

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ИНТЕРФЕРОНА-ГАММА (ИФН- γ) НА КЛЕТКИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ *IN VITRO*

© 2019 г. А. О. Ситковская*, А. Б. Сагакянц, С. Ю. Филиппова, И. В. Межевова,
Е. С. Бондаренко, К. Г. Стаценко, М. М. Попова

*E-mail: grankina.anastasia@mail.ru

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт»
Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 29.03.2019

Работа была направлена на определение возможности активации лимфоцитов и натуральных киллеров при добавлении различных концентраций ИФН- γ *in vitro*. Результаты исследования показали, что интерферон-гамма способствует созреванию эффекторных клеток Т-звена иммунной системы.

Ключевые слова: ИФН- γ , лимфоциты, активация клеток иммунной системы

DOI: 10.31857/S102872210006541-0

Адрес: 344037, Ростов-на-Дону, ул. 14-линия, 63, ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, лаборатория клеточных технологий. Ситковская Анастасия Олеговна.

Тел. 8 919 879 16 61 (моб.).

E-mail: grankina.anastasia@mail.ru

Авторы:

Ситковская А. О., врио зав. лаборатории клеточных технологий ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия;

Сагакянц А. Б., рук. лаборатории иммунофенотипирования опухолей ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия;

Филиппова С. Ю., н.с. лаборатории клеточных технологий ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия;

Межевова И. В., м.н.с. лаборатории клеточных технологий ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия;

Бондаренко Е. С., м.н.с. лаборатории иммунофенотипирования опухолей ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия;

Стаценко К. Г., студент ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия;

Попова М. М., студент ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия.

Несмотря на успехи хирургии в онкологии, средняя выживаемость больных низкодифференцированными глиомами за последние десятилетия увеличилась лишь на 2–3 месяца [1]. В виду этого возникает необходимость поиска системных методов лечения онкологических заболеваний, одним из которых является иммунотерапия [2]. Особое место занимает адоптивная

иммунотерапия, предусматривающая введение больному стимулированных цитокинами *ex vivo* аутологичных или аллогенных иммунокомпетентных клеток (Т-, В-, НК-клетки) [3].

Целью исследования являлось определить возможность активации лимфоцитов (Лф) и натуральных киллеров (НК) при добавлении различных концентраций интерферона-гамма *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В нашей работе в качестве ИФН- γ использовался препарат Ингарон® (100000 МЕ). Для получения исследуемого материала проводился забор периферической крови из локтевой вены у здоровых доноров в объеме 16 мл в пробирки (BD) с последующим выделением мононуклеарных клеток периферической крови (МНК) по стандартной методике. После выделения МНК проводили осаждение и адгезию полученной клеточной суспензии в течение 2 часов в питательной среде RPMI 1640 (Биолот) в условиях 5% CO₂ при t=37 °С. Далее не прикрепившиеся к культуральному пластику клетки (Лф, НК) подсчитывали и пассировали в 6-луночные планшеты по 5×10⁵ клеток в каждой лунке с разной концентрацией ИФН- γ (5МЕ, 50МЕ, 500МЕ, 5000МЕ, 50000МЕ) в среде RPMI 1640

(Биолот) с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки. Ежедневно проводился подсчет клеток в каждой лунке. На 1, 3, 4 и 8 дни определяли фенотип клеточный на проточном цитофлюориметре FACSCanto II с использованием панели маркёров CD3/CD19/CD16⁺56/CD4/CD8 /HLADR/CD38/CD45 (BD).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Наибольшая пролиферативная активность клеток во время культурального этапа исследования наблюдалась при минимальной дозе ИНФ- γ (5МЕ). Время экспозиции начала и завершения пролиферации соответствовало показателям контрольной лунки (0МЕ). Однако на 3 сутки в опытном образце (5МЕ ИНФ- γ) существенно увеличилось количество клеточного материала и превысило значения контрольного образца в 1,4 раза. В опытных образцах с дозами ИНФ- γ 50МЕ, 5000МЕ и 50000МЕ наблюдалась схожая «скачкообразная» пролиферация клеток: на 2 и 4 дни экспозиции количество клеток увеличивалось, при том, что на 3 день во всех случаях данный показатель снижался, что может быть связано с паракринным эффектом клеток, так как известно, что лимфоидные клетки являются продуцентами ИНФ- γ . При воздействии на исследуемые клетки дозой ИНФ- γ 500МЕ значимых изменений не наблюдалось. Результаты проведенного иммунофенотипирования контрольных и опытных образцов показали увеличение экспрессии маркеров главного комплекса гистосовместимости 2 класса (МНС II класса) – HLA-DR на Т-лимфоцитах. Так, практически при всех используемых дозах ИНФ- γ наблюдалось постепенное возрастание значений данного маркера на клетках CD3⁺, наибольшая экспрессия определялась при воздействии на исследуемую суспензию клеток дозой ИНФ- γ 5МЕ. В то же время динамика изменения МНС II класса CD4/HLA-DR не повторяла общей картины. Показатели варьировали, имелась тенденция к снижению коэкспрессии CD4/HLA-DR, однако в последний день они принимали исходные значения, а при концентрации ИНФ- γ 50000МЕ увеличивались в 2,5 раза по сравнению с исходными. В контрольном образце количество CD8/HLA-DR практически не менялось и возрастало на 8 день в 1,8 раз. При этом во всех опытных образцах наблюдалось увеличение данного показателя, ярко выраженное при концентрации ИНФ- γ 5МЕ и незначительно при 50000МЕ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известна способность ИНФ- γ повышать экспрессию антигенов главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) как 1-го, так и 2-го классов на разных клетках, причем индуцирует экспрессию этих молекул даже на тех клетках, которые не экспрессируют их конститутивно. Тем самым повышается эффективность презентации антигенов и способность их распознавания Т-лимфоцитами, что способствует активации клеточных реакций адаптивного иммунитета. В проведенной работе нами отмечена наибольшая эффективность продуктивности концентрации ИНФ- γ 5МЕ, так как в этом случае наблюдалась наибольшая пролиферативная активность клеток, что отмечается на кривой роста. Кроме того, при внесении ИНФ- γ данной концентрации выявлены самые высокие значения экспрессии HLA-DR на Т-лимфоцитах. Мы предполагаем, что функция Ингарона в условиях нашего эксперимента состояла в запуске физиологического созревания эффекторных Т-клеток иммунной системы, что является основой для эффективной работы системы адаптивного иммунитета. Вероятно, в этих условиях следует ожидать и изменение активности клеток врожденного иммунитета, но это требует проведения дальнейших исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Gama H. P., Rocha A. J., Silva C. J., Mendes M. F., Veiga I. C., Lancelotti C. I., Andrade V. P., Tiberly C. P.* Meningioma growth during interferon beta-1A treatment for multiple sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr.* 2008, 66(2B), 402–404.
2. *Мухачева М. В., Бейн Б. Н.* Роль интерферонов в противоопухолевом иммунитете у больных с церебральными опухолями. *Фундаментальные исследования.* 2015, 1(7), 1486–1490. [*Mukhacheva M. V., Bein B. N.* The role of interferon in antitumor immunity in patients with cerebral tumors. *Basic research.* 2015, 1(7), 1486–1490].
3. *Златник Е. Ю., Ситковская А. О., Непомнящая Е. М., Джандигова Ф. Р., Ващенко Л. Н.* Достижения и перспективы клеточных технологий на основе активированных лимфоцитов в лечении злокачественных опухолей. *Казанский медицинский журнал.* 2018, 5, 792–801. [*Zlatnik E. Yu., Sitkovskaya A. O., Nepomnyashchaya E. M., Dzhandigova F. R., and Vashchenko L. N.* Achievements and prospects of cellular technologies based on activated lymphocytes in the treatment of malignant tumors. *Kazan Medical Journal.* 2018, 5, 792–801].

**INFLUENCE OF DIFFERENT INTERFERON-GAMMA (IFN- γ)
CONCENTRATIONS ON CELLS OF THE IMMUNE SYSTEM *IN VITRO***

© 2019 **A. O. Sitkovskaya***, **A. B. Sagakyants**, **S. Yu. Filippova**, **I. V. Mezhevova**,
E. S. Bondarenko, **K. G. Statsenko**, **M. M. Popova**

*E-mail: grankina.anastasia@mail.ru

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Received: 15.03.2019. **Accepted:** 29.03.2019

The work was aimed at determining the possibility of activation of lymphocytes and natural killer cells with the addition of various concentrations of IFN- γ *in vitro*. The results showed that IFN- γ promotes maturation of T effector cell-mediated immunity system.

Key words: IFN- γ , lymphocytes, natural killer cells, activation of immune system cells

Authors:

Sitkovskaya A. O., ✉ Head of the Cell Technology Laboratory of the Rostov research institute of oncology, Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russia. **E-mail:** grankina.anastasia@mail.ru;

Sagakyants A. B., Ph.D., Head of the Laboratory of tumor immunophenotyping of the Rostov research institute of oncology, Rostov-on-Don, Russia;

Filippova S. Yu., Researcher, Laboratory of Cell Technologies of the laboratory of tumor immunophenotyping of the Rostov research institute of oncology, Rostov-on-Don, Russia;

Mezhevova I. V., Junior researcher of the Laboratory of tumor immunophenotyping of the Rostov research institute of oncology, Rostov-on-Don, Russia;

Bondarenko E. S., Junior researcher of the Laboratory of tumor immunophenotyping of the Rostov research institute of oncology, Rostov-on-Don, Russia;

Statsenko K. G., student of the Rostov research institute of oncology, Rostov-on-Don, Russia;

Popova M. M., student of the Rostov research institute of oncology, Rostov-on-Don, Russia.