R&D Systems, США) и Arg 1 (R&D Systems, США) методом проточной цитометрии. После процедуры поверхностного окрашивания клетки осаждали 10 минут при 350 g, а затем фиксировали 100 мкл буфера для фиксации в течение 40 минут в темноте. После этого дважды отмывали буфером для пермеабиллизации в течение 5 минут при 500 g. Затем сливали надосадок, ресуспендировали клетки в 100 мкл буфера для пермеабиллизации и производили окрашивание моноклональными антителами. Инкубировали клетки в течение 40 мин в темноте, после чего их дважды промывали 1 мл буфера для пермеабиллизации в течение пяти минут при 500 g.

Оценка цитокинового профиля в супернатантах культур миелоидных супрессорных клеток. Количественное определение группы цитокинов в супернатантах культур, полученных методом центрифугирования в течение 15 минут при 2520 g и 4°C происходило в проточном флуоресцентном анализаторе MAGPIX (BioRad, США) с использованием коммерческого набора Bio-Plex Pro Human Inflammation panel 1 37-plex (BioRad, США). Набор включает в себя определение 37 цитокинов (APRIL/TNFSF13, BAFF/TNFSF13B, sCD30/TNFRSF8, sCD163, Chitinase-3-like 1, gp130/sIL-6R β , IFN- α 2, IFN- β , IFN- γ , IL-2, sIL-6R α , IL-8, IL-10, IL-11, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-19, IL-20, IL-22, IL-26, IL-27 (p28), IL-28A/IFN- λ 2, IL-29/IFN- λ 1, IL-32, IL-34, IL-35, LIGHT/TNFSF14, MMP-1, MMP-2, MMP-3, Osteocalcin, Osteopontin, Pentraxin-3, sTNF-R1, sTNF-R2, TSLP, TWEAK/TNFSF12). Планшеты промывали с помощью ручного магнитного промывателя. Микросферы, ковалентно связанные с антителами, добавляли в каждую лунку планшета в количестве 50 мкл. После чего осуществляли промывку и добавляли образцы и стандарты, инкубируя планшет с образцами и связанными микросферами 1 час при постоянном перемешивании (850 rpm) в темноте. Затем планшет промывали трижды, вносили биотинилированное детектирующее

антитело для создания сэндвич-комплекса и также инкубировали планшет 30 минут при постоянном перемешивании (850 rpm) в темноте. После чего для создания окончательного комплекса микросферы-антитела захвата-образец-детектируемые антитела-флуоресцентная метка добавляли стрептавидин-фикоэритрин (SA-PE) в объеме 50 мкл на лунку после трехкратной промывки планшета. После чего инкубировали планшет в течение 10 минут при постоянном помешивании (850 rpm) в темноте. После 3-кратной промывки в каждую лунку вносили 125 мкл буфера для измерения, встряхивали планшет 30 секунд при 850 rpm, помещали планшет на платформу для измерения анализатора. Регистрацию результатов проводили, используя программное обеспечение xPONENT (для построения стандартных кривых использовали 5-параметрический логистический (5PL) метод анализа). Обработку полученных данных осуществляли в программе Belysa. Концентрация каждого вещества была рассчитана с использованием стандартной кривой в соответствии с инструкциями производителя. Результаты представлены в «нг/мл».

Статистический анализ результатов. Для сравнения зависимых выборок был использован непараметрический вариант дисперсионного анализа – критерий Фридмана. Статистические различия считали значимыми при $p < 0,05$ (на графике помечены * и/или #). Часть данных представлена в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей (Me (Q1-Q3)). В ряде случаев рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена. Полученные данные обрабатывали в программе GraphPad Prism 8 (StatSoft Inc., США). Для решения проблемы множественных сравнений использовали поправку Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Разработка модели получения миелоидных супрессорных клеток *in vitro*.

На сегодняшний день изучение популяции MDSC в клеточной культуре возможно единственным способом – направленной цитокиновой индукцией клеток человека в фенотип MDSC, поскольку в периферической крови здорового человека уровень этой популяции составляет менее 0,5 % (Пономарев А.В., 2016).

Поскольку первоначальные попытки дифференцировать МПК в фенотип MDSC не достигали поставленных целей ввиду большого объема нецелевых популяций, была использована другая стратегия культивирования клеток. Логика разработки экспериментальной схемы основывалась на том, чтобы получить MDSC из клеток, сепарированных по одному из преобладающих маркеров - CD33 и CD11b.

Получение MDSC из CD33⁺-клеток. Поверхностная молекула CD33 является антигеном поверхности миелоидных клеток, поэтому в лунки культурального планшета были засеяны клетки миелоидного ряда периферической крови. Важным аспектом при разработке схемы индукции MDSC было получение клеток в достаточном количестве при минимальных расходах для возможности оценки эффектов белков беременности на них. Выбор сигнальных молекул был основан на исследовании, в котором выявляли лучшее сочетание цитокинов для индукции клеточной дифференцировки в фенотип MDSC, в результате ими оказались GM-CSF и IL-6 (M. G. Lechner, D. J. Liebertz, A. L. Epstein, 2010). В результате недельного культивирования CD33⁺-клеток с цитокинами GM-CSF и IL-6 уровень MDSC составлял 94,2

$\pm 0,017$ % среди всех живых Lin-HLA-DR⁻ - клеток и в среднем 53,05 % среди всех клеток культуры. По сравнению с контролем количество клеток увеличилось в среднем в 21 раз.

Получение MDSC из CD11b⁺-клеток. Известно, что молекула CD11b – интегрин, который экспрессирован преимущественно на моноцитах и гранулоцитах. Поскольку в лунки культурального планшета были засеяны другие исходные клетки, необходимо было подобрать новые условия дифференцировки клеток в фенотип MDSC. В этом случае была выбрана новая стратегия генерации MDSC, основанная на двухэтапном добавлении сигнальных молекул в клеточную культуру. Первый этап - «лицензирование» - осуществляется за счет цитокина GM-CSF, который служит в качестве ростового сигнала. Второй этап – «Активирование» - включает в себя инициирование сигнальных путей, через которые будут реализовываться супрессорные функции клеток. В нашей схеме для этого были использованы IL-1 β и ЛПС, взаимодействующие с клетками с помощью таких сигнальных путей, как NF- κ B, STAT1 и STAT6 (T. Condamine, J. Mastio, D., 2015). Для выбора концентраций цитокинов и ЛПС были проведены пилотные эксперименты, результаты которых в полной мере реализовывали необходимые эффекты. В результате недельного культивирования CD11b⁺-клеток с цитокинами GM-CSF, IL-1 β и ЛПС уровень MDSC составлял $53,05 \pm 0,04$ % среди всех живых Lin-HLA-DR⁻ - клеток и в среднем 44,8 % среди всех клеток культуры, по сравнению с контролем количество MDSC увеличилось в среднем в 43 раза.

При сравнении двух экспериментальных схем выбор разных поверхностных молекул для изоляции привел к различным результатам, поскольку дифференцировку проходили разные клетки, на которые действовали различные молекулы. Считается, что изоляция CD11b⁺-клеток происходит без нарушения супрессорных функций MDSC, в отличие от CD33⁺ (Ribechini E., Hutchinson J.A., Hergovits S.et al., 2017).

Таким образом, модель индукции MDSC из CD11b⁺- клеток периферической крови оптимальна при условиях двухэтапного добавления цитокинов в конечной концентрации 20 нг/мл для IL-1 β и для ЛПС- 0,1 мкг/мл, смена культуральной среды - на третьи сутки. В модели индукции MDSC из CD33⁺-клеток оптимально использовать по 10 нг/мл цитокинов (IL-6 и GM-CSF), смена культуральной среды – на четвертые сутки инкубирования. В обеих экспериментальных схемах культивирование длится в течение 7 суток.

2. Роль фетоплацентарных белков в конверсии выделенных CD33⁺-клеток в фенотип MDSC и их субпопуляций- PMN-MDSC и M-MDSC

На сегодняшний день нет сомнений, что во время беременности MDSC выполняют иммуносупрессивные функции, играя определяющую роль в успешной имплантации и сохранении беременности. Один из подходов к изучению иммунной толерантности во время беременности – исследование регуляторных свойств, которые формируют фетальные белки (Харченко Е.П., 2011).

Основной задачей диссертационного исследования было установление взаимодействия между тремя фетоплацентарными белками (альфа-фетопротеин, гликоделин, хорионический гонадотропин) и MDSC. Первый шаг - оценка влияния белков выбранных концентраций на процесс конверсии клеток в иммунофенотип MDSC. В результате эксперимента установлено, что выбранные цитокины способствуют дифференцировке клеток в фенотип MDSC (*рисунок*

3), что в целом говорит о рабочей схеме эксперимента. Жизнеспособность в гейте клеток на графике светорассеяния составляла 98,57 (94,09-98,84) % .

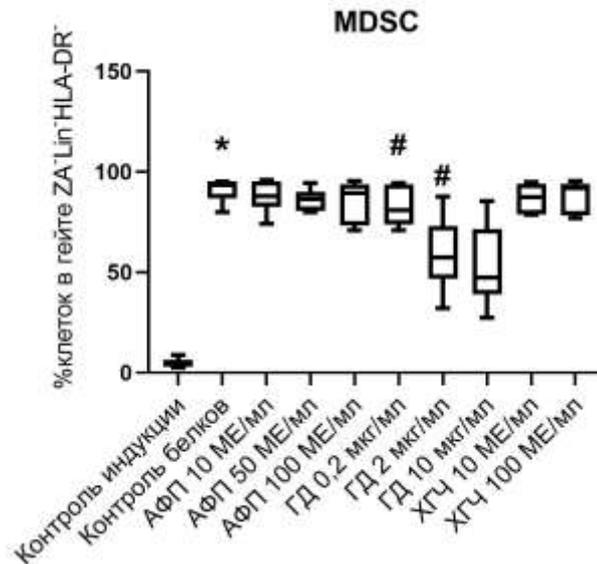


Рисунок 3 - Влияние альфа-фетопротеина (АФП), гликоделина (ГД) и хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) на конверсию CD33⁺-клеток в фенотип MDSC (n=6)

Примечание: представлены медианы, межквартильный диапазон (Q1-Q3), минимальное и максимальное значения; ось ординат – процент клеток в гейте живых Lin⁺HLA-DR⁻клеток, * - достоверные по критерию Фридмана отличия между контролем индукции (культура без добавления цитокинов и белков) и контролем белков (культура с добавлением цитокинов и без белков), # - достоверные по критерию Фридмана отличия с контролем белков

Продемонстрировано, что АФП и ХГЧ не влияли на уровень генерации MDSC из сепарированных CD33⁺-клеток в сравнении с контролем. В то же время, гликоделин в низких (0,2 и 2 мкг/мл) концентрациях снижал общий уровень MDSC (рисунок 3). Ранее в наших экспериментах, посвященных влиянию гликоделина на дифференцировку регуляторных Т-лимфоцитов, был показан аналогичный эффект. Гликоделин в концентрации 0,2 мкг/мл снижал уровень Treg в культурах клеток за счет угнетения пролиферации активированных Т-хелперов. Таким образом, установлено, что в культуре CD33⁺-клеток, индуцированных в фенотип MDSC, ХГ и АФП не оказывали достоверных эффектов, а гликоделин (0,2 и 2 мкг/мл) снижал уровень этих клеток.

Установлено, что белки во всех концентрациях не влияют на дифференцировку клеток в фенотип PMN-MDSC (таблица 1).

В то же время, исследуемые белки способны увеличивать уровень другой субпопуляции миелоидных супрессоров - M-MDSC. Так, ГД и ХГЧ повышали уровень M-MDSC во всех использованных концентрациях. Показано, что АФП не влиял на уровень M-MDSC в культуре индуцированных CD33⁺-клеток. Таким образом, в культуре CD33⁺-клеток, индуцированных в фенотип MDSC на уровне субпопуляций было показано, что АФП не оказывал достоверных эффектов, а ГД и ХГ не влияли на уровень PMN-MDSC, но повышали процентное содержание M-MDSC.

Таблица 1 - Влияние АФП, ГД, ХГЧ на экспрессию маркеров субпопуляций MDSC (PMN-MDSC и M-MDSC) (n=6, Me (Q1-Q3))

Экспериментальное воздействие		PMN-MDSC, %	M-MDSC, %
Контроль индукции		0,31 (0,083-0,515)	2,60 (1,708-3,873)
+GM-CSF, IL-6	Контроль белков	1,56 (1,045-1,908)	0,75 (0,410-3,530)
	АФП 10 МЕ/мл	0,53 (0,067-2,393)	14,18 (12,06-17,45)
	АФП 50 МЕ/мл	0,37 (0,142-2,128)	9,73 (8,320-15,30)
	АФП 100 МЕ/мл	0,56 (0,270- 1,385)	12,22 (8,913-17,80)
	ГД 0,2 мкг/мл	0,69 (0,275-2,350)	35,62* (20,48-54,07)
	ГД 2 мкг/мл	0,15 (0,000-1,025)	75,17* (57,91-89,69)
	ГД 10 мкг/мл	0,16 (0,000-3,208)	91,58* (85,72-96,99)
	ХГЧ 10 МЕ/мл	0,46 (0,173-1,473)	37,56* (29,42-40,63)
	ХГЧ 100 МЕ/мл	0,61 (0,000-1,778)	28,62* (25,53-37,30)

Примечание: *- достоверные ($p < 0,05$) различия по сравнению с контролем белков согласно непараметрическому критерию Фридмана.

3. Роль фетоплацентарных белков в конверсии выделенных CD11b⁺-клеток в фенотип MDSC и их субпопуляций- PMN-MDSC и M-MDSC

После семи суток культивирования CD11b⁺-клеток с белками, было показано, что выбранные цитокины – GM-CSF, IL1- β , а также ЛПС способствуют дифференцировке клеток в иммунофенотип MDSC (*рисунок 4*). Жизнеспособность в гейте клеток на графике светорассеяния составляла 98,13 (94,09-98,84) % .

Показано, что в среднем АФП, ГД и ХГЧ демонстрируют видимую тенденцию к расширению пула MDSC, однако, статистически значимые различия с контролем белков были найдены только у ХГЧ в обеих концентрациях (10 и 100 МЕ/мл).

Таким образом, установлено, что в культуре CD11b⁺-клеток, индуцированных в фенотип MDSC, ГД и АФП не оказывали достоверных эффектов, однако ХГЧ повышал уровень этих клеток.

В целом, все белки имеют тенденцию к повышению уровня именно M-MDSC, однако статистически значимые различия найдены у АФП в низкой и средней концентрациях - 10 и 50 МЕ/мл; у гликоделина в концентрациях 2 и 10 мкг/мл; у ХГЧ в концентрации 10 МЕ/мл (*таблица 2*).

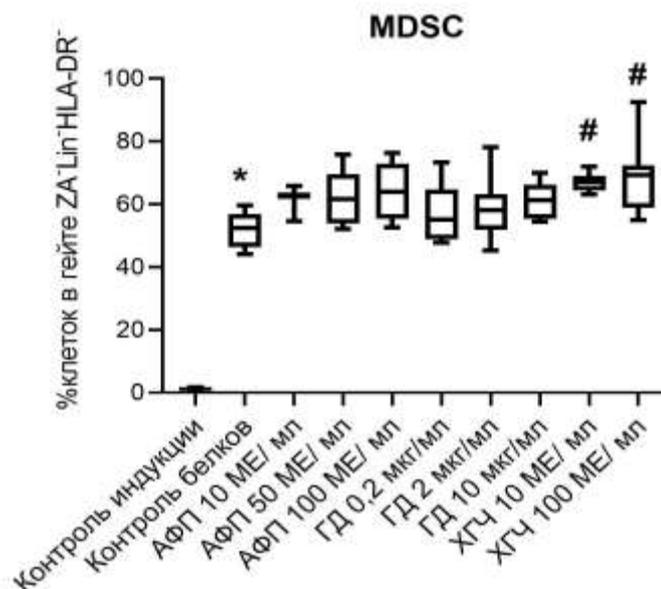


Рисунок 4 - Влияние альфа-фетопротеина (АФП), гликоделина (ГД) и хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) на конверсию CD11b⁺-клеток в фенотип MDSC (n=7)

Примечание: представлены медианы, межквартильный диапазон (Q1-Q3), минимальное и максимальное значения; ось ординат – процент клеток в гейте живых Lin⁻HLA-DR⁻ - клеток* - достоверные по критерию Фридмана отличия между контролем индукции (культура без добавления цитокинов и белков) и контролем белков (культура с добавлением цитокинов и без белков), # - достоверные по критерию Фридмана отличия с контролем белков.

Таблица 2 - Влияние АФП, ГД, ХГЧ на экспрессию маркеров субпопуляций MDSC (PMN-MDSC и M-MDSC) (n=7, Me (Q1-Q3))

Экспериментальное воздействие		PMN-MDSC, %	M-MDSC, %
Контроль индукции		0,040 (0,020-0,095)	0,090 (0,065-0,165)
+GM-CSF, IL-1 β и ЛПС	Контроль белков	0,375 (0,020-1,713)	7,835 # (0,767-9,608)
	АФП 10 МЕ/мл	0,400 (0,243-4,525)	34,59* (32,87-37,33)
	АФП 50 МЕ/мл	0,490 (0,257-1,553)	26,84* (21,32-42,60)
	АФП 100 МЕ/мл	0,710 (0,340-3,780)	23,28 (19,48-25,80)
	ГД 0,2 мкг/мл	0,445 (0,140-3,405)	23,87 (17,90-29,49)
	ГД 2 мкг/мл	0,420 (0,202-0,982)	46,90* (39,11-51,18)
	ГД 10 мкг/мл	0,455 (0,077-2,773)	59,74* (50,09-72,76)
	ХГЧ 10 МЕ/мл	0,345 (0,112-6,353)	27,09* (25,19-29,64)
	ХГЧ 100 МЕ/мл	1,395 (0,305-3,713)	25,30 (23,70-30,93)

Примечание: *- достоверные (p<0,05) различия по сравнению с контролем белков, #- достоверные (p<0,05) различия контроля индукции с контролем белков согласно непараметрическому критерию Фридмана.

Таким образом, в культуре CD11b⁺-клеток, индуцированных в фенотип MDSC, на уровне субпопуляций было показано, что АФП, ГД и ХГ не влияли на пул PMN-MDSC, однако существенно повышали уровень M-MDSC.

4. Оценка внутриклеточного уровня аргиназы-1 и индоламин-2,3- диоксигеназы в культуре CD11b⁺-клеток после культивирования

Маркеры, которые экспрессируют MDSC не уникальны и могут быть на поверхности ряда других клеток. Именно поэтому для идентификации популяции MDSC необходимо подтверждать наличие их главной особенности - способности к подавлению иммунного ответа. В нашем исследовании для этих целей мы измеряли внутриклеточную экспрессию ферментов - Арг 1 и ИДО. MDSC опосредует ингибирующий эффект посредством многих механизмов, в том числе через истощение L-аргинина (экспрессией Арг 1) и L-триптофана (экспрессией ИДО) (Kerr M. A., Stocks S.C., 1992).

В результате эксперимента показано, что влияния белков на экспрессию Арг 1 в пуле MDSC не было (таблица 3). Возможно, это связано с тем, что в организме индукция Арг 1 в миелоидных клетках опосредуется цитокинами Т-хелперов 2-го типа, такими как IL-4, IL-13, IL-10, TGF- β , PGE 2 (Bansal V., Ochoa J.B., 2003), а в отсутствии антигенной стимуляции не происходит синтеза Арг 1.

Таблица 3 - Влияние альфа-фетопротеина, гликоделина и хорионического гонадотропина человека на продукцию аргиназы-1 в MDSC после 7-ми суток культивирования CD11b⁺-клеток (n=7, Me (Q1-Q3))

Экспериментальное воздействие		Процент клеток с фенотипом MDSC, продуцирующих Арг 1, %
Контроль индукции		0,150 (0,025-0,447)
+GM-CSF, IL-1 β и ЛПС	Контроль белков	0,920 (0,212-1,538)
	АФП 10 МЕ/мл	0,180 (0,120-0,300)
	АФП 50 МЕ/мл	0,155 (0,072-0,200)
	АФП 100 МЕ/мл	0,145 (0,065-0,517)
	ГД 0,2 мкг/мл	0,510 (0,177-0,985)
	ГД 2 мкг/мл	0,215 (0,022-1,143)
	ГД 10 мкг/мл	0,905 (0,115-2,745)
	ХГЧ 10 МЕ/мл	1,335 (0,39-1,978)
	ХГЧ 100 МЕ/мл	0,145 (0,082-0,312)

Напротив, фермент ИДО в MDSC был обнаружен. АФП в низких концентрациях 10 и 50 МЕ/мл, ГД во всех концентрациях и ХГЧ в низкой концентрации (10 МЕ/мл) увеличивали экспрессию ИДО по сравнению с контролем. Однако достоверное увеличение было продемонстрировано только для гликоделина в концентрации 10 МЕ/мл (рисунок 5).

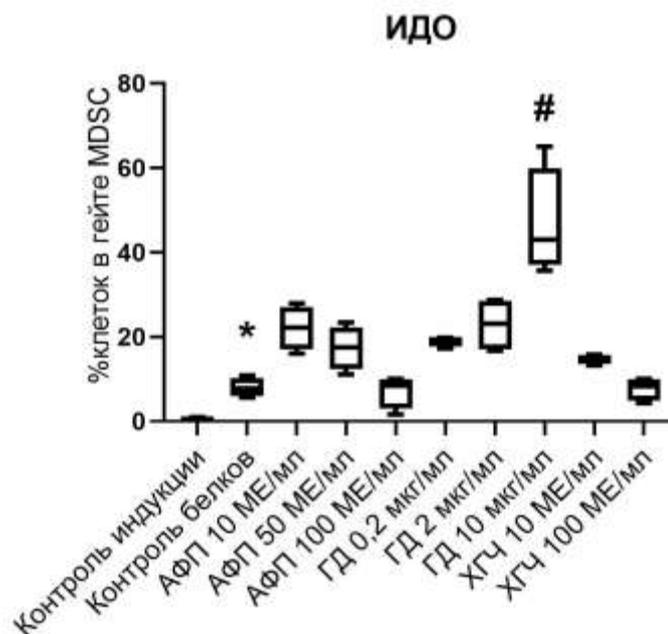


Рисунок 5 - Влияние альфа-фетопротеина (АФП), гликоделина (ГД) и хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) на продукцию индоламин-2,3-диоксигеназы (ИДО) в культуре CD11b⁺-клеток после 7-ми суток инкубации (n=7)

Примечание: представлены медианы, межквартильный диапазон (Q1-Q3), минимальное и максимальное значения; ось ординат – процент клеток в гейте MDSC, * - достоверные по критерию Фридмана отличия между контролем индукции (культура без добавления цитокинов и белков) и контролем белков (культура с добавлением цитокинов и без белков), # - достоверные по критерию Фридмана отличия с контролем белков (культура с добавлением цитокинов и без белков).

5. Роль фетоплацентарных белков в регуляции продукции цитокинов клетками, индуцированными в фенотип MDSC

Для протекания успешной беременности важно осуществление скоординированного взаимодействия материнского организма с плодом. Иммунные клетки, а также выделяемые ими цитокины являются мостом для поддержания этой коммуникации. Цитокины, воздействуя на сигнальные пути, способны изменить клеточную дифференцировку и ремоделировать ткани.

В нашей работе важно было отследить общие тенденции и способность фетоплацентарных белков воздействовать на продукцию цитокинов клетками в культуре. Методом мультиплексного анализа оценивали содержание следующих маркеров: IL-27 (p28), IL-2, IL-8, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-20, IL-26, IL-27 (p28), IL-28A/IFN- λ 2, IL-32, IL-34, LIGHT/TNFSF14, TSLP, TWEAK/TNFSF12, IL-22, IL-10, IL-11, IL-19, IL-35, Pentraxin-3, Chitinase-3-like 1/APRIL / TNFSF13, BAFF/TNFSF13B, sTNF-R1, sTNF-R2, sCD30/TNFRS8, MMP-1, MMP-2, MMP-3, sCD163, gp 130/sIL6R β , sIL-6R α , Osteocalcin, osteopontin (IFN- α 2, IFN- β , IFN- γ). Ниже представлены только те данные, которые имели статистически значимое различие ($p < 0,05$) согласно непараметрическому критерию Фридмана.

Анализ цитокинов супернатантов культур CD33⁺-клеток. Среди всех исследуемых цитокинов было установлено, что только гликоделин (2 и 10 мкг/мл) способен достоверно увеличивать уровень IL-20 в клеточной культуре (рисунок 6). IL-20 является

провоспалительным цитокином с ангиогенными свойствами, который играет важную роль в регуляции воспаления, а также может действовать в качестве сигнала для ингибирования фагоцитоза, экзоцитоза гранул и миграции активированных нейтрофилов (Gough P., Ganesan S., Datta S., 2017) Во время беременности этот цитокин вырабатывают оболочки плода, а он, в свою очередь, действует как ингибирующий агент для TNF (Menon R., Ismail L., Ismail D. et al., 2006).

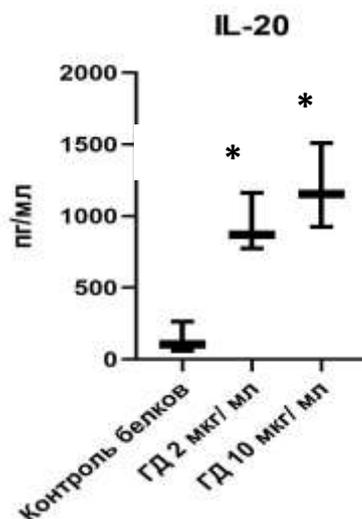


Рисунок 6 – Влияние гликоделина на продукцию IL-20 CD33⁺-клетками, индуцированными в фенотип MDSC

Примечание: *- достоверные ($p < 0,05$) различия медианных значений ($n=6$) по сравнению с контролем белков с использованием непараметрического критерия Фридмана; представлены медианы, межквартильный диапазон (Q1-Q3), минимальное и максимальное значения.

Таким образом, оценка цитокинового профиля CD33⁺ - клеток, индуцированных в фенотип MDSC, показала, что АФП и ХГЧ не модулируют данные показатели, а гликоделин (2 и 10 мкг/мл) повышает уровень IL-20, не влияя на другие цитокины.

Анализ цитокинов супернатантов культур CD11b⁺-клеток. В результате мультиплексного анализа было показано супрессивное влияние АФП на продукцию цитокина IL-19, а гликоделина – на продукцию цитокинов IFN- α 2, IL-26, IL-19, TWEAK/TNFsF12. Конкретно, в культуре CD11b⁺-клеток, индуцированных в фенотип MDSC, наблюдалось уменьшение концентрации цитокинов в супернатантах: IFN- α 2 (ГД 10 мкг/мл), IL-26 (ГД 2 и 10 мкг/мл), IL-19 (АФП, 100 МЕ/мл, ГД 2 мкг/мл), TWEAK/TNFsF12 (ГД 2 мкг/мл) (рисунок 7). При этом показано, что ХГЧ не модулирует измеренные показатели. В экспериментальной схеме получения MDSC из CD11b⁺-клеток наблюдается подавление продукции цитокинов, поддерживающих развитие воспалительного процесса (IFN- α 2, IL-26, IL-19, TWEAK/TNFsF12), что в целом может указывать на способность к регуляции иммунного ответа.

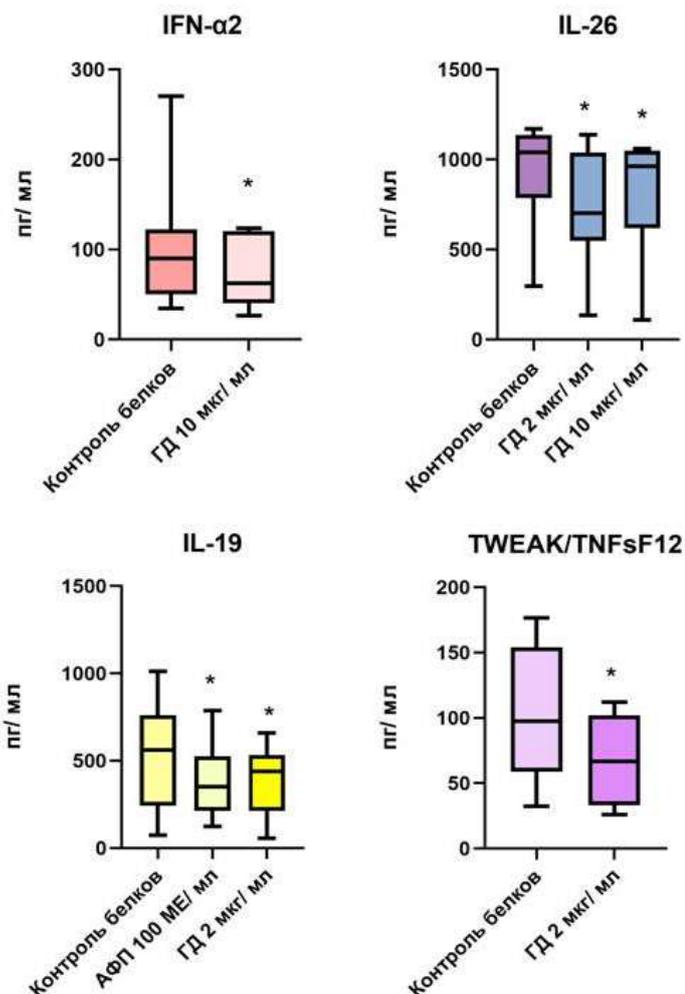


Рисунок 7 – Влияние фетоплацентарных белков на продукцию цитокинов CD11b⁺-клетками, индуцированными в фенотип MDSC, при которых наблюдалось достоверное уменьшение их концентраций

Примечание: * - достоверные ($p < 0,05$) различия медианных значений ($n=7$) по сравнению с контролем белков с использованием непараметрического критерия Фридмана; представлены медианы, межквартильный диапазон (Q1-Q3), минимальное и максимальное значения

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследований было показано, что АФП в концентрациях 10 и 50 МЕ/мл способствует увеличению субпопуляции M-MDSC, полученной из CD11b⁺-клеток. Эти же концентрации способствовали общей тенденции экспрессии ИДО (не достоверно). Возможно, это увеличение происходило за счет моноцитарной субпопуляции, что подтверждает наличие прямой корреляционной связи между этими показателями ($r=0,800$, $P < 0,05$). Высокая концентрация АФП (100 МЕ/мл) продемонстрировала достоверное снижение регуляторного цитокина IL-19.

Продemonстрировано, что гликоделин увеличивает количество M-MDSC, полученных как из CD33⁺-клеток, так и из CD11b⁺-клеток, не оказывая влияния на PMN-MDSC. Важно отметить, что высокая концентрация гликоделина повышала уровень ИДО в M-MDSC, способствуя увеличению функциональной активности этих клеток. При этом между этими

параметрами существует прямая корреляционная связь ($r=0,800$, $P<0,05$). Стоит отметить, что и две другие концентрации также повышали экспрессию ИДО, однако, достоверных различий найдено не было. В схеме получения MDSC из CD11b⁺-клеток обнаружено, что ГД в концентрациях 2 и 10 мкг/мл способен достоверно подавлять продукцию таких провоспалительных цитокинов как IFN- α 2, IL-26, TWEAK, а также противовоспалительного IL-19. При этом обнаружена прямая корреляционная связь между экспрессией ИДО и продукцией IL-26 ($r=0,800$, $P<0,05$), но обратная между уровнем ИДО и продукцией IFN- α 2 ($r=-0,800$, $P<0,05$) под воздействием ГД 10 мкг/мл.

Установлено, что ХГЧ не влияет на уровень общего пула MDSC (из CD33⁺-клеток), но повышает уровень MDSC, полученных из CD11b⁺-клеток. Однако при анализе влияния ХГЧ на субпопуляции MDSC показано, что ХГЧ повышает уровень M-MDSC, генерированных как из CD33⁺-, так и CD11b⁺-клеток, не влияя на уровень PMN-MDSC. Показано, что ХГЧ не влияет на экспрессию Arg 1 и ИДО в MDSC, однако наблюдается тенденция влияния ХГЧ в концентрации 10 МЕ/мл на экспрессию ИДО. Интересно, что влияния ХГЧ на продукцию цитокинов иммунными клетками обнаружено не было.

Важнейшим результатом проведенного исследования является то, что мы впервые показали иммуномодулирующие эффекты в отношении миелоидных супрессорных клеток альфа-фетопротейна, гликоделина и хорионического гонадотропина человека, что в целом говорит об их способности к поддержанию иммунологической толерантности во время беременности. Эти данные позволяют глубже понять фундаментальные процессы иммунной толерантности, которые расширяют общие представления о таком тонком процессе как беременность. Принимая это во внимание, в дальнейшем результаты диссертационного исследования можно использовать в качестве стратегии манипулирования MDSC во время аномалий беременности, а также при патологических состояниях.

Немаловажным результатом диссертационного исследования также является создание двух схем дифференцировки клеток периферической крови здоровых доноров в фенотип MDSC в системе *in vitro*. Современное изучение MDSC происходит в основном на клетках мышей или больных раком, что может создавать определенные трудности с доступом к материалу или интерпретацией результатов. Разработанные модели культивирования позволяют решить эти проблемы.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Благодаря проведенным исследованиям выяснено, что белки беременности – альфа-фетопротейн, гликоделин, хорионический гонадотропин - способны воздействовать на увеличение популяции MDSC, а также на субпопуляцию M-MDSC, усиливая экспрессию ИДО этими клетками, и влиять на продукцию некоторых цитокинов. В дальнейшем перспективным представляется изучение других механизмов подавления MDSC, а именно экспрессии молекул CD40, PDL-1, CD73, LOX-1, активных форм кислорода и азота и индуцибельной NO-синтазы. Планируется установить связь с угнетением пролиферации и активности Т-лимфоцитов и механизмов, благодаря которым осуществляется эта супрессия в большей степени. Также планируется оценить влияние фетоплацентарных белков на функциональную активность

клеток и выявить рецепторы, благодаря которым изучаемые белки беременности взаимодействуют с MDSC.

ВЫВОДЫ

1) Оптимальный протокол генерации миелоидных супрессорных клеток в условиях *in vitro* методом направленной цитокиновой индукции сепарированных CD33⁺ -клеток периферической крови человека с использованием IL-6 (10 нг/мл) и GM-CSF (10 нг/мл) включает в себя следующие параметры: время культивирования - 7 суток при стандартных условиях (5% CO₂ и 37°C), необходимость замены питательной среды на 4-е сутки инкубации.

2) Оптимальный протокол генерации миелоидных супрессорных клеток в условиях *in vitro* методом направленной цитокиновой индукции сепарированных CD11b⁺ -клеток периферической крови человека заключается в добавлении GMCSF (20 нг/мл) на первом этапе (2 суток), и внесением IL-1 β (20 нг/мл) и липополисахарида (0,1 мкг/мл) на втором этапе (7 суток), культивирование осуществляется при стандартных условиях (5% CO₂ и 37°C) с заменой среды после первого этапа культивирования.

3) Альфа-фетопротеин не модулирует дифференцировку CD33⁺ -клеток в фенотип миелоидных супрессорных клеток; гликоделин в концентрациях 0,2 и 2 мкг/мл подавляет генерацию общего пула миелоидных супрессорных клеток, не влияет на уровень полиморфноядерных миелоидных супрессорных клеток, но стимулирует генерацию моноцитарных миелоидных супрессорных клеток; хорионический гонадотропин не модулирует дифференцировку общей популяции миелоидных супрессорных клеток, но стимулирует генерацию моноцитарной субпопуляции миелоидных супрессорных клеток.

4) Альфа-фетопротеин не модулирует генерацию общего и полиморфноядерного пула миелоидных супрессорных клеток в культуре CD11b⁺ - клеток, но стимулирует дифференцировку моноцитарных миелоидных супрессорных клеток в концентрациях 10 и 50 ME/мл; гликоделин не модулировал дифференцировку CD11b⁺ -клеток в фенотип общего пула миелоидных 84 супрессорных клеток и полиморфноядерной субпопуляции, однако, но стимулирует дифференцировку моноцитарных миелоидных супрессорных клеток в концентрациях 2 и 10 мкг/мл; хорионический гонадотропин человека стимулирует дифференцировку миелоидных супрессорных клеток и моноцитарную субпопуляцию этого типа клеток, сгенерированных из CD11b⁺ - клеток, не влияя на генерацию полиморфноядерных миелоидных супрессорных клеток.

5) Гликоделин усиливает внутриклеточную продукцию индоламин-2,3- диоксигеназы в миелоидных супрессорных клетках в концентрации 10 мкг/мл; оба разработанных протокола не являются показательными для исследования влияния фетоплацентарных белков на продукцию аргиназы-1 в миелоидных супрессорных клетках.

6) Гликоделин (2 и 10 мкг/ мл) повышает уровень IL-20 в культуре CD 33⁺ - клеток; альфа-фетопротеин (100 ME/ мл) снижает продукцию IL-19, гликоделин (2 мкг/мл) подавляет продукцию IL-26, IL-19 и TWEAK, а в концентрации 10 мкг/мл подавляет продукцию IFN- α 2 и IL-26 в культуре CD11b⁺ - клеток.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Для индукции популяции миелоидных супрессорных клеток в системе *in vitro* отдавать предпочтение стратегии дифференцировки CD11b⁺-клеток периферической крови.

Оптимальными концентрациями в условиях двухэтапного добавления цитокинов являются 20 нг/мл для IL-1 β и GM-CSF, а также 0,1 мкг/мл для липополисахарида - на каждые 200 тыс. клеток.

В модели индукции миелоидных супрессорных клеток из CD33⁺-клеток оптимально использовать по 10 нг/мл каждого из цитокинов (IL-6 и GM-CSF) на каждые 200 тыс. клеток.

При использовании любой из разработанных экспериментальных схем культивирование клеток длится в течение 7 суток, а смена культуральной среды должна быть произведена на четвертые сутки инкубирования.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и/или индексируемых в международных базах данных RSCI, Scopus, Web of Science и PubMed:

1. Применение альфа-фетопротейна в иммунофармакологии – история вопроса / *К.Ю. Шардина, С.А. Заморина, М.Б. Раев, В.А. Черешнев* // Вестник Пермского университета. Серия: Биология – 2020. – № 2. – С. 145-153. (ВАК, ИФ РИНЦ – 0.292).
2. Влияние альфа-фетопротейна на дифференцировку миелоидных супрессорных клеток / *С.А. Заморина, К.Ю. Шардина, В.П. Тимганова, М.С. Бочкова, С.В. Ужвиюк, М.Б. Раев, В.А. Черешнев* // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. – 2021. – Т. 501, № 1. – С. 569-572. = Effect of Alpha-Fetoprotein on Differentiation of Myeloid Suppressor Cells / *S.A. Zamorina, K.Yu. Shardina, V. P. Timganova, M.S. Bochkova, S.V. Uzhviyuk, M.B. Raev, V.A. Chereshevnev* // Doklady biochemistry and biophysics. – 2021. – Vol. 501. – P. 434–437. [переводная версия] (Q4, IF Scopus – 0.224; ИФ РИНЦ – 0.868).
3. Роль гликоделина в регуляции дифференцировки миелоидных супрессорных клеток / *С.А. Заморина, В.П. Тимганова, К.Ю. Шардина, С.В. Ужвиюк, М.С. Бочкова, П.В. Храмцов, М.Д. Кропанева, М.Б. Раев* // Медицинская иммунология. – 2021. – Т. 23, № 4. – С. 329- 334. (Q4, IF Scopus – 0.13; ИФ РИНЦ – 0.710).
4. Роль миелоидных супрессорных клеток в процессах формирования иммунной толерантности в период беременности / *К.Ю. Шардина, С.А. Заморина, М.Б. Раев, В.А. Черешнев* // Цитология. – 2022. – Т. 64, № 2. – С. 116-125. = The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Establishing Immune Tolerance during Pregnancy / *K. Yu. Shardina, S. A. Zamorina, M. B. Rayev, V. A. Chereshevnev* // Cell and Tissue Biology. – 2022. – Vol. 16. – P. 330-338. [переводная версия] (Q4, IF Scopus – 0.8; ВАК, ИФ РИНЦ – 0.547).
5. Альфа-фетопротейн как фактор дифференцировки и функциональной активности миелоидных супрессорных клеток / *К.Ю. Шардина, С.А. Заморина, В.П. Тимганова, М.С. Бочкова, С.В. Ужвиюк, В.А. Черешнев* // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2023. – № 2. – С. 83-91. (Q3, IF Scopus – 0.245; ИФ РИНЦ – 0.787; ВАК, K1).
6. Изучение влияния хорионического гонадотропина человека на дифференцировку и функциональную активность миелоидных супрессорных клеток / *К.Ю. Шардина, В.П. Тимганова, М.С. Бочкова, С.В. Ужвиюк, С.А. Заморина* // Биологические мембраны. – 2023. – Т. 40, № 5. – С. 404-412. = Effects of human chorionic gonadotropin on differentiation and functional activity of myeloid-derived suppressor cells / *K.Yu. Shardina, V.P. Timganova, M.S. Bochkova, S.V. Uzhviyuk, S.A. Zamorina* // Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. - 2023. - V. 17, № 4. - P. 332-339. [переводная версия] (Q4, IF Scopus – 0.286; WoS; RSCI; ВАК, K1).

Публикации в других изданиях:

7. Гликоделин как фактор дифференцировки миелоидных супрессорных клеток / С.А. Заморина, С.В. Ужвиюк, К.Ю. Шардина, М.Д. Кропанева, В.П. Тимганова, М.С. Бочкова, П.В. Храмцов, М.Б. Раев // СИМБИОЗ РОССИЯ 2020: материалы XII Всероссийского конгресса молодых ученых-биологов с международным участием (г. Пермь, 28-30 сент. 2020). – Пермь, 2020. – С.103-105.
8. Получение миелоидных супрессорных клеток человека в экспериментальной модели *in vitro* / В.П. Тимганова, М.С. Бочкова, С.В. Ужвиюк, К.Ю. Шардина, С.А. Заморина, М.Б. Раев // Российский иммунологический журнал – 2020. – Т. 23, № 2. – С. 157-162. (ИФРИНЦ – 0.154).
9. Роль альфа-фетопротеина в регуляции дифференцировки миелоидных супрессорных клеток / К.Ю. Шардина, С.А. Заморина, В.П. Тимганова, М.С. Бочкова, С.В. Ужвиюк // БИОЛОГИЯ - Наука XXI века: сборник тезисов 24-й Пущинской школы-конференции молодых ученых (Пущино, 5–7 окт. 2020). Пущино, 2020. – С. 200-201.
10. Получение миелоидных супрессорных клеток из периферических клеток человека в условиях *in vitro* / К. Ю. Шардина, Л.С. Щербакова, В.П. Тимганова, М.С. Бочкова, С.А. Заморина, В.А. Черешнев // Фундаментальные и прикладные аспекты биоинформатики, биотехнологии и недропользования: сборник статей всероссийской научной конференции с международным участием (Пермь, 18–20 окт. 2021). – Пермь, 2021. – С. 173-175.
11. Шардина, К.Ю. Роль белков беременности в дифференцировке миелоидных супрессорных клеток / К.Ю. Шардина, В.П. Тимганова, С.А. Заморина // Мать и Дитя – 2021: материалы Всероссийского научно-образовательного форум (г. Красногорск, 29 сент. – 1 окт. 2021). – Красногорск, 2021. – С.143-144.
12. Pregnancy-associated proteins as a tool in the therapy of autoimmune diseases and alloimmune disorders (review) / S.A. Zamorina, Y.N. Troynich, N.P. Loginova, Y.A. Charushina, K.Y. Shardina, V.P. Timganova // Lecture notes in networks and systems: science and Global Challenges of the 21st Century - Science and Technology (Perm, 18-51 October 2021). – Perm, 2021. – Vol. 342. – P. 385–393.
13. Роль альфа-фетопротеина в регуляции дифференцировки и функциональной активности миелоидных супрессорных клеток / В.А. Черешнев, С.А. Заморина, К.Ю. Шардина, С.В. Ужвиюк, В.П. Тимганова, М.С. Бочкова, П.В. Храмцов, М.Б. Раев // Вестник Пермского федерального исследовательского центра. – 2022. – № 2. – С. 56-63.
14. Generation of human myeloid-derived suppressor cells from CD11b+ cells *in vitro* / K.Yu. Shardina, V.P. Timganova, M.S. Bochkova, S.V. Uzhviyuk // Science and Global Challenges of the 21st Century – Innovations and Technologies in Interdisciplinary Applications (Perm, 24-29 October 2022). - Берлин, 2022. - Vol. 622. – P. 539-547.
15. Изучение влияния хорионического гонадотропина человека на дифференцировку и функциональную активность миелоидных супрессорных клеток / К.Ю. Шардина, В.П. Тимганова, М.С. Бочкова, С.В. Ужвиюк, С.А. Заморина // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация: сборник статей международной конференции (Пущино, 22-26 мая 2023). – Серпухов, 2023. – С. 115-120.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АФП- альфа-фетопротеин

ГД- гликоделин

ИДО- индоламин-2,3-диоксигеназа

ЛПС - липополисахарид

МПК – мононуклеары периферической крови

ППС – полная питательная среда

ХГЧ – хорионический гонадотропин человека

GM-CSF – granulocyte-macrophage colony stimulating factor (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор)

IL – interleukin (интерлейкин)

iNOS – inducible nitric oxide synthase (индуцибельная NO-синтаза)

FMO - fluorescence minus one (контроль флуоресценции минус один)

MDSC – myeloid-derived suppressor cells (миелоидные супрессорные клетки)

M-MDSC – monocytic myeloid-derived suppressor cells (моноцитарные миелоидные супрессорные клетки)

PGE2 – простагландин E2

PMN-MDSC – polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells (полиморфноядерные миелоидные супрессорные клетки)

Шардина Ксения Юрьевна

**РОЛЬ ФЕТОПЛАЦЕНТАРНЫХ БЕЛКОВ В РЕГУЛЯЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И
ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК**

3.2.7. Иммунология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук