

УДК 616:612.017.1

**В. И. Селедцов, А. Г. Гончаров, В. А. Шмаров  
В. В. Малащенко, М. Е. Меняйло, Н. Д. Газатова  
Н. М. Тодосенко, А. Е. Мельников, О. Б. Мелащенко  
А. З. Мархайчук, Е. Швецова**

60

### **ВЛИЯНИЕ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ НА АКТИВАЦИОННЫЙ СТАТУС И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ Т-ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА**

*Проведено исследование, характеризующее прямое влияние GM-CSF и Epo на активацию и функциональную активность Т-лимфоцитов, находящихся в разной степени дифференцировки. Получены данные, указывающие на наличие у Epo и CSF-GM противовоспалительных иммунорегуляторных свойств. Достигнутые результаты демонстрируют значимость прямого влияния этих гемопоэтинов на функциональную активность Т-клеток в общем механизме гемопоэтической иммунорегуляции.*

*The authors present the results of a study proving a direct effect of GM-CSF and Epo on the functional activity and activation status of T-cells in varying degrees of differentiation. The obtained data demonstrate immunoregulatory and anti-inflammatory properties of Epo and CSF-GM. The study shows the direct impact of hematopoietins on the T-cells functional activity in hematopoietic immunoregulation.*

**Ключевые слова:** Т-лимфоцит, цитокин, гемопоэтин, активация, CD25, CD38.

**Key words:** T-cell, cytokine, hematopoietin, activation, CD25, CD38.

#### **Введение**

В последнее десятилетие в физиологии достаточно четко сформировалось представление о новой системе организма, вовлеченной в адаптогенез, — цитокиновой сети. Она наряду с нервной, эндокринной и иммунной системами принимает активное участие в формировании и регуляции адаптивных реакций, определяет их интенсивность и продолжительность. Считается, что цитокиновая сеть не только осуществляет связь между иммунокомпетентными клетками, но и опосредует межсистемные взаимодействия в организме. В настоящее время к семейству цитокинов относят около 220 пептидных молекул [5]. Предметом нашего исследования стали цитокины, относящиеся к группе гемопоэтических факторов, основное назначение которых — стимуляция роста и дифференцировки кроветворных и иммунокомпетентных клеток.

Гемопоэтические реакции — важный элемент в механизмах адаптации к изменяющимся условиям внешней среды. В реализации этих реакции ведущая роль принадлежит группе эндогенных гуморальных



веществ, стимулирующих кроветворение, — гемопоэтинам. Данные вещества стимулируют кроветворение, в том числе и ту его часть, которая формирует иммунную защиту организма. Роль гемопоэтинов сводится не только к восполнению количества иммунокомпетентных клеток; они, по-видимому, также принимают участие в регуляции адаптивных иммунных реакций и поддержании иммунной памяти. Однако представления о роли гемопоэтинов в регуляции долговременной иммунной памяти пока не сформированы. В настоящей работе приведены результаты исследования влияния эритропоэтина (erythropoietin, Epo) и гранулоцит-макрофагального колониестимулирующего фактора (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) на активацию и функциональную активность Т-лимфоцитов человека.

К классическим гемопоэтинам относятся гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF), гранулоцит-макрофагальный колониестимулирующий фактор (granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF), макрофагальный колони-стимулирующий фактор (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF), интерлейкин-3 (interleukin-3, IL-3), интерлейкин-7 (IL-7) и эритропоэтин (erythropoietin, Epo) [20]. Инфекция, травма, неблагоприятные внешние воздействия — все это гемопоэз-возмущающие факторы. По сути, любое антигенное воздействие является гемопоэз-возмущающим и приводит к развитию адаптивных, пролиферативных, иммунных реакций и формированию иммунной памяти. Логично предположить, что иммунные клетки, активирующиеся в ответ на антигенную стимуляцию, сразу попадают под влияние гемопоэтинов, находящихся в их микроокружении. В частности, показано, что эритропоэтин усиливает антигенпрезентирующую функцию дендритных клеток и тем самым усиливает первичный иммунный ответ [24].

Гемопоэтины, по-видимому, также являются регуляторами патологических иммунных реакций. Например, показано, что GM-CSF усиливает воспалительные реакции при аутоиммунных заболеваниях [33]. Тем не менее в целом эффекты гемопоэтических факторов на адаптивные иммунные реакции остаются малоизученными. Практически не исследовано влияние этих факторов на клеточные механизмы формирования и поддержания иммунной памяти. Знание гемопоэтических механизмов регуляции адаптивных иммунных реакций позволит, с одной стороны, глубже понять фундаментальные механизмы адаптогенеза, с другой — расширит теоретическую основу для разработки новых методических подходов к лечению иммунологических расстройств.

Основными клетками — продуцентами GM-CSF являются макрофаги, тучные клетки, фибробласты, эндотелиальные клетки и Т-лимфоциты [15]. Этот цитокин практически всегда присутствует в тканях и плазме крови. Его продукция усиливается под влиянием противовоспалительных цитокинов, таких как IL-1, IL-6, и фактор некроза опухоли-альфа [7; 14; 16; 17; 19; 29; 35]. GM-CSF стимулирует рост предшественников гранулоцитов, макрофагов, эозинофилов и мегакариоцитов [10; 11; 32]. Прямые эффекты этого фактора на Т-лимфоциты в специальной литературе не описаны. Влияние GM-CSF на Т-клетки может реализоваться опосредованно, через активацию антиген-презентирующих клеток, поскольку он выступает важнейшим дифференцировоч-



ным цитокином для дендритных клеток [37]. Согласно опубликованным данным [37], рецепторы к GM-CSF могут экспрессироваться на Т-клетках. Однако мембранная экспрессия этих рецепторов трудновывяляема [37].

Еро – основной ростовой фактор для эритроидных клеток [3; 9; 22]. Продуцентами Еро у взрослого человека выступают почечная ткань, гепатоциты и эпителиальные клетки, окружающие центральные вены [3; 22; 38]. Внешним стимулирующим фактором для выработки эритропоэтина может быть снижение парциального давления кислорода и, соответственно, уменьшение насыщения крови кислородом, а внутренним фактором – кровопотеря или разрушение эритроцитов. Оба этих фактора могут присутствовать как при травме, так и при развитии инфекционного процесса. Наибольшая экспрессия рецепторов Еро имеет место на ядродержащих эритроидных клетках. Рецепторы Еро также обнаружены на моноцитах/макрофагах, лимфоидных, эндотелиальных, нервных клетках и кардиомиоцитах [26; 28]. В литературе описано подавление высокими дозами Еро роста предшественников гранулоцитов и макрофагов [9; 12; 38]. Отмечены разнонаправленные эффекты Еро на продукцию активированными Т-клетками IFN- $\gamma$  и IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-4 и IL-5 [1; 24]. Также описан ингибирующий эффект Еро на Т-клеточную пролиферацию [18].

Таким образом, анализ литературных данных, посвященных влиянию GM-CSF и Еро, указывает на возможность их вовлечения в регуляцию адаптивного иммуногенеза. Но детального анализа непосредственного влияния этих цитокинов на Т-лимфоциты разной зрелости в специальной литературе не представлено. Восполнить этот пробел призваны наши исследования, целью которых было охарактеризовать прямые эффекты эритропоэтина (Еро) и гранулоцит-макрофагального колониестимулирующего фактора (CSF-GM) на активацию и функциональную активности Т-лимфоцитов человека разной степени дифференцировки.

### Материалы и методы

В исследование были включены 42 здоровых донора в возрасте от 21 до 40 лет. Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли стандартным методом центрифугирования на градиенте плотности (Ficoll-Paque™ PREMIUM sterile solution, density 1,077 $\pm$ 0,001 g/ml, GE Healthcare, США). Позитивную селекцию CD3<sup>+</sup> клеток проводили методом колоночной магнитной сепарации (MS Columns, Miltenyi Biotech, Германия) с использованием суперпарамагнитных частиц MACS MicroBeads, конъюгированных с высокоспецифичными моноклональными антителами (МКАТ) к молекуле CD3 (CD3 MicroBeads human, Miltenyi Biotech, Германия). Подсчет клеток осуществляли на автоматическом счетчике частиц (Z2, Beckman coulter, США).

Выделенные CD3<sup>+</sup> Т-клетки (1,0–1,5 · 10<sup>6</sup> кл/мл) культивировали в 24-луночных планшетах в бессывороточной среде TexMACS (Miltenyi Biotech, Германия), в присутствии частиц, конъюгированных с антителами к молекулам CD2, CD3 и CD28 (T-Cell Activation/Expansion Kit human, Miltenyi Biotech, Германия), или без них в контроле в течение



48 часов при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5 % CO<sub>2</sub>. Данный комплекс имитирует функции антигенпрезентирующей клетки, направленные на активацию Т-лимфоцита. В эксперименте был использован диапазон концентраций (0,01; 0,10; 1,00 и 10,00 нг/мл) рекомбинантной формы GM-CSF (Miltenyi Biotec, Германия), а также Еро-β (Эпокрин, Россия) – 0,1; 1,0; 10,0 и 100,0 МЕ/мл.

Иммунофенотипирование клеток проводили с использованием блокактора Fc-рецепторов и МКАТ, конъюгированных с флюоресцентной меткой, в виде коктейля, приготовленного *ex tempore*, к поверхностным антигенам: CD3, CD4, CD8, CD197, CD45RA, CD25, CD38 (BioLegend, США). Цитометрический анализ выполняли на анализаторе BD Accuri C6.

Цитокины определяли в культуральных супернатантах методом иммуноферментного анализа (твердофазный сэндвич-метод) с использованием следующих наборов реагентов: гамма-интерферон-ИФА-Бест, интерлейкин-2-ИФА-Бест, интерлейкин-4-ИФА-Бест, интерлейкин-10-ИФА-Бест (ЗАО «Вектор-Бест», Россия) – на биохимическом и иммуноферментном анализаторе ChemWell 2910 (AwarenessTechnology, Inc.).

Статистическую обработку данных проводили при помощи программного обеспечения IBM SPSS Statistics v21 (Statistical Package for the Social Sciences, США). При анализе имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (Колмогорова – Смирнова). Вычисляли средневыборочные характеристики: медиану (M), первый и третий квартили (Q<sub>1</sub>, Q<sub>3</sub>); для оценки достоверности различий выборок использовали парный непараметрический критерий для зависимых выборок Вилкоксона. Различия считались достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Для определения чистоты выделенной популяции и ее жизнеспособности клетки инкубировали с PE-конъюгированными анти-CD3 антителами и раствором Propidium iodide (PI) (eBioscience, США). Исходное содержание Т-клеток в выделенных суспензиях составляло  $99,0 \pm 1,0$  %, их жизнеспособность была не менее 95 %.

Цитометрический анализ Т-клеток позволял отнести их к CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитам, выявить внутри них субпопуляции наивных клеток, центральных и эффекторных клеток памяти, а также терминально-дифференцированных эффекторных клеток. В каждой Т-клеточной субпопуляции определяли число CD25<sup>+</sup> и CD38<sup>+</sup> клеток.

Согласно имеющимся данным, GM-CSF принимает участие в развитии воспалительных реакций. Мы оценили прямое влияние GM-CSF на активацию Т-лимфоцитов по мембранной экспрессии молекул CD25, CD38, а также на их функциональную активность по продукции цитокинов. Из данных таблицы 1 видно, что GM-CSF в минимальной концентрации (0,01 нг/мл) оказывал статистически значимое негативное влияние на содержание CD25<sup>+</sup> клеток среди терминально дифференцированных CD4<sup>+</sup> лимфоцитов, культивируемых с активирующими частями.

Содержание CD25<sup>+</sup> клеток среди Т-лимфоцитов, прокультивированных с GM-CSF (Me (Q1-Q3))

Клеточная популяция	Содержание CD25 <sup>+</sup> клеток, %					
	Без активации	С активацией	GM-CSF (нг/мл)			GM-CSF (нг/мл) с активацией
			без активации	0,01	0,10	
CD3 <sup>+</sup>	0,2 (0,1–0,8)	22,2 (12,6–24,7)	10,00 0,3 (0–1,1)	20,7 (13,9–21,9)	21,9 (13,7–23,8)	1,00 22,0 (14,7–24,7)
	0,2 (0,1–0,9)	14,0 (7,7–17,4)	0,1 (0–1,1)	12,1 (7,7–16,3)	14,0 (8,2–16,7)	13,6 (8,6–15,5)
CD4 <sup>+</sup>	0 (0–0,1)	4,9 (1,1–9,4)	0 (0–0,1)	5,1 (0,9–8,1)	5,7 (0,6–10,3)	6,9 (1,0–9,3)
	0,1 (0–0,8)	10,8 (1,9–16,3)	0,1 (0–0,9)	11 (2,0–17,3)	13,0 (2,1–17,2)	12,7 (2,6–15,5)
	0,7 (0,1–4,1)	40,2 (26,5–47,4)	0,5 (0–4,9)	34,2 (6,7–44,3)	38,0 (7,9–45,9)	39,1 (8,4–46,0)
	0,4 (0–4,4)	48,7 (29,9–64,0)	0 (0–3,8)	32,9* (3,9–55,3)	35,3 (4,3–60,4)	40,4 (7,1–59,7)
	0,1 (0–0,1)	32,9 (21,6–41,4)	0,6 (0–0,8)	33,2 (23,2–36,5)	34,5 (23,0–40,3)	35,6 (24,5–40,2)
	0,1 (0–0,1)	7,1 (4,4–15,4)	0,1 (0–0,1)	6,2 (1,95–17,8)	12,3 (3,0–17,0)	10,7 (2,4–20,4)
CD8 <sup>+</sup>	0,1 (0–0,6)	29,8 (27,8–39,2)	0,2 (0–0,9)	24,9 (15,5–35,9)	27,3 (20,9–35,8)	37,6 (22,2–37,7)
	0,9 (0,6–1,4)	48,9 (35,6–68,7)	1,5 (0–2,0)	46,8 (34,2–60,6)	48,7 (32,0–65,6)	49,2 (33,8–66,3)
	0,6 (0,3–1,2)	31,0 (25,6–39,4)	0,8 (0–2,0)	29,0 (13,5–40,1)	32,3 (14,3–40,9)	31,1 (14,4–42,1)
						31,1 (16,8–44,3)

Примечание: \* p &lt; 0,05 – в сравнении с Т-клетками, культивированными с активизирующими частицами.



Согласно данным, представленным в таблице 2, GM-CSF в диапазоне концентраций от 0,01 до 1 нг/мл статистически значимо увеличивал содержание CD38<sup>+</sup> клеток среди CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, культивируемых с активирующими частицами. Также было выявлено позитивное влияние GM-CSF в концентрации 0,1 нг/мл на содержание CD38<sup>+</sup> клеток среди CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. В концентрациях 1 и 0,1 нг/мл GM-CSF усиливал активацию CD4<sup>+</sup> наивных Т-лимфоцитов и CD4<sup>+</sup> центральных Т-клеток. В концентрации 0,1 нг/мл GM-CSF также оказывал позитивное действие на активацию CD8<sup>+</sup> наивных Т-лимфоцитов и CD8<sup>+</sup> центральных Т-клеток памяти. Таким образом, установлено, что GM-CSF способен усиливать активацию Т-лимфоцитов, которые либо локализованы в центральных лимфоидных органах, либо должны туда мигрировать и которые еще не растратили свой ростовой потенциал.

В ответ на активацию Т-лимфоциты способны вырабатывать как провоспалительные (IL-2, IFN- $\gamma$ ), так и противовоспалительные цитокины (IL-4, IL-10). Спектр продуцируемых цитокинов характеризует функциональную направленность Т-клеточной активности [36]. Мы исследовали эффекты GM-CSF (в диапазоне концентраций от 0,01 до 10 нг/мл) на Т-клеточную продукцию цитокинов. Установлено, что GM-CSF в максимальной концентрации (10 нг/мл) достоверно усиливал продукцию как IL-2, так и IL-4. В то же время в концентрациях 10 и 0,01 нг/мл GM-CSF приводил к статистически значимому снижению продукции IL-10 активированными Т-лимфоцитами. При минимальной концентрации (0,01 нг/мл) GM-CSF также снижал Т-клеточную продукцию IFN- $\gamma$ . Таким образом, GM-CSF способен оказывать разнонаправленное влияние на продукцию цитокинов активированными Т-клетками, в котором преобладает противовоспалительная Th2 направленность, характеризующаяся снижением продукции INF- $\gamma$  и повышением выработки IL-4.

Анализируя полученные результаты, можно сказать, что взаимодействие GM-CSF со своим рецептором на поверхности Т-лимфоцитов практически не оказывало влияния на активацию большинства Т-клеток, выявляемую по мембранной экспрессии молекулы CD25. Отмечено лишь статистически значимое влияние GM-CSF (0,01 нг/мл) на активацию терминально дифференцированных CD4<sup>+</sup> лимфоцитов. Экспрессия CD25 (альфа цепи рецептора к IL-2) ассоциируется с клональной экспансией Т-лимфоцитов, происходящей в ходе антиген-индуцированного адаптивного иммуногенеза [6]. GM-CSF, по-видимому, не играет существенной роли в механизме размножения антиген-реактивных Т-клеток, а следовательно, и в механизме поддержания долговременной иммунной памяти. С другой стороны, GM-CSF оказывал статистически значимое влияние на активацию Т-клеток, выявляемую по мембранной экспрессии CD38. CD38 — это полифункциональная молекула, которая участвует, в частности, в синтезе и гидролизе циклической АДФ-рибозы, регулирующей уровень кальция в клетке. Возможно, что экспрессия CD38 в большей степени, чем экспрессия CD25, отражает функциональную активность Т-клетки, прежде всего ту ее часть, которая напрямую не связана с клеточным делением. Интересно, что GM-CSF, по-видимому, способен снижать провоспалительную активность Т-клеток. Этот факт указывает на возможное участие GM-CSF в цитокиновой регуляции воспаления, функционирующей по механизму обратной связи.

Содержание CD38<sup>+</sup> клеток среди T-лимфоцитов, прокультированных с GM-CSF (Me (Q1-Q3))

Клеточная популяция	Содержание CD38 <sup>+</sup> клеток, %							
	Без активации	С активацией	GM-CSF (нг/мл) без активации		GM-CSF (нг/мл) с активацией			
			10,00	10,00	0,01	0,10	1,00	10,00
CD3 <sup>+</sup>	10,6 (7,6–16,6)	24,9 (20,6–29,7)	10,0 (8,9–16,1)	25,9* (23,3–32,1)	26,9* (24,0–31,7)	26,7* (22,7–31,9)	25,1 (22,1–29,4)	
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	8,2 (6,0–10,7)	25,4 (21,0–30,7)	8,7 (5,2–11,6)	30,2 (27,4–33,0)	30,9 (28,7–33,7)	30,5 (28,2–33,7)	28,1 (26,9–32,1)	
CD4 <sup>+</sup>	CD45RA <sup>+</sup> CD197 <sup>+</sup>	23,4 (15,5–30,5)	47,1 (29,1–62,7)	21,3 (14,3–31,3)	49,5 (39,8–66,4)	51,0 (36,0–67,5)	50,8* (41,5–63,3)	49,9 (35,7–61,6)
	CD45RA <sup>-</sup> CD197 <sup>+</sup>	9,1 (7,1–12,8)	28,6 (24,3–29,9)	10,3 (7,3–13,1)	29,1 (24,6–32,6)	31,3* (27,6–32,3)	29,1 (25,8–33,4)	28,9 (25,7–30,0)
	CD45RA <sup>-</sup> CD197 <sup>-</sup>	3,7 (2,2–5,3)	14,2 (10,3–19,0)	2,8 (1,9–4,4)	15,5 (9,8–20,0)	15,7 (9,7–21,1)	16,8 (11,0–20,9)	15,1 (11,1–19,5)
	CD45RA <sup>+</sup> CD197 <sup>-</sup>	8,3 (5,7–15,2)	40,3 (29,8–51,0)	8,6 (6,3–10,8)	45,7 (37,6–54,6)	47,1 (38,6–55,5)	44,2 (38,1–53,4)	42,3 (36,9–54,6)
	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	9,3 (7,6–19,8)	20,6 (15,8–27,7)	9,7 (8,5–18,4)	21,8 (17,5–30,1)	22,5* (17,9–29,7)	20,9 (17,6–29,6)	19,4 (18,2–26,4)
CD8 <sup>+</sup>	CD45RA <sup>+</sup> CD197 <sup>+</sup>	9,5 (5,3–24,4)	25,7 (19,2–37,6)	9,9 (7,4–22,9)	28,6 (22,6–38,1)	29,3* (22,5–40,6)	26,5 (21,0–38,8)	24,6 (21,8–37,5)
	CD45RA <sup>-</sup> CD197 <sup>+</sup>	12,6 (9,6–18,4)	25,4 (17,7–33,3)	11,8 (10,6–17,3)	26,0 (19,8–34,3)	26,9* (21,7–34,0)	26,3 (19,1–33,9)	23,8 (19,6–29,2)
	CD45RA <sup>-</sup> CD197 <sup>-</sup>	2,8 (1,7–4,9)	8,0 (4,9–10,2)	2,7 (1,7–4,5)	6,3 (5,4–10,0)	8,1 (5,5–11,8)	8,0 (5,0–10,0)	7,3 (4,6–10,6)
	CD45RA <sup>+</sup> CD197 <sup>-</sup>	6,7 (2,4–8,9)	15,4 (11,7–18,9)	7,0 (2,7–10,9)	15,5 (12,7–22,3)	16,8 (14,9–22,3)	17,1 (15,1–19,5)	15,4 (13,8–21,5)

Примечание: \* p < 0,05 — в сравнении с T-клетками, культивируемыми с активировающими частями.



Согласно данным, Еро- $\beta$  (100 ме/мг) не оказывал существенного влияния на активацию Т-клеток, выявляемую по экспрессии CD25. Мы также проанализировали содержание CD38<sup>+</sup> клеток среди Т-лимфоцитов, прокультивированных с активирующими частицами. Согласно полученным результатам, Еро не оказывал статистически значимого влияния на активацию как CD4<sup>+</sup>, так и CD8<sup>+</sup> Т-клеток (данные не приводятся).

Добавление максимальной концентрации (100 ме/мг) Еро в среду не оказывало существенного влияния на продукцию ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10 и IFN- $\gamma$  покоящимися Т-лимфоцитами. Активация Т-клеток приводила к выраженному усилению продукции всех указанных цитокинов.

Добавление Еро в концентрациях 0,1; 1; 10; 100 ме/мг в среду оказывало умеренный стимулирующий эффект на продукцию активированными Т-лимфоцитами ИЛ-2, ИЛ-4 и ИЛ-10. В пробах с Еро было отмечено выраженное ингибирование продукции интерферона- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Интересно, что наблюдаемые эффекты не ассоциировались с изменением активационной активности Т-клеток. Отсюда можно предполагать, что Еро способен регулировать продукцию цитокинов в Т-клетках на внутриклеточном трансляционном и/или транскрипционном уровне.

ИЛ-2 является основным ростовым фактором для Т-лимфоцитов в процессе адаптивного иммуногенеза [23; 31]. Результаты наших исследований указывают на способность Еро прямо усиливать продукцию ИЛ-2 активированными Т-лимфоцитами. Эти результаты согласуются с ранее опубликованными данными об увеличении концентрации ИЛ-2 в крови пациентов с хронической почечной недостаточностью после Еро-терапии. Было показано, что мононуклеарные клетки крови таких больных способны усиливать продукцию ИЛ-2 под воздействием Еро [26]. Правомерно предполагать, что через усиление клональной экспансии антиген-специфичных Т-клеток Еро способствует формированию иммунной памяти. Однако такое усиление пролиферативной активности лимфоцитов может сдерживаться повышенной активностью Т-клеток, продуцирующих ИЛ-10. Согласно представленным данным, выработка ИЛ-10 Т-клетками может усиливаться под воздействием Еро. Эти результаты согласуются с имеющимися данными о способности Еро поддерживать иммуносупрессорную активность регуляторных Т-клеток [2; 23; 27; 31], которая частично опосредуется через локальную секрецию трансформирующего ростового фактора-бета, ИЛ-10 и ИЛ-35. Очевидно, что такой эффект Еро может быть, по крайней мере частично, обусловлен индуцированным Еро усилением продукции ИЛ-2, который, в свою очередь, может быть задействован в активации регуляторных Т-клеток. Согласно полученным нами данным, Еро может оказывать супрессорный эффект на продукцию IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  играет ключевую роль в развитии иммунных реакций, опосредуемых Т-хелперами 1-го типа (Th1) [4; 25].

Полученные данные согласуются с представлением о том, что Еро оказывает негативный эффект на опосредуемые Th1 провоспалитель-





ные иммунные процессы, и этим частично можно объяснить его анти-воспалительную активность. В целом имеющиеся данные указывают на целесообразность клинического использования Е $\alpha$  не только как стимулятора эритропоэза, но и в качестве иммуномодулятора, например при лечении ревматоидного артрита. В этом случае Е $\alpha$  мог бы супрессировать активность аутоиммунных Th1 и одновременно усиливать эритропоэз, который, как правило, страдает при этом заболевании. На наш взгляд, применение Е $\alpha$  может быть также клинически оправданным при лечении рассеянного склероза и других заболеваний, ключевую роль в развитии которых играют аутоиммунные Th1.

Литературные источники указывают на возможную вовлеченность гемопоэтических факторов (GM-CSF, IL-3 и Е $\alpha$ ) в регуляцию адаптивных иммунных реакций [8; 21]. В действительности GM-CSF способствует развитию воспалительных реакций, а Е $\alpha$ , по-видимому, обладает противовоспалительной активностью, тогда как IL-3 опосредованно, через влияние на антигенпрезентирующие клетки стимулирует лимфопоэз и адаптивный иммуногенез [13; 30; 34]. В нашей работе впервые представлены данные, характеризующие прямое влияние GM-CSF и Е $\alpha$  на активацию и функциональную активность Т-лимфоцитов, находящихся в разной степени дифференцировки. Эти данные указывают на значимость прямого влияния данных гемопоэтинов на функциональную активность Т-клеток в общем механизме опосредуемой гемопоэтинами иммунорегуляции.

### Выводы

1. Взаимодействие GM-CSF со своим рецептором на поверхности Т-лимфоцитов практически не оказывало влияния на активацию основных субпопуляций Т-клеток, выявляемую по экспрессии молекулы CD25. Отмечено статистически значимое влияние GM-CSF на активацию терминально дифференцированных CD4<sup>+</sup> лимфоцитов. В то же время GM-CSF значимо повышал активацию CD3<sup>+</sup> Т-клеток, выявляемую по экспрессии молекулы CD38. Под влиянием GM-CSF происходило увеличение содержания CD38<sup>+</sup> клеток среди наивных CD8<sup>+</sup> лимфоцитов и CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти, прокультивированных с активирующими частицами. Среди CD4<sup>+</sup> клеток GM-CSF также повышал количество CD38<sup>+</sup> наивных Т-лимфоцитов и центральных Т-клеток памяти. Таким образом, GM-CSF способен усиливать активацию Т-лимфоцитов, которые либо локализованы в центральных лимфоидных органах, либо должны туда мигрировать.

2. GM-CSF усиливал продукцию активированными Т-клетками IL-2 IL-4. При этом GM-CSF снижал Т-клеточную продукцию IL-10 и INF- $\gamma$ . Таким образом, GM-CSF, по-видимому, способен уменьшать провоспалительную активность Т-клеток. Этот факт указывает на возможное участие GM-CSF в цитокиновой регуляции воспаления, функционирующей по механизму обратной связи.

3. Е $\alpha$  обладал умеренным стимулирующим эффектом на продукцию активированными Т-лимфоцитами IL-2, IL-4 и IL-10 и выраженным ингибирующим эффектом на Т-клеточную продукцию INF- $\gamma$ . Ин-



тересно, что наблюдаемые эффекты не ассоциировались с изменением активации Т-клеток. Отсюда можно предполагать, что Еро способен регулировать продукцию цитокинов в Т-клетках на внутриклеточном трансляционном и/или транскрипционном уровне.

### Список литературы

1. Гончаров А.Г., Шмаров В.А., Малащенко В.В. и др. Прямое влияние гемопоэтинов на функциональную активность Т-лимфоцитов // Российский иммунологический журнал. 2015. Т. 9, №18. С. 49–51.
2. Жулай Г.А., Олейник Е.К. Регуляторные Т-лимфоциты CD4+CD25+FOXP3+. Перспективы применения в иммунотерапии // Труды Карельского научного центра РАН. 2012. №2. С. 3–17.
3. Меркулов В.А., Солдатов А.А., Авдеева Ж.И. и др. Препараты рекомбинантных эритропоэтинов и их характеристика // Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение. 2013. №3 (47). С. 5–12.
4. Сологуб Т.В., Цветков В.В., Деева Э.Г. Интерферон-гамма – цитокин с противовирусной, иммуномодулирующей и противоопухолевой активностью // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2014. №3. С. 56–60.
5. Ярилин А.А. Иммунология : учебник. М., 2010.
6. Larbi A., Fulop T. From «Truly Naïve» to «Exhausted Senescent» T Cells: When Markers Predict Functionality // Cytometry Part A. 2014. Vol. 85A. P. 25–35.
7. Briend E., Colle J.H., Fontan E. et al. Human glycoprotein HGP92 induces cytokine synthesis in mouse mononuclear phagocytes // Int Immunol. 1995. Vol. 7. P. 1753–1761.
8. Brugger W., Mocklin W., Heirnfeld S. et al. Ex vivo expansion of enriched peripheral blood CD34+ progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1a, IL-6, IL-3, interferon-a and erythropoietin // Blood. 1993. Vol. B1. P. 2579.
9. Bunn H.F. New agents that stimulate erythropoiesis // Blood. 2007. Vol. 109 (3).
10. Burgess A.W., Camakaris J., Metcalf D. Purification and properties of colony-stimulating factor from mouse lung-conditioned medium // J Biol Chem. 1977. Vol. 252. P. 1998–2003.
11. Burgess A.W., Metcalf D. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors // Blood. 1980. Vol. 56. P. 947–958.
12. Byts N., Siren A.L. Erythropoietin: a multimodal neuroprotective agent // Experimental & Translational Stroke Medicine. 2009. Vol. 1. P. 4.
13. Caux C., Vanberoliet B., Massacrier C. et al. Interleukin-3 cooperates with tumor necrosis factor alpha for the development of human dendritic/Langerhans cells from cord blood CD34+ hematopoietic progenitor cells // Blood. 1996. Vol. B7. P. 2376–2385.
14. Cleveland D.W., Yen T.J. Multiple determinants of eukaryotic mRNA stability // New Biol. 1989. Vol. 1. P. 121–126.
15. Cousins D.J., Staynov D.Z., Lee T.H. Regulation of interleukin-5 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression // Am J Respir Crit Care Med. 1994. Vol. 150. P. 50–53.
16. Farrar W.L., Brini A.T., Harel-Bellan A. et al. Hematopoietic growth-factor signal transduction and regulation of gene expression // Immunol Ser. 1990. Vol. 49. P. 379–410.



17. Griffin J.D., Spertini O., Ernst T.J. et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines regulate surface expression of the leukocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils, monocytes, and their precursors // *J. Immunol.* 1990. Vol. 145. P. 576–84.
18. Heeger P. Erythropoietin inhibits proliferation of human T cells // *Nature Reviews Nephrology.* 2014. Vol. 10. P. 299.
19. Huleihel M., Douvdevani A., Segal S., Apte R.N. Different regulatory levels are involved in the generation of hemopoietic cytokines (CSFs and IL-6) in fibroblasts stimulated by inflammatory products // *Cytokine.* 1993. Vol. 5. P. 47–56.
20. Iscove N.N., Yan X.Q. Precursors (pre-CFCmulti) of multilineage hemopoietic colony-forming cells and correlatin with long-term reconstituting cells in vitro // *J. Immunol.* 1990. Vol. 145. P. 190–196.
21. Iscove N.N., Shaw A.R., Keller G. Net increase of pluripotential hematopoietic precursors in suspension culture in response to IL-1 and IL-3 // *J. Immunol.* 1989. Vol. 142. P. 2332–2337.
22. Jelkmann W. Molecular Biology of Erythropoietin // *Internal Medicine.* 2004. Vol. 43. N 8 (August). P. 649–659.
23. Kovanen P.E., Young L., Al-Shami A. et al. Global analysis of IL-2 target genes: identification of chromosomal clusters of expressed genes // *Int. Immunol.* 2005. Vol. 17, №8. P. 1009–1021.
24. Lifshitz L., Prutchi-Sagiv S., Avneon M. et al. Non-erythroid activities of erythropoietin: Functional effects on murine dendritic cells // *Mol Immunol.* 2009. Vol. 46. P. 713–21.
25. Lisowska K. A. Recombinant phenotype and proliferation of CD4-positive T lymphocytes // *Artif Organs.* 2010. Vol. 34(3). P. 77–84.
26. Lisowska K. A., Bryl E., Witkowski J. M. Erythropoietin receptor is detectable on peripheral blood lymphocytes and its expression increases in activated T lymphocytes // *Haematologica.* 2011. Vol. 96. P. 13.
27. Lisowska K.A., Dębska-Ślizień A., Jasiulewicz A. et al. The Influence of Recombinant Human Erythropoietin on Apoptosis and Cytokine Production of CD4+ lymphocytes from Hemodialyzed Patients // *J. Clin. Immunol.* 2013. №33. P. 661–665.
28. Lisowska K.A., Frackowiak J.E., Mikosik A., Witkowski J.M. Changes in the Expression of Transcription Factors Involved in Modulating the Expression of EPO-R in Activated Human CD4-Positive Lymphocytes // *PLOS ONE.* 2013. Vol. 8(4). P. 603–626.
29. Lisowska K.A. The Influence of Recombinant Human Erythropoietin on Apoptosis and Cytokine Production of CD4+ lymphocytes from Hemodialyzed Patients // *J. Clin. Immunol.* 2013. Vol. 33. P. 661–665.
30. Arcasoy M.O. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin // *British Journal of Haematology.* 2008. Vol. 141. P. 14–31.
31. Malek T.R. The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory cells // *Journal of Leukocyte Biology.* 2003. Vol. 74. P. 961–965.
32. Nicola N.A. Granulocyte colony-stimulating factor and differentiation-induction in myeloid leukemic cells // *Int J. Cell Cloning.* 1987. Vol. 5. P. 1–15.
33. Piper Ch., Pesenacker A.M., Bending D. et al. T-Cell Expression of Granulocyte–Macrophage Colony-Stimulating Factor in Juvenile Arthritis Is Contingent Upon Th17 Plasticity Arthritis // *Rheumatol.* 2014. Vol. 66(7). P. 1955–1960.
34. Schrader J.W., Clark-Lewis I., Crapper R.M. et al. The panspecific hemopoietin interleukin 3: physiology and pathology // J.W. Schrader (ed.). *Lymphokines 15; Interleukin 3; The Panspecific Hemopoietin.* San Diego, 1988. P. 181–311.
35. Schwager I., Jungi T.W. Effect of human recombinant cytokines on the induction of macrophage procoagulant activity // *Blood.* 1994. Vol. 83. P. 152–160.



36. Füllöp T., Larbi A., Pawelec G. Human T-cell aging and the impact of persistent viral infections // *Frontiers in immunology*. 2013. Vol. 4. P. 1–9.

37. Wada H., Noguchi Y., Marino M.W. et al. T-cell functions in granulocyte/macrophage colony-stimulating factor deficient mice // *Proc Natl Acad Sci*. 1997. Vol. 94. P. 12557–12561.

38. Yuanyuan Zhang, Li Wang, Soumyadeep Dey et al. Erythropoietin Action in Stress Response, Tissue Maintenance and Metabolism // *International Journal of Molecular Sciences*. 2014. Vol. 15. P. 10296–10333.

### Об авторах

Виктор Иванович Селедцов – д-р мед. наук, проф., Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград.

E-mail: seledtsov@rambler.ru

Андрей Геннадьевич Гончаров – канд. мед. наук, ст. науч. сотр., Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград.

E-mail: agoncharov59@mail.ru

Вячеслав Анатольевич Шмаров – асп., Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград.

E-mail: enant@list.ru

Владимир Владимирович Малащенко – асп., Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград.

E-mail: vvslon@rambler.ru

Максим Евгеньевич Меняйло – асп., Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград.

E-mail: max89me@yandex.ru

Наталья Динисламовна Газатова – асп., Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград.

E-mail: n\_gizatova@mail.ru

Наталья Михайловна Тодосенко – асп., Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград.

E-mail: tod\_89@mail.ru

Артем Евгеньевич Мельников – асп., Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград.

E-mail: melgip39@gmail.com

Ольга Борисовна Мелашенко – науч. сотр., Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград.

E-mail: omelashchenko@kantiana.ru

Айшат Зиябутдиновна Мархайчук – инж.-исслед., Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград.

E-mail: ayshat.90@rambler.ru



Екатерина Швецова – клинич. ординатор, Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград.

E-mail: jekaterina.svecova@gmail.com

#### **About the authors**

Prof. Victor Seledtsov, Director of the Center for Medical Biotechnology, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad.

E-mail: seledtsov@rambler.ru

Dr Andrey Goncharov, Senior Researcher of the Center for Medical Biotechnology, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad.

E-mail: agoncharov59@mail.ru

Viacheslav Shmarov, graduate student of the Center for Medical Biotechnology, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad.

E-mail: enant@list.ru

Vladimir Malashchenko, graduate student of the Center for Medical Biotechnology, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad.

E-mail: vvslon@rambler.ru

Maksim Menailo, graduate student of the Center for Medical Biotechnology, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad.

E-mail: max89me@yandex.ru

Nataliya Gazatova, graduate student of the Center for Medical Biotechnology, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad.

E-mail: n\_gazatova@mail.ru

Nataliya Todosenko, graduate student of the Center for Medical Biotechnology, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad.

E-mail: tod\_89@mail.ru

Artem Melnikov, graduate student of the Center for Medical Biotechnology, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad.

E-mail: melgip39@gmail.com

Olga Melaschenko, research officer of the Center for Medical Biotechnology, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad.

E-mail: omelashchenko@kantiana.ru

Ayshat Markhaychuk, research engineer of the Center for Medical Biotechnology, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad.

E-mail: ayshat.90@rambler.ru

Jekaterina Svecova, medical resident of the Medical Institute, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad.

E-mail: jekaterina.svecova@gmail.com