

ВЛИЯНИЕ АУТОЛОГИЧНЫХ АПОПТОТИЧЕСКИХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР НА ПОКАЗАТЕЛИ РАННЕЙ И ПОЗДНЕЙ СТАДИИ АПОПТОЗА Т- ЛИМФОЦИТОВ У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

Абрамова Т. Я., Цура В. А., Блинова Е. А., Козлов В. А.

ФГБУ «НИИФКИ», Новосибирск, Россия

У здоровых людей установлена возможность индукции раннего и позднего апоптоза Т- лимфоцитов, пролиферирующих *in vitro* в физиологических условиях, посредством переноса как клеточного, так и гуморального компонентов аутологичной апоптотирующей культуры. Определено, что при равных условиях культивирования лимфоцитов в условиях скученности и обеднения культуральной среды, перенос клеток и супернатанта от анти-CD3 стимулированных лимфоцитов закономерно повышает чувствительность Т-лимфоцитов к апоптозу, в то же время, апоптотические культуры, стимулированные дексаметазоном оказывают модулирующий эффект.

Ключевые слова: аутологичная культура, Т- лимфоциты, ранний и поздний апоптоз

Актуальность. Апоптоз является физиологическим процессом, в норме обеспечивающим клеточный гомеостаз за счет поддержания баланса между пролиферацией и гибелью клеток в организме [1]. С ослаблением апоптоза, как высоко регулируемой формы запрограммированной клеточной гибели и снижением аутофагии ассоциируют развитие аутоиммунных процессов и, в частности, ревматоидного артрита (РА). [2]. Традиционно апоптоз, как программа клеточного суицида, рассматривался как автономное явление и только в последнее время появились работы, свидетельствующие о влиянии апоптотирующих клеток на живые. В частности, активно исследуется роль апоптотических телец (микровезикул) и механических межклеточных взаимодействий в процессе автономного и неавтономного апоптоза [3]. Вместе с тем, многие стороны этой проблемы недостаточно изучены, в частности, проявления последствий клеточного соседства в условиях скученности на уровне ткани или целостного организма, клеточной скученности пролиферации, или механизмы активации внутриклеточных каспаз в процессе действия механических сил. Исследование характера влияния клеточных и гуморальных факторов апоптотирующей культуры на динамику раннего и позднего апоптоза клеток, находящихся

в физиологических условиях пролиферации, направлено на выявление эффекторных молекул дисрегуляции апоптоза у здоровых людей и пациентов с ревматоидным артритом.

Целью настоящего исследования являлось изучение влияния клеточных и гуморальных факторов апоптотирующих клеток на аутологичную культуру лимфоцитов здоровых людей

Материалы и методы. Объектом исследования являлась периферическая кровь 11 условно здоровых женщин, средний возраст группы составил $40,5 \pm 2,3$. Выделенная на градиенте плотности (фиколл-верографин, 1,078) лимфоцитарная фракция клеток была распределена на 2 варианта культуры: 1-я (после окрашивания внутриклеточным флуоресцентным красителем CFSE (FITC) по $5,0 \times 10^5$ кл./0,5 мл. полной культуральной среды (ПКС) 7 лунок); 2-я (3 лунки по 2×10^6 кл./150,0 мкл. обедненной (1 % FSC) среды (ОС). На 4-е сутки инкубации в CO₂ инкубаторе (37 °С; 5 % CO₂) апоптотическая культура (клетки и супернатант раздельно) были перенесены к лимфоцитам, пролиферирующим в условиях ПКС. На 7-е сутки сокультивирования на цитофлуориметре BD FACS Canto II в популяции Т-лимфоцитах (CD3⁺) определялся уровень раннего (аннексин V) и позднего (аннексин V+7AAD) апоптоза в нативных, а также в aCD3 и декса-

метазон ($1 \times 10^{-4} \text{M}$) – стимулированных вариантах. Пробы были условно обозначены как: «контроль», «контроль апоптоза», «контроль апоптоза супернатант», «aCD3», «aCD3 супернатант», «Деха», «Деха супернатант».

Статистический анализ был проведен в программе Statistica 6.0 с применением методов непараметрической статистики. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха ($Me \pm (\text{lower} \div \text{upper quartile})$). Различия между группами считались значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты. Появление на клеточной мембране фосфатидилсерина (PS) считается основным маркером клеток, находящихся на стадии раннего апоптоза. В процессе 4х-дневного сокультивирования нормально пролиферирующих и апоптотирующих лимфоцитов произошло достоверное увеличение раннего апоптоза в пробах со стимулированными клетками aCD3 до $20,4 \pm (17,3 \div 38,6)\%$, а также в пробах, содержащих супернатант от апоптотических aCD3-стимулированных клеток, составив в среднем $36,0 \pm (25,5 \div 47,0)$, что в 2 раза выше по сравнению с начальным уровнем раннего апоптоза CD3⁺-лимфоцитов. Кроме того, уровень раннего апоптоза пробы «aCD3 супернатант» был значимо выше пробы «Контроль» – клеток, пролиферирующих в течение недели в ПКС – $36,4 \pm (25,5 \div 47,0)$ vs. $12,4 \pm (7,5 \div 13,5)$, соответственно, $p=0,007$ и пробы «контроль апоптоза», клеток, пролиферирующих в условиях скученности и ОС $36,4 \pm (25,5 \div 47,0)$ vs. $18,0 \pm (5,1 \div 25,5)$, $p=0,01$. Логично предположить, что усиление апоптоза в пробе, содержащей супернатант от «aCD3» апоптотических клеток, относительно всех контрольных групп обусловлено присутствием эктосом и апоптотных телец в супернатанте апоптотирующей культуры, способных инициировать запуск программы апоптотической гибели [4].

В то же время, дексаметазон не проявил своих свойств как универсальный индуктор апоптоза в культуре клеток здоровых доноров. Если при 72х часовом культивировании в ОС была определена стимуляция, то при дальнейшем переносе пробы «Деха» к клеткам, пролиферирующим в ПКС, значимого повышения уровня апоптоза получено не было. Кроме того, была установлена обратная корреляционная связь между уровнем апоптоза стимулированной дексаметазоном ($1 \times 10^{-4} \text{M}$) культуры и аутологичных клеток, находящихся

в условиях ПКС ($r = -0,9$; $p = 0,037$), что может свидетельствовать о модулирующем влиянии глюкокортикоида. Также, дексаметазон, как синтетический гормон, может вызывать разнонаправленное влияние на процессы пролиферации и апоптоза, объяснимое индивидуальным воздействием на каждого донора. [5]. Анализ содержания живых клеток в пробах, стимулированных дексаметазоном, выявил значимое снижение указанных живых клеток в пробе CFSE (-) «Деха» относительно большинства анализируемых проб. При этом была определена значимая разница по количеству живых клеток между CFSE (-) и CFSE (+) «Деха» пробами ($7,85 \pm (1,65 \div 16,8)$ vs. $71,8 \pm (35,0 \div 86,2)$, $p = 0,04$, соответственно). Таким образом, дексаметазон-стимулированные клетки, трансплантируемые из апоптотической культуры к нормально пролиферирующим аутологичным клеткам, после 7 дней культивирования имеют низкий уровень апоптоза и самый низкий уровень живых клеток, при этом культура – реципиент имеет самый высокий уровень живых клеток, что свидетельствует об активной пролиферации. Установленные факты, в свою очередь, подтверждают возможность воздействия апоптотического окружения на нормально пролиферирующие клетки, а также свидетельствуют о том, что система элиминация клеточного дебриса, скорее всего, посредством аутофагии, у здоровых людей активно работает.

Если в клетках, находящихся на ранней стадии прекращения апоптоза возможно, то на поздней стадии, когда помимо инициаторных задействованы эффекторные каспазы, процесс является необратимым. В нашем исследовании в процессе сокультивирования клеток, пролиферирующих в ПКС (CFSE+) и аутологичных культур, пролиферирующих в условиях индукции апоптоза, наблюдалось достоверное увеличение уровня позднего апоптоза во всех наблюдаемых группах относительно исходного уровня.

Таким образом, при равных условиях культивирования лимфоцитов в условиях скученности и обеднения культуральной среды, перенос клеток, стимулированных антителами к CD3, повышает чувствительность Т- лимфоцитов здоровых людей, как к клеточному, так и гуморальному компонентам апоптотической культуры, тогда как апоптотическая культура, индуцированная дексаметазоном, оказывает

на апоптоз пролиферирующих клеток модулирующий эффект.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Потапнев М. П. Аутофагия, апоптоз, некроз клеток и иммунное распознавание своего и чужого // Иммунология. 2014; 2: 95-102;
2. Арефьева А. С. Роль апоптоза в развитии системных аутоиммунных заболеваний // Иммунология. 2014; 2: 103-107;
3. Kawamoto Y. Apoptosis in cellular society: communication between apoptotic cells and their neighbors / Y. Kawamoto, Y. Nakajima, E. Kuranaga // Int. J. Mol. Sci. – 2016. – Vol. 17. – P. 1-15.
4. Sadallah S. Ectosomes as modulators of inflammation and immunity / S. Sadallah, C. Eken, J. A. Schifferli // Clinical and Experimental Immunology. – 2010. – Vol. 163. – P. 26-32.
5. Baschant, U. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity / U. Baschant, J. Tuckermann // J Steroid Biochem Mol Biol. – 2010. – Vol. 12. – P. 69-75.

EFFECT OF THE AUTOLOGOUS APOPTOTIC CELL CULTURES ON THE PARAMETERS OF EARLY AND LATE APOPTOSIS OF T LYMPHOCYTES FROM HEALTHY DONORS

Abramova T. Ya., Tsura V. A., Blinova E. A., Kozlov V. A.

Federal state budgetary organization "Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology", Novosibirsk, Russia

In healthy people, it has been established the possibility of induction of early and late apoptosis of T-lymphocytes proliferated in vitro under physiological conditions through the transfer of both the cellular and humoral components of an autologous apoptotic T cell culture. It was determined that under equal conditions of cultivation of lymphocytes: a high cell density and a depletion of the culture medium, the transfer of components of the cells stimulated by anti-CD3 antibodies regularly increased the sensitivity of T-lymphocytes to apoptosis. While transfer of components of the culture with the dexamethasone exerted a modulating effect.

Key words: autologous culture, T-lymphocytes, early and late apoptosis

ЛИЗОЦИМ СЛЮНЫ И АНТИЛИЗОЦИМНАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ – ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ БИОТОПА МИНДАЛИН БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ТОНЗИЛЛИТОМ

Азнабаева Л. М.¹, Федорова Т. О.¹, Укубаева Д. Г.¹, Михайлова Е. А.¹,
Киргизова С. Б.¹, Фомина М. В.¹, Миронов А. Ю.²

¹ГБОУ ВПО Оренбургский государственный медицинский университет Минздрова РФ, Оренбург; ²ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия

Установлено, что средние значения уровня лизоцима слюны у здоровых в 2,1 раза были выше чем у больных, АЛА микроорганизмов, выделенных из биоценоза здоровых была в 2 раза ниже, чем в патогенозе. Наиболее часто высокими значения АЛА обладали: *S. aureus*, *S. epidermidis* и *S. warneri*.

Ключевые слова: лизоцим, антилизоцимная активность микроорганизмов, хронический тонзиллит

Хронический тонзиллит (ХТ) широко распространён во всех возрастных группах населения и рассматривается как заболевание инфекционно-аллергического генеза, фор-