

## **ВЛИЯНИЕ ГЛИКОДЕЛИНА НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ВТОРИЧНЫХ ОРГАНОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO***

**Логинова Н.П.<sup>1</sup>, Тройнич Я.Н.<sup>1</sup>, Чарушина Ю.А.<sup>1</sup>, Заморина С.А.<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера»  
Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

<sup>2</sup> Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал  
ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук»,  
г. Пермь, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

**Резюме.** Гликоделин (PP14, PAEP, альфа-2-микроглобулин, димерный гликопротеин с молекулярной массой 42 до 56 кД) является маркером рецептивности репродуктивной ткани. Иммунорегуляторный потенциал гликоделина позволяет рассматривать его как один из ключевых факторов, формирующих иммунную толерантность организма матери к развивающемуся эмбриону. В целом гликоделин имеет перспективы применения в биомедицине в качестве фармакологического препарата для лечения посттрансплантационных осложнений.

Целью работы явилось изучение влияния гликоделина на морфофункциональное состояние вторичных органов иммунной системы при аллогенной трансплантации суспензии клеток красного костного мозга крысам Wistar в динамическом эксперименте *in vivo*. В эксперименте были задействованы белые крысы самцы линии Wistar в возрасте от 2-3 месяцев ( $m = 250$  г). Животные содержались в условиях вивария ПГНИУ в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами». Выведение животных из эксперимента проводилось на 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сутки путем декапитации в соответствии с международными правилами проведения работ с экспериментальными животными. В контрольной группе животных ( $n = 6$ ) одноразово вводили суспензию клеток костного мозга, обработанных камптотечином, в опытной группе животным ( $n = 12$ ) вводили суспензию клеток костного мозга в комплексе с 4-кратным введением гликоделина.

В работе использовали рекомбинантный гликоделин («MyBioSource», Германия), который вводили животным в концентрации, соответствующей беременности (0,75 мкг/мл). Внутривентриальное введение клеток костного мозга на фоне гликоделина в динамике эксперимента (21 сут.) показало, что аллогенная трансплантация вызвала гиперплазию селезенки и лимфатических узлов. В функциональных зонах органов развивались явления пролиферации и дифференцировки клеток иммунной системы. Введение гликоделина на ранних сроках эксперимента 3-7-е сут. вызвало усиление пролиферативных процессов в Т- и В-зонах обоих органов. При этом в органах отсутствовали признаки воспаления и гибели клеток путем апоптоза. С четырнадцатых суток эксперимента в органах обна-

### **Адрес для переписки:**

Заморина Светлана Анатольевна  
Институт экологии и генетики микроорганизмов  
Уральского отделения Российской академии наук  
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.  
Тел.: 8 (342) 280-77-94.  
E-mail: mantissa7@mail.ru

### **Address for correspondence:**

Zamorina Svetlana A.  
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms  
614081, Russian Federation, Perm, Golev str., 13.  
Phone: 7 (342) 280-77-94.  
E-mail: mantissa7@mail.ru

### **Образец цитирования:**

Н.П. Логинова, Я.Н. Тройнич, Ю.А. Чарушина,  
С.А. Заморина «Влияние гликоделина на  
морфофункциональное состояние вторичных органов  
иммунной системы при аллогенной трансплантации в  
эксперименте *in vivo*» // Российский иммунологический  
журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 175-180.  
doi: 10.46235/1028-7221-991-IOG

© Логинова Н.П. и соавт., 2021

### **For citation:**

N.P. Loginova, Troynich Ya.N., Yu.A. Charushina,  
S.A. Zamorina "Influence of glycodelin on morphofunctional  
state of secondary immune organs in experimental model of  
allogeneic transplantation", Russian Journal of Immunology/  
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 2,  
pp. 175-180.  
doi: 10.46235/1028-7221-991-IOG

DOI: 10.46235/1028-7221-991-IOG

руживалась эозинофильная инфильтрация, что является косвенным положительным признаком реакции на трансплантат. К концу исследования в органах наблюдали доминирование процессов дифференцировки над пролиферацией. Таким образом, гликоделин стабилизирует пролиферативные процессы и способствует появлению новой генерации клеток, поддерживающей реакцию организма по отношению к трансплантату. По-видимому, гликоделин способен участвовать в развитии адапционно-приспособительного механизма во вторичных органах иммунной системы.

*Ключевые слова.* аллогенный трансплантат, гликоделин, красный костный мозг, селезенка, брыжеечные лимфатические узлы

## INFLUENCE OF GLYCODELIN ON MORPHOFUNCTIONAL STATE OF SECONDARY IMMUNE ORGANS IN EXPERIMENTAL MODEL OF ALLOGENEIC TRANSPLANTATION

Loginova N.P.<sup>a</sup>, Troynich Ya.N.<sup>a</sup>, Charushina Yu.A.<sup>a</sup>, Zamorina S.A.<sup>b, c</sup>

<sup>a</sup> E. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

<sup>c</sup> Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

**Abstract.** Glycodelin (PP14, PAEP, alpha-2-microglobulin, dimeric glycoprotein with a molecular weight of 42 to 56 kDa) is a marker of reproductive tissue receptivity. Immunoregulatory potential of glycodelin allows us to consider it among key factors that promote maternal immune tolerance to the developing embryo. In general, glycodelin has prospects for use in biomedicine as a biopharmaceutical to treat post-transplant complications. This work aimed to study the effect of glycodelin on morpho-functional state of the secondary organs of immune response in the course of *in vivo* experiment during allogeneic transplantation of bone marrow cell suspension to Wistar rats. The experiment was performed in white male Wistar rats aged 2-3 months (body mass, 250 g). The animals were kept at the Perm State National Research University animal clinic under GOST 33216-2014 "Rules for working with laboratory rodents and rabbits". The animals were sacrificed on the 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, and 21<sup>st</sup> days according to international rules for working with experimental animals. In the control group, animals (n = 6) were injected once with a suspension of camptothecin-treated bone marrow cells; in experimental group, the animals (n = 12) were injected with a bone marrow cells in combination with glycodelin administered 4 times.

We used recombinant glycodelin (MyBioSource, Germany), which was administered to the animals at a concentration corresponding to pregnancy state (0.75 µg/mL). Intraperitoneal injection of bone marrow cells simultaneously with glycodelin over the terms of experiment (21 days) showed that allogeneic transplantation caused hyperplasia of spleen and lymph nodes. In the functional zones of organs, proliferation and differentiation of immune cells developed. Injection of glycodelin at the early stages of experiment (3-7 days) caused an increase in proliferative processes in the organs of both T- and B-dependent immunity. Moreover, there were no signs of inflammation and apoptotic cell death in the organs. Since the 14<sup>th</sup> day of the experiment, eosinophilic infiltration of the organs was evident, being an indirect positive sign of response to the transplanted cells. By the end of study, differentiation processes dominated over proliferation in the organs. Thus, glycodelin stabilizes proliferative processes and promotes emergence of a new cell generation, thus supporting host response to the transplant. Apparently, glycodelin can participate in development of adaptive mechanism in secondary organs of immune system.

*Keywords:* allogeneic transplant, glycodelin, red bone marrow, spleen, mesenteric lymph nodes

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-29-04055 мк.

### Введение

Гликоделин (PP14, PAEP, альфа-2-микроглобулин, димерный гликопротеин с молекулярной

массой 42 до 56 кД) рассматривается как маркер рецептивности репродуктивной ткани [2]. Иммуномодулирующие эффекты гликоделина заключаются в ингибировании пролиферации Т- и В-лимфоцитов, подавлении цитотоксичности НК-клеток, индукции апоптоза активированных CD4<sup>+</sup>-клеток, моноцитов и НК-клеток, угнете-

нии активности цитотоксических Т-лимфоцитов и подавлении функциональной активности макрофагов и дендритных клеток. Помимо этого, гликоделин повышает уровень регуляторных Т-лимфоцитов, сдвигает баланс Th1/Th2 в сторону Th2 и индуцирует толерантный фенотип в дендритных клетках [1]. Иммунорегуляторный потенциал гликоделина позволяет рассматривать его как один из ключевых факторов, формирующих иммунную толерантность организма матери к развивающемуся эмбриону. В целом, очевидно, что гликоделин имеет перспективы применения в биомедицине в качестве фармакологического препарата для лечения аутоиммунных заболеваний, посттрансплантационных осложнений и «перепрограммирования» аутореактивных клонов Т-лимфоцитов *in vitro* для дальнейшей клеточной иммунотерапии. В 2018 г. стало известно, что гликоделин препятствует отторжению трансплантата в эксперименте [3], что открывает для него фармакологические перспективы. Предположение о возможном применении гликоделина в случае трансплантации легкого, было сделано также Schneider и соавт. [4, 5].

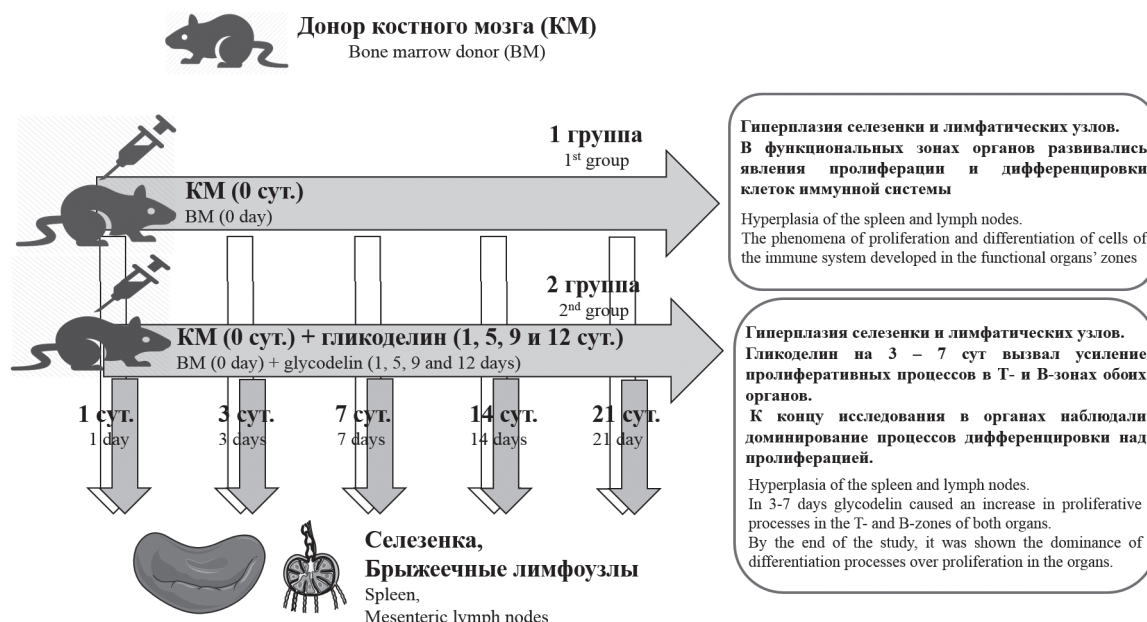
**Целью работы** явилось изучение влияния гликоделина на морфофункциональное состояние вторичных органов иммунной системы при аллогенной трансплантации суспензии клеток красного костного мозга в динамическом эксперименте *in vivo*.

## Материалы и методы

В эксперименте задействованы белые крысы самцы линии Wistar ( $n = 24$ ) в возрасте от 2–3 месяцев ( $m = 250$  г). Животные содержались в условиях вивария ПГНИУ в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами». Выведение животных из эксперимента проводилось на 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сут. путем декапитации в соответствии с международными правилами проведения работ с экспериментальными животными (рис. 1).

Животные были разделены на 2 группы: 1-я ( $n = 6$ ), которым вводили взвесь костного мозга (КМ) ( $10^7$  клеток, обработанных камптотецином (50 мкг/мл, Tocris Bioscience, Великобритания), в 100 мкл среды RPMI-1640 (Sigma, США) внутривенно); 2-я ( $n = 12$ ) вводилась взвесь костного мозга в комплексе с гликоделином. Гликоделин вводили внутримышечно в объеме 14 мг/100 мкл физиологического раствора, в следующем режиме: на 1-е, 5-е, 9-е и 12-е сутки в физиологической концентрации, характерной для периода беременности ( $\sim 0,75$  мкг/мл) (рис. 1). В работу взят рекомбинантный гликоделин (E-Coli), MBS718444 (Германия); полученный под заказ с сайта [www.mybiosource.com/recombinant-protein/glycodelin-paep/718444](http://www.mybiosource.com/recombinant-protein/glycodelin-paep/718444).

Гистологическое исследование: изучали селезенку и брыжеечные лимфатические узлы. После забора органы фиксировали в 10%-ном ней-



**Рисунок 1. Экспериментальная схема по изучению роли гликоделина в регуляции морфофункциональных особенностей вторичных лимфоидных органов**

Примечание. КМ – костный мозг.

Figure 1. Experimental scheme for studying the role of glycodelin in the regulation of morphofunctional functions of secondary lymphoid organs

Note. BM, bone marrow.

тральном формалине на фосфатном буфере (рН = 7,2), проводку осуществляли в гистологическом процессоре замкнутого типа с вакуумом Leica ASP 300 (Германия). Заливали в парафин «Histomix» фирма Bio Optica (Германия). На микротоме Leica SM 2000R (Leica Microsystems, Германия) готовили серийные срезы толщиной 4-5 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином для оценки общей морфологической картины. Оценку гистологических препаратов проводили с использованием микроскопов Leica DM2500 и Carl Zeiss LSM 710 и программных пакетов для захвата и анализа изображений Leica Application Suite и Zen 2010 при увеличении в 10 40 и 10 60.

## Результаты и обсуждение

Анализ органов после аллогенной трансплантации фракции клеток костного мозга показал, что во вторичных органах иммунитета наблюдается процесс активации пролиферации и дифференцировки клеток иммунной системы. Так, в селезенке, начиная с 3-х сут., увеличивается объем белой пульпы. В сравнении с группой контроля маргинальная зона широкая, краевой синус умеренно расширен и заполнен клетками. В перартериальной муфте клеток становится больше по сравнению с контрольной группой. На 7-е сут. зоны белой пульпы продолжают заполняться клетками. Лимфоидные узелки очень крупные, все активные. В них верифицируются процессы пролиферации и дифференцировки клеток лимфоидного ряда. В сосудах красной пульпы признаки умеренного стаза клеток крови. До конца эксперимента (21-е сут.) зоны белой пульпы остаются крупными и активными. Во всех зонах органа имеется активность макрофагов. Помимо этого, наблюдалось повышение количества лимфоцитов, в пульпе они формируют диффузные скопления или лимфоцитарные муфточки вокруг кисточковых артериол.

В брыжеечных лимфатических узлах аллогенное введение клеток красного костного мозга на 3-и и 7-е сут. вызвало увеличение лимфоидной массы во всех функциональных зонах органа. Синусы расширены и заполнены лимфоцитами. Имеются процессы миграции клеток через стенку синуса. Т- и В-зависимые зоны заполняются лимфоидными клетками, увеличиваются в объеме, становятся широкие, в них активные процессы бластотрансформации. В крупных лимфоидных узелках процессы пролиферации и дифференцировки клеток, явления плазмацитогенеза. В светлых центрах скопление активных макрофагов с резко оксифильной цитоплазмой. Межузелковое пространство не просматривается, заполнено лимфоцитами. В посткапиллярных венах паракортикальной зоны верифицируется признаки

миграции клеток в орган. Зона широкая, в ней также макрофаги формируют скопления.

На 21-е сут. в зонах органа продолжают активные процессы пролиферации и дифференцировки лимфоидных клеток, что отражается на размерах и структуре Т- и В-зависимых зон. Как результат, в паракортикальной зоне и в мозговых тяжах формируются скопления плазматических клеток. В этих участках установлено присутствие активных макрофагов и эозинофилов.

Введение гликоделина дополнительно к аллогенной трансплантации клеток костного мозга показало: на 3-е сутки в лимфатический узел осуществлялась массовая миграция клеток. Синусы органа все расширены и переполнены клетками лимфоидного ряда. На этом фоне идет активация функциональных зон органа. В сравнении с группой контроля, в наружной коре формируются крупные лимфоидные узелки с активными центрами. Узелки сливаются, межузелковые пространства не просматриваются. В паракортикальной зоне (Т-зона) вокруг посткапиллярных венул формируются лимфоцитарные муфты. Помимо лимфоидных клеток, в этой части коры имеются крупные скопления из макрофагов и плазматических клеток. К 14-му дню эксперимента во всех зонах органа численность макрофагов увеличивается. В лимфоидных узелках (В-зона) признаки активной пролиферации В-лимфоцитов, клетки формируют достаточно крупные скопления в базальной части лимфоидного узелка. В паракортикальной зоне и в тяжах мозгового вещества верифицируется скопление макрофагов и плазматических клеток находящихся на разной стадии дифференцировке. Мозговые тяжи перегружены клеточным материалом, клетки на стадии миграции в окружающие синусы (которые также переполнены) — это стирает границы между этими структурами. В целом, к этому сроку исследования все зоны органа перегружены клеточным материалом. На 21-е сут. пролиферативные процессы в В- и Т-зонах продолжают, но имеется тенденция к стабилизации (снижения) активности. Лимфоидные узелки продолжают оставаться крупными, активными. Между ними хорошо просматриваются промежуточные синусы, тенденции к слиянию узелков нет. Синусы широкие, хорошо верифицируются, в просвете синусов лимфоциты, макрофаги и эозинофилы. В паракортикальной зоне (Т-зона) между диффузным скоплением лимфоцитов присутствуют скопления эозинофилов (единичные), макрофагов и плазматические клетки на разной стадии дифференцировке.

В селезенке этой экспериментальной группы, на 3-е сут. в сосудах венозного русла (крупные и мелкие) умеренный стаз клеток крови. Тяжи

красной пульпы также переполнены клетками, преимущественно эритроцитами. Белая пульпа занимает значительную площадь (более 40%). Все зоны развиты, активные. Лимфоидные узелки (В-зона) крупные, в них признаки пролиферации. В центре скопление макрофагов. Т-зоны формируют плотное скопление вокруг центральной артерии, составляя значительную часть белой пульпы. Широкие маргинальные зоны окружены соответствующим синусом с клетками. С 7-х сут. в функциональных зонах появляются плазматические клетки, увеличиваясь в количестве до 21 дня эксперимента. Плазматические клетки скапливаются по краю лимфоидного узелка, в маргинальной зоне. Между ними единично, или по 2-3 клетки, присутствуют эозинофилы. Повсеместно присутствуют клетки макрофагального ряда. До конца эксперимента функциональные зоны белой пульпы продолжают оставаться в активном состоянии, но размеры Т- и В-зон становились меньше или не изменялись. Проллиферативные процессы несколько снижались, а повышался дифференцировочный потенциал, что отразилось на численности плазматических клеток. На протяжении всего эксперимента ма-

крофаги присутствуют во всех зонах органа, формируя контакты с клетками лимфоидного ряда.

## Заключение

Таким образом, на фоне аллогенной трансплантации клеток костного мозга гликоделин способствует активации клеток иммунной системы, в направлении их пролиферации и дифференцировки. На этом фоне в органах отсутствуют признаки воспаления и гибели клеток путем апоптоза. С 14 дня эксперимента в органах верифицируются эозинофильная инфильтрация, что является косвенным положительным признаком реакции на трансплантат. В целом, гликоделин стабилизирует пролиферативные процессы и способствует появлению новой генерации клеток, поддерживающей реакцию организма по отношению к трансплантату. По-видимому, гликоделин способен участвовать в развитии адаптационно-приспособительного механизма во вторичных органах иммунной системы. Дальнейшей нашей задачей станет изучение состояния первичных органов иммунной системы, а также цитокиновый профиль и фенотип клеток иммунной системы в периферической крови в данной экспериментальной системе.

## Список литературы / References

1. Бочкова М.С., Заморина С.А., Тимганова В.П., Храмов П.В., Раев М.Б. Роль гликоделина в регуляции иммунной системы в контексте развивающейся беременности // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 4. С. 603-616. [Bochkova M.S., Zamorina S.A., Timganova V.P., Khramtsov P.V., Rayev M.B. The role of glycodelin in the regulation of the immune system in the context of developing pregnancy. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 4, pp. 603-616. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-603-616.
2. Посисеева Л.В., Герасимов А.М., Петрова У.Л. Гликоделин в акушерско-гинекологической практике: прошлое, настоящее, будущее // Проблемы репродукции, 2020, Т. 26, № 3. С. 11-22. [Posiseeva L.V., Gerasimov A.M., Petrova U.L. Glycodelin in obstetric and gynecological practice: past, present, future. *Problemy reprodukcii = Reproduction Problems*, 2020, Vol. 26, no. 3, pp. 11-22. (In Russ.)]
3. Dixit A., Balakrishnan B., Karande A.A. Immunomodulatory activity of glycodelin: implications in allograft rejection. *Clin. Exp. Immunol.*, 2018, Vol. 192, no. 2, pp. 213-223.
4. Schneider M., Meister M., Muley T. Glycodelin as diagnostic and prognostic marker and for monitoring treatment of lung diseases. European patent application, Bulletin 2016.06. EP2982765A1.
5. Schneider M.A., Granzow M., Warth A., Schnabel P.A., Thomas M., Herth F.J., Dienemann H., Muley T., Meister M. Glycodelin A new biomarker with immunomodulatory functions in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2015, Vol. 21, no. 15, pp. 3529-3540.

### Авторы:

**Логина Н.П.** — д.м.н., доцент, заведующая кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

**Тройнич Я.Н.** — преподаватель кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

### Authors:

**Loginova N.P.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Histology, Embryology and Cytology, E. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

**Troynich Ya.N.**, Lecturer, Department of Histology, Embryology and Cytology, E. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

**Чарушина Ю.А.** — преподаватель кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

**Charushina Yu.A.**, Lecturer, Department of Histology, Embryology and Cytology, E. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

**Заморина С.А.** — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук; профессор кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

**Zamorina S.A.**, PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Professor, Microbiology and Immunology Department, Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

---

Поступила 17.05.2021  
Принята к печати 17.06.2021

Received 17.05.2021  
Accepted 17.06.2021