

УСИЛЕНИЕ ГОМЕОСТАТИЧЕСКОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЦИКЛОФОСФАНА У МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6

Гринько Е.К.^{1,2}, Марзанова С.Н.², Донецкова А.Д.^{1,3,4}

¹ ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» ФМБА России, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

⁴ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Резюме. Химиотерапевтические препараты, которые применяются в медицине для лечения онкологических заболеваний, способны вызвать повреждение иммунной системы и привести к формированию вторичного иммунодефицита. Восстановление Т-клеточного звена иммунитета, которое под действием химиотерапевтических средств поражается наиболее сильно, является важным объектом исследований как для понимания патогенеза повреждающего действия цитостатиков, так и для поиска адекватных способов коррекции возникающих нарушений. Целью исследования было изучить процесс восстановления Т-клеток и выяснить вклад гомеостатической пролиферации в восстановление субпопуляций Т-лимфоцитов. Эксперимент проводили на 33 самках мышей линии C57BL/6. Опытной группе (25 мышей) однократно вводился циклофосфан в дозе 125 мг/кг, контрольная группа препарат не получала. Материалом для исследования являлись спленоциты, выделенные на 5, 10, 20, 30 и 60 сутки после введения препарата. С помощью проточной цитометрии была проведена оценка восстановления Т-хелперов (фенотип CD3⁺CD4⁺) и цитотоксических Т лимфоцитов (ЦТЛ) (фенотип CD3⁺CD8⁺), а также их «возрастной» фенотип по содержанию субпопуляций наивных (Tnaive) и центральных Т-клеток памяти (Tcm). Вклад гомеостатической пролиферации в восстановление численности Т-клеток определяли по соотношению Tnaive/Tcm. Было выявлено статистически значимое увеличение численности общего числа спленоцитов, субпопуляций Т-хелперов, ЦТЛ, а также соотношения CD4⁺/CD8⁺Т-клеток в ранний период после введения ЦФ (5-е сутки). В дальнейшем отмечалось снижение спленоцитов и их субпопуляций. Субпопуляция ЦТЛ не восстанавливается даже через 2 месяца после введения препарата и является более уязвимой к действию циклофосфана, чем субпопуляция Т-хелперов. При оценке «возрастного» фенотипа Т-клеток было показано, что наивные Т-хелперы и наивные ЦТЛ наиболее подвержены действию ЦФ, эти субпопуляции также не восстанавливались через 60 суток после его введения. В то же время число клеток с фенотипом центральных Т-клеток памяти преобладало к концу эксперимента: выявлена конверсия фенотипа Т-лимфоцитов с преобладанием клеток с фенотипом центральных Т-клеток памяти. Таким образом, после введения ЦФ показано усиление гомеостатической пролиферации с конверсией фенотипа наивных Т-клеток в клетки с фенотипом центральных Т-клеток памяти, сопровождающееся дефицитом наивных Т-клеток. Подобные изменения приводят к сужению репертуара Т-клеточных рецепторов,

Адрес для переписки:

Гринько Екатерина Константиновна
ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» ФМБА России
115522, Россия, Москва, Каширское шоссе, 24.
Тел: 8 (499) 617-79-19.
Факс: 8 (499) 612-81-51.
E-mail: info@nrcci.ru

Address for correspondence:

Grinko Ekaterina K.
National Research Center – Institute of Immunology
115522, Russian Federation, Moscow,
Kashirskoye highway, 24.
Phone: 7 (499) 617-79-19.
Fax: 7 (499) 612-81-51.
E-mail: info@nrcci.ru

Образец цитирования:

Е.К. Гринько, С.Н. Марзанова, А.Д. Донецкова
«Усиление гомеостатической пролиферации
Т-лимфоцитов после введения циклофосфана у мышей
линии C57BL/6» // Российский иммунологический
журнал, 2022. Т. 25, № 1. С. 37-46.
doi: 10.46235/1028-7221-1098-ЕНР
© Гринько Е.К. и соавт., 2022

For citation:

E.K. Grinko, S.N. Marzanova, A.D. Donetskova
“Enhanced homeostatic proliferation of T lymphocytes after
cyclophosphamide injection in C57BL/6 mice”, *Russian
Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal*, 2022, Vol. 25, no. 1, pp. 37-46.
doi: 10.46235/1028-7221-1098-EHP
DOI: 10.46235/1028-7221-1098-EHP

что вызывает преждевременное старение иммунной системы и повышает риск развития аутоиммунных заболеваний.

Ключевые слова: гомеостатическая пролиферация, конверсия фенотипа, лимфопения, проточная цитометрия, C57BL/6, циклофосфамид

ENHANCED HOMEOSTATIC PROLIFERATION OF T LYMPHOCYTES AFTER CYCLOPHOSPHAMIDE INJECTION IN C57BL/6 MICE

Grinko E.K.^{a, b}, Marzanova S.N.^b, Donetskova A.D.^{a, c, d}

^a National Research Center – Institute of Immunology, Moscow, Russian Federation

^b K. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russian Federation

^c N. Pirogov Russian National Research Medical University (Pirogov Medical University), Moscow, Russian Federation

^d Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Abstract. Chemotherapeutic agents are used in medicine to treat cancer. They can damage immune system and lead to the secondary immunodeficiency. T cells are most severely affected during chemotherapy. Restoration of the T lymphocytes is an important topic in research to understand pathogenesis of damaging effects caused by cytostatics and searching ways to correct the resulting disorders. The aim of our study was to follow the process of T cell recovery, and to understand the role of its homeostatic proliferation. 33 female C57BL/6 mice were included into the experiment. The experimental group (25 mice) received a single injection of cyclophosphamide (Cy) at a dose of 125 mg/kg; the control group did not receive the drug. Biomaterials for the study were splenocytes isolated on days 5, 10, 20, 30 and 60 after the drug administration. Flow cytometry was used to measure the recovery of T helpers (CD3⁺CD4⁺) and cytotoxic T lymphocytes (CTL, CD3⁺CD8⁺), as well as their “age-related” phenotype assayed for naive (T_{naive}) and central memory (T_{cm}) T cells. The level of homeostatic proliferation was determined by the T_{naive}/T_{cm} ratio. The total amount of splenocytes, T helpers, CTLs and the CD4⁺/CD8⁺ ratio showed a statistically significant increase at the early terms after Cy administration (day 5). Further, a decrease in splenocytes and their subpopulations was observed. We found that the CTL subpopulation didn't recover even 2 months after the drug administration and was more sensitive to the action of cyclophosphamide than the T helper subpopulation. We have also revealed that naive T helpers and naive CTLs are most susceptible to the Cy action; these subpopulations also failed to recover 60 days after the drug administration. At the same time, the amount of central memory T cells predominated by the end of the experiment, showing conversion of the T cell phenotype. Thus, we have shown an increase in homeostatic proliferation, along with conversion of naive T cell phenotype to the central memory T cells after Cy administration accompanied by deficiency of naive T cells. Such changes cause skewing of TCR repertoire. This shift may cause premature aging of immune system and increases the risk of autoimmune diseases.

Keywords: homeostatic proliferation, phenotype conversion, lymphopenia, flow cytometry, C57BL/6, cyclophosphamide

Введение

В течение жизни организм может подвергаться воздействию различных факторов, вызывающих лимфопению. Одним из механизмов восстановления численности лимфоцитов является гомеостатическая пролиферация (ГП). Гомеостатическая пролиферация лимфоцитов – это деление вышедших из тимуса Т-лимфоцитов в периферических органах иммунной системы [4]. В гомеостатической пролиферации участвуют как наивные Т-клетки, не контактировавшие с антигеном, так и Т-клетки памяти. Этот процесс происходит главным образом в Т-зависимых зонах – периартериальных муфтах селезенки и паракортексе лимфатических узлов и имеет некото-

рые особенности у наивных Т-клеток и Т-клеток памяти [2].

Для гомеостатической пролиферации в периферических органах иммунной системы наивным Т-клеткам необходим контакт с МНС в комплексе с аутологичным пептидом, так же, как и созревающим Т-лимфоцитам во время тимопоэза в процессе отрицательной и положительной селекции (контакт с комплексами МНС-эндогенный пептид). Наивные Т-клетки могут конкурировать за факторы выживания с Т-клетками памяти во время этого процесса [12].

Для гомеостатической пролиферации важен еще один процесс, который напоминает положительную селекцию в тимусе. Он требует взаимодействия Т-клеток с МНС II (для CD4⁺Т-клеток)

и МНС I (для CD8⁺Т-клеток), однако не нуждается в стимуляции через CD28 [3].

Кроме клеточных взаимодействий для ГП необходимы интерлейкины-7 (IL-7) и интерлейкин-15 (IL-15). Эти же цитокины являются ингибиторами супрессорной активности Treg, что, предположительно, может создавать предпосылки к возникновению аутоиммунной патологии. Помимо этого, усиление гомеостатической пролиферации приводит к повышению олигоклональности Т-клеточных рецепторов [8, 21].

IL-7 необходим для экспрессии в пролиферирующих клетках антиапоптотических факторов. Концентрация этого цитокина определяет интенсивность ГП: концентрация IL-7 для ГП должна быть выше, чем для поддержания жизни лимфоцита в обычных условиях. IL-7 вырабатывают клетки стромы и дендритные клетки периферических лимфоидных органов иммунной системы. IL-15 необходим для гомеостатической пролиферации CD8⁺Т-клеток [3].

Наивные Т-клетки в результате гомеостатической пролиферации приобретают фенотип клеток памяти, экспрессия ими CD44 усиливается. Приобретение наивными клетками фенотипа клеток памяти без вовлечения в иммунный ответ получило название «конверсия фенотипа». Следует отметить важную особенность этих клеток – Т-лимфоциты, подвергшиеся ГП, пролиферируют в ответ на лимфопеническое состояние, не взаимодействуя с антигеном [18].

Таким образом, большая часть наивных клеток, вовлеченных в гомеостатическую пролиферацию, образует в итоге популяцию покоящихся клеток, фенотипически похожих на центральные Т-клетки памяти, возникшие в ответ на чужеродные антигены. Они, подобно центральным клеткам памяти, экспрессируют CCR7 и CD62L, необходимые для их рециркуляции, а также CD127 (IL-7R α) и CD122 (IL-2R β /IL-15) [4, 7].

Приобретенный фенотип клеток памяти сохраняется стабильно при продолжающейся Т-клеточной лимфопении. При этом Т-лимфоциты, которые приобретают фенотип и свойства клеток памяти, продолжают участвовать в ГП и попадают под действие факторов, определяющих гомеостаз Т-клеток памяти с его особенностями [5].

Для гомеостатической пролиферации Т-клеток памяти не требуется контакта клеток с молекулами МНС, но необходимы гуморальные факторы. Для пролиферации CD8⁺Т-клеток памяти, которые высоко экспрессируют CD122 (субъединицы IL-2R β /IL-15), нужен IL-15 [14, 17]. Также имеются данные, что CD8⁺Т-клетки памяти могут пролиферировать и под действием таких цитокинов, как IL-7 и IL-2 [20]. Гомеостатическую пролиферацию CD4⁺Т-клеток памяти регулирует IL-7 [19]. Синергичную роль оказы-

вает экспрессия OX40 в эффекторных CD4⁺Т-клетках памяти при ГП [23].

Конверсия фенотипа наивных клеток и сужение репертуара TCR при ГП влияет на способность иммунной системы отвечать на антигены. Это может создавать предпосылки к накоплению аутореактивных клонов и преждевременному старению иммунной системы, что следует учитывать при индуцированных лимфопениях различного генеза. При терапии опухолей по схемам лечения, которые включают циклофосфан, в ответ на лимфопению усиливается гомеостатическая пролиферация. Циклофосфан или циклофосфамид (ЦФ) – это производное бис- β -хлорэтиламина (азотистый аналог иприта). Циклофосфамид метаболизируется системой цитохрома P450 в печени [9].

В настоящей работе мы исследовали особенности ГП после введения циклофосфана – одного из распространенных химиотерапевтических препаратов алкилирующего действия, который активно применяется для лечения опухолей.

Материалы и методы

Мыши

Эксперимент проводили на самках мышей линии C57BL/6 в возрасте 6–8 недель и массой 18–20 г. Мыши были получены из питомника «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Работа с мышами проводилась в соответствии с «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (ETS N123), приказом МЗ РФ от 23 августа 2010 года №708н «Об утверждении правил лабораторной практики» и «Положением об этическом отношении к лабораторным животным ГНЦ «Института иммунологии» ФМБА России».

В исследовании было задействовано 33 мыши, которых разделили на 2 группы: 25 животных в опытной и 8 мышей в контрольной группе. Опытная группа получала ЦФ. На 5-е, 10-е, 20-е, 30-е и 60-е сутки (по 5 мышей в каждой экспериментальной подгруппе) анализировали Т-клетки, выделенные из селезенок мышей.

Химиотерапия

Опытной группе мышей однократно внутрибрюшинно вводился циклофосфамид (Endoxan, Бакстер Онкология ГмбХ, Германия) в дозе 125 мг/кг, что составляет половину от максимальной переносимой дозы 250 мг/кг. Сухой лиофилизированный ЦФ разводили в 10 мл стерильного физиологического раствора [13].

Выделение спленоцитов

Спленоциты выделяли из мышечных селезенок. Для получения клеток селезенки механически гомогенизировали с помощью гомогенизатора Поттера, далее переносили их в PBS

(«ПанЭко», Россия) с добавлением 1% BSA (Sigma, США) и 0,1% NaN₃ (Sigma, США).

Для удаления эритроцитов к суспензии добавляли 1 мл лизирующего буфера (Vecton Dickinson, США) с последующей отмывкой в 5 мл PBS.

Количество клеток в органе определяли с помощью камеры Горяева. Жизнеспособность клеток определяли методом эксклюзии 0,1%-ного раствора трипанового синего, она была выше 95% во всех исследованиях.

Проточная цитометрия

Проточная цитометрия проводилась на цитометре BD FACSCanto™ II (Vecton Dickinson, США), как описано в предыдущем исследовании [1].

Определяли общее содержание клеток, процент и абсолютное содержание Т-лимфоцитов (CD3⁺) и их субпопуляций: Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺), возрастной фенотип Т-клеток (наивные Т-лимфоциты (Tnaive), центральные Т-клетки памяти (Tcm)). У мышей «возрастной» фенотип оценивали по коэкспрессии поверхностных маркеров — CD44 и CD62L. Наивные Т-клетки имеют фенотип CD62L^{44lo/-}, а центральные Т-клетки памяти — CD62L^{44hi}.

Использовали следующую комбинацию моноклональных антител фирмы eBioscience (США) (препараты для изотипических контролей также этой фирмы):

Анти-CD3-FITC + анти-CD4-PerCP-Cy5.5 + анти-CD8-APC-eFluor780 + анти-CD44-PE-Cy7 + анти-CD62L-PE.

Статистическая обработка результатов

Обработка результатов проводилась с помощью компьютерной программы Statistica 12.5 (Stat Soft Inc., США). Учитывая негауссово распределение (по критерию Шапиро-Уилка), использовали методы непараметрического анализа. Исследованные количественные данные представлены в виде Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), где Me — медиана, Q_{0,25} — нижний квартиль, Q_{0,75} — верхний квартиль. Для попарного сравнения экспериментальных групп с контрольными применяли непараметрический U-критерий Манна-Уитни. В случаях $p < 0,05$ различие считали статистически значимым.

При графическом представлении данных проводили нормализацию относительно контроля, значение которого принимали за единицу.

Результаты

Нами проведена оценка восстановления Т-хелперов (фенотип CD3⁺CD4⁺) и цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) (фенотип CD3⁺CD8⁺), а также их субпопуляций после воздействия циклофосфана. Для исследования влияния гомеостатической пролиферации на восстановление

лимфоцитов был проанализирован «возрастной» фенотип Т-клеток.

Анализ восстановления численности спленоцитов, Т-хелперов и ЦТЛ

Результаты изучения численности клеток селезенки мышей после однократного введения циклофосфана представлены в таблице 1. Число всех спленоцитов на 5-е сутки после введения ЦФ увеличилось на 36% ($p < 0,05$ в сравнении с контролем).

Анализ численности субпопуляций Т-хелперов и ЦТЛ показал, что количество клеток обеих субпопуляций увеличилось почти в 2 раза на 5-е сутки, однако в дальнейшем наблюдалось их снижение (до 20-х суток включительно) (табл. 1, рис. 1).

Количество ЦТЛ уменьшилось к 10-м суткам на 46%, а к 20-м суткам — до 26% от контроля ($p < 0,05$ в сравнении с контролем). Число Т-хелперов уменьшилось до 48% на 20-е сутки, однако различия с контрольной группой не были статистически значимы, что, по-видимому, связано с небольшим числом мышей в группах.

Начиная с 30-х суток (табл. 1, рис. 1) численность Т-хелперов и ЦТЛ начала увеличиваться. Для Т-хелперов процесс восстановления занял 2 месяца: к 60-м суткам число Т-хелперов мышей опытной группы достигло уровня Т-хелперов мышей в контроле.

Процент ЦТЛ через 60 суток был лишь 76% от уровня контроля ($p < 0,05$ в сравнении с контролем). Следовательно, восстановления популяции Т-киллеров не происходит даже через 2 месяца после воздействия цитостатика.

Оценка вклада гомеостатической пролиферации в восстановление субпопуляций Т-лимфоцитов

Помимо изучения восстановления числа Т-хелперов и ЦТЛ мы провели исследование влияния гомеостатической пролиферации на восстановление лимфоцитов. Поскольку гомеостатическая пролиферация сопровождается конверсией фенотипа наивных Т-клеток, мы оценили соотношение наивных Т-клеток и центральных Т-клеток памяти. Алгоритм цитометрического определения субпопуляций наивных и центральных Т-клеток памяти на примере ЦТЛ селезенки интактной мыши представлен на рисунке 2.

При анализе восстановления наивных Т-клеток (Tnaive) и Т-клеток памяти (Tcm) было выявлено статистически значимое увеличение численности на 5-е сутки во всех субпопуляциях, кроме CD8⁺Tnaive (табл. 2, рис. 3, 4) ($p < 0,05$ в сравнении с контролем). Однако на 10-е сутки численность клеток во всех анализируемых субпопуляциях снизилась в 2-3 раза, кроме CD4⁺Tcm ($p < 0,05$ в сравнении с контролем).

Численность наивных Т-хелперов была минимальной на 20-е сутки, а наивных ЦТЛ — на 30-е сутки после введения ЦФ. Содержание клеток в этих субпопуляциях не достигало уровня контро-

ТАБЛИЦА 1, ЧИСЛЕННОСТЬ СПЛЕНОЦИТОВ, Т-ХЕЛПЕРОВ И ЦТЛ МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6 ПОСЛЕ ОДНОКРАТНОГО ВВЕДЕНИЯ ЦИКЛОФОСФАНА, млн

TABLE 1, NUMBER OF SPLENOCYTES, T-HELPERS AND CTLs OF C57BL/6 MICE AFTER A SINGLE INJECTION OF CYCLOPHOSPHAMIDE, mln

Сутки Days	Спленоциты Splenocytes	CD3 ⁺ CD4 ⁺ Т-хелперы T helper	CD3 ⁺ CD8 ⁺ ЦТЛ CTL
0	127,88 (118,50-139,50)	26,17 (23,93-29,41)	24,9 (24,38-26,26)
5	174,00 (147,00-247,00)*	61,81 (44,56-79,86)*	45,67 (39,34-65,32)*
10	100,50 (91,00-100,50)	17,67 (14,39-20,19)	13,39 (12,55-13,58)*
20	60,50 (56,50-64,50)*	12,61 (12,17-13,29)*	6,55 (6,16-7,28)*
30	70,00* (62,50-71,25)	16,34 (12,73-17,66)*	6,14 (6,13-6,60)*
60	140,00 (110,00-148,50)	27,37 (21,52-27,39)	18,97 (13,58-20,45)*

Примечание. * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

Note. *, $p < 0.05$ in comparison with control.

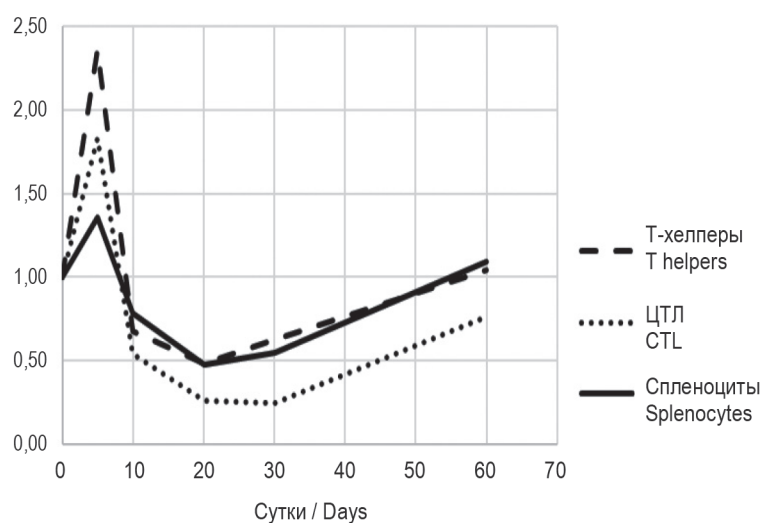


Рисунок 1. Динамика изменения численности популяций спленоцитов, Т-хелперов и ЦТЛ мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана

Примечание. По оси абсцисс отмечены сутки после введения ЦФ, по оси ординат – нормализованные данные по количеству клеток, где за 1 принято значение контроля. Общее число спленоцитов, Т-хелперов и ЦТЛ увеличивается на 5-е сутки после введения ЦФ и снижается до 47%, 46% и 23% от контроля, соответственно, на 20-е сутки.

Figure 1. Dynamics of changes in the number of splenocyte, T helper and CTL populations in C57BL/6 mice after a single injection of cyclophosphamide

Note. The abscissa shows the day after CP injection, the ordinate shows the normalized data of the cell number the control value taken as 1. The total number of splenocytes, T helpers and CTLs increases on the 5th day after CP injection and decreases to 47%, 46% and 23% of the control amount on the 20th day, respectively.

ля к концу эксперимента: численность наивных Т-хелперов составила 69% от уровня контроля, а содержание наивных ЦТЛ составило 76% от контроля ($p < 0,05$). Следовательно, наивные Т-клетки не восстановились даже через 60 суток

после введения ЦФ ($p < 0,05$ в сравнении с контролем).

Число Т-хелперов и ЦТЛ с фенотипом центральных Т-клеток памяти уменьшилось к 10-м суткам после введения ЦФ и было мини-

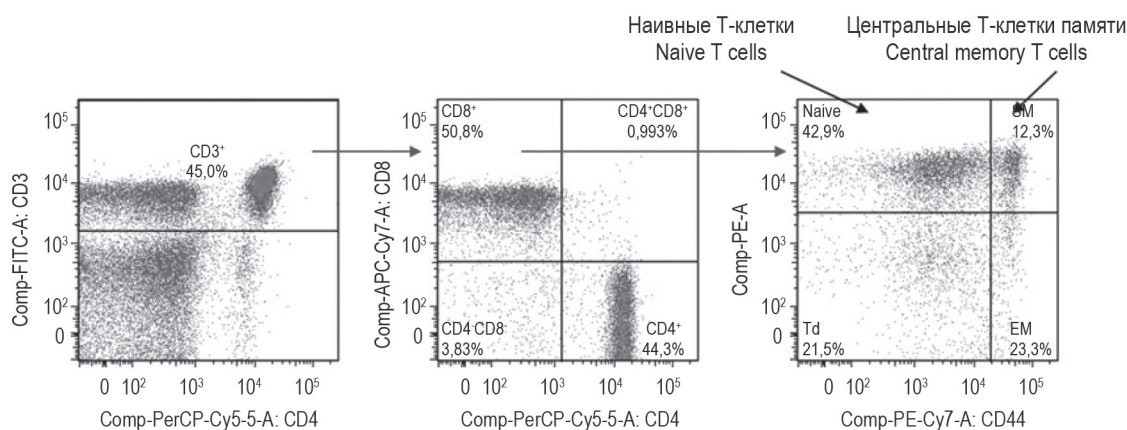


Рисунок 2. Алгоритм цитометрического определения субпопуляций наивных и центральных Т-клеток памяти на примере ЦТЛ селезенки интактной мыши линии C57BL/6

Примечание. Стрелками обозначены подмножества Tnaive и Tcm.

Figure 2. Algorithm for cytometric determination of naive and central memory T cell subpopulations using CTLs of the spleen of an intact C57BL/6 mouse as an example

Note. The subsets of Tnaive and Tcm are marked by a black arrow.

мальным на 20-е сутки: 54% от содержания в контроле для субпопуляции CD4⁺Tcm и 27% от контроля — для CD8⁺Tcm ($p < 0,05$). Следовательно, количество CD8⁺T-клеток Tcm уменьшилось в 3,6 раза, а CD4⁺T-клеток Tcm — в 2 раза.

К 30-му дню эксперимента количество клеток постепенно увеличивалось (табл. 2, рис. 3, 4).

К концу эксперимента (60-е сутки) количество клеток с фенотипом центральных Т-клеток памяти постепенно увеличивалось и стало статистически значимо превышать их содержание в контроле: содержание Tcm в субпопуляциях Т-хелперов

и ЦТЛ увеличилось в 2 раза для CD4⁺Tcm и в 1,2 раза для CD8⁺Tcm на фоне снижения числа наивных Т-клеток (табл. 2, рис. 3, 4).

На рисунке 5 представлено соотношение наивных и центральных Т-клеток памяти — Tnaive/Tcm. По графику видно преобладание Tcm. Соотношение Tnaive/Tcm у Т-хелперов снизилось с 23,6 (соотношение Tnaive/Tcm контрольных мышей) до 10,4 к концу эксперимента. У ЦТЛ соотношение между наивными и центральными Т-клетками памяти после введения ЦФ так-

ТАБЛИЦА 2. ЧИСЛЕННОСТЬ «ВОЗРАСТНЫХ» СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ХЕЛПЕРОВ (CD4⁺) И ЦТЛ (CD8⁺) МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6 ПОСЛЕ ОДНОКРАТНОГО ВВЕДЕНИЯ ЦИКЛОФОСФАНА, млн

TABLE 2. NUMBER OF "AGE" SUBPOPULATIONS OF T HELPER (CD4⁺) AND CTL (CD8⁺) C57BL/6 MICE AFTER A SINGLE INJECTION OF CYCLOPHOSPHAMIDE, mln

Сутки Days	CD4 ⁺ Tnaive	CD4 ⁺ Tcm	CD8 ⁺ Tnaive	CD8 ⁺ Tcm
0	20,33 (16,27-21,64)	0,79 (0,68-0,96)	15,45 (13,3-16,1)	3,44 (3,24-4,51)
5	25,27 (14,93-26,20)*	5,35 (3,63-7,30)*	19,84 (16,76-24,10)	11,95 (9,56-13,72)*
10	8,77* (7,18-9,81)	0,79 (0,65-0,94)	5,41* (4,31-5,59)	1,36* (1,17-1,36)
20	5,81* (5,18-5,97)	0,43* (0,38-0,46)	3,94* (3,85-4,12)	0,94* (0,92-1,21)
30	8,87* (7,70-8,93)	0,40* (0,40-0,59)	3,40* (3,35-3,95)	1,07* (0,64-1,08)
60	13,94* (9,10-15,38)	1,51* (0,84-1,59)	11,82* (7,55-12,01)	4,29 (3,18-5,07)*

Примечание. * — $p < 0,05$ в сравнении с контролем (0-е сутки).

Note. *, $p < 0.05$ in comparison with control (day 0).

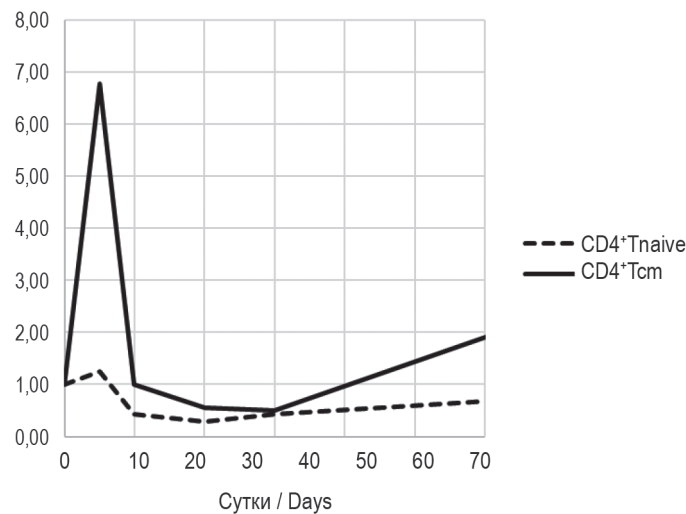


Рисунок 3. Динамика изменения численности «возрастных» субпопуляций Т-хелперов мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана

Примечание. По оси абсцисс отмечены сутки после введения ЦФ, по оси ординат – нормализованные данные по количеству клеток, где за 1 принято значение контроля. На 5-е сутки число Тcm значительно увеличивается, число Тnaive статистически значимо не меняется. Содержание Тcm уменьшается до 30-х суток и увеличивается к 60-м суткам, число Тnaive ниже содержания в контроле на протяжении 10-60 суток.

Figure 3. Dynamics of changes in the number of T helper “age” subpopulations of in C57BL/6 mice after a single injection of cyclophosphamide

Note. The abscissa shows the day after CP injection, the ordinate shows the normalized data of the cell number the control value taken as 1. The number of Tcm increases significantly, the number of Tnaive does not change on the 5th day. The number Tcm significantly decreases to 30 days, the Tnaive number is significantly lower compared to the control, and the Tcm number significantly increases by 60 days.

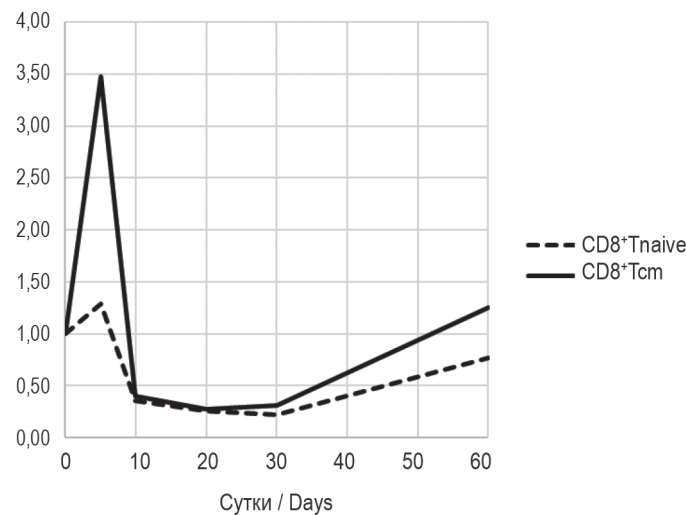


Рисунок 4. Динамика изменения численности «возрастных» субпопуляций ЦТЛ мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана

Примечание. По оси абсцисс отмечены сутки после введения ЦФ, по оси ординат – нормализованные данные по количеству клеток, где за 1 принято значение контроля. На 5-е сутки количество Тnaive и Тcm значительно увеличивается, к 30-м суткам – уменьшается. К 60-м суткам число Тnaive остается ниже содержания в контроле, а Тcm увеличивается, превышая уровень контроля.

Figure 4. Dynamics of changes in the number of CTL “age” subpopulations in C57BL/6 mice after a single injection of cyclophosphamide.

Note. The abscissa shows the day after CP injection, the ordinate shows the normalized data of the cell number with the control value taken as 1. The amount of Tnaive and Tcm significantly increases on the 5th day, it significantly decreases by the 30th day. The number of Tnaive keeps significantly lower compared to the control, and for Tcm it significantly increases by the 60th day.

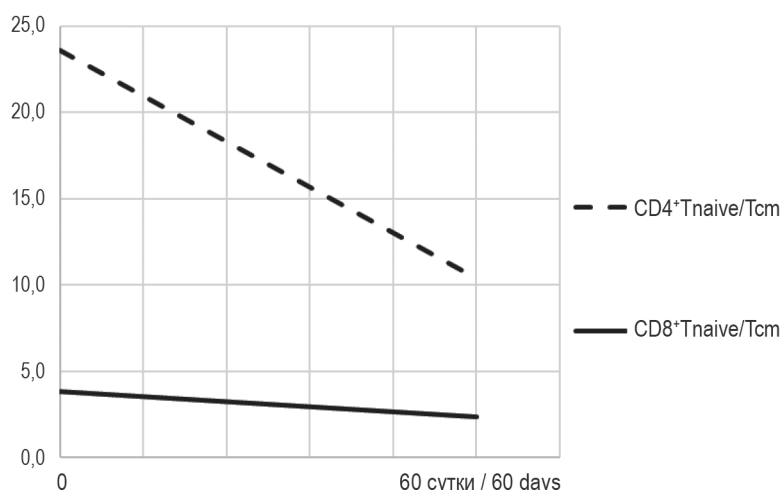


Рисунок 5. Изменение соотношения наивных и центральных Т-клеток памяти в субпопуляциях Т-хелперов (CD4⁺) и ЦТЛ (CD8⁺) в селезенке мышей линии C57BL/6 на 60-е сутки после однократного введения циклофосфана

Примечание. По оси абсцисс отмечены сутки после введения ЦФ, по оси ординат – соотношение Tnaive/Tcm. К 60-м суткам наблюдается снижение соотношения Tnaive/Tcm для обеих субпопуляций Т-клеток: в 2 раза для Т-хелперов и в 1,6 раза для ЦТЛ.

Figure 5. Changes in the ratio of naive and central memory T cells for T helpers (CD4⁺) and CTL (CD8⁺) in the spleen of C57BL/6 mice on day 60 after a single injection of cyclophosphamide

Note. The abscissa shows the days after CP injection, the ordinate shows the Tnaive/Tcm ratio. There is a decrease in the Tnaive/Tcm ratio for both subpopulations of T cells: a 2-fold decrease for T helpers and 1.6-fold for CTLs is registered by the 60th day.

же уменьшилось, но более плавно – с 3,9 до 2,4 (рис. 5).

Обсуждение

В данной работе мы наблюдали существенное увеличение численности общего числа спленоцитов, субпопуляций Т-хелперов и ЦТЛ в ранний период после введения ЦФ (5-е сутки). Этот процесс можно объяснить компенсаторным выбросом наивных клеток из тимуса в ответ на лимфопеническое состояние, вызванное действием ЦФ. В проведенном ранее исследовании было показано снижение соотношения CD4⁺/CD8⁺Т-клеток после введения ЦФ, в нашем исследовании мы наблюдали обратную картину: на 5-й день после введения ЦФ соотношение CD4⁺/CD8⁺Т-клеток увеличивалось с 1,05 (26,17/24,9) до 1,35 (61,81/45,67) [11].

В дальнейшем (до 20-х суток) отмечалось снижение числа спленоцитов, субпопуляций Т-хелперов и ЦТЛ: при этом количество ЦТЛ уменьшилось к 10-м суткам, а Т-хелперов – к 20-м суткам почти наполовину. В исследовании Motoyoshi Y. и соавт. было показано, что даже небольшая доза ЦФ (20 мг/кг) вызывает уменьшение числа спленоцитов на 50%, выбранная нами доза ЦФ (125 мг/кг) оказывает похожий эффект [16].

Начиная с 30-х суток после введения препарата в селезенке начинается процесс восстановления численности Т-лимфоцитов. При этом субпопуляция Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺Т-клеток)

восстанавливает свою численность до количества клеток в контрольной группе к 60-м суткам, а численность клеток субпопуляции ЦТЛ (CD3⁺CD8⁺Т-клеток) к этому времени остается ниже контрольных значений. Полученные данные показывают, что популяция ЦТЛ (CD3⁺CD8⁺Т-клетки) является более уязвимой к действию ЦФ.

При анализе восстановления «возрастных» субпопуляций Т-лимфоцитов (наивных Т-клеток и Т-клеток памяти), нами также было выявлено статистически значимое увеличение их численности в ранний период (на 5-е сутки). Исключение составила субпопуляция наивных Т-киллеров, увеличение которой не было статистически значимым. В дальнейшем (с 10-х суток) численность клеток во всех анализируемых субпопуляциях снизилась (кроме клеток субпопуляции CD4⁺Tcm). При этом уровень наивных CD4⁺Т-клеток был минимальным на 20-е сутки, а наивных CD8⁺Т-клеток – на 30-е сутки после введения ЦФ. Содержание клеток в этих субпопуляциях не достигало уровня контроля к 60-м суткам после действия ЦФ. Следовательно, наивные Т-клетки не восстановились даже через 2 месяца после введения цитостатика. Таким образом, они наиболее подвержены к токсическому действию циклофосфана по сравнению со зрелыми Т-клетками.

Число Т-хелперов и ЦТЛ с фенотипом центральных Т-клеток памяти также уменьшилось к 10-м суткам после введения ЦФ и было мини-

мальным на 20-е сутки, в дальнейшем их количество постепенно увеличивалось. В исследовании Hong S.H. и соавт. было выявлено увеличение числа CD44⁺Т-клеток (Т-клетки памяти) на 10-й день после введения ЦФ, нами же продемонстрировано, что численность субпопуляции CD8⁺Tcm на 10-е сутки уменьшается, а субпопуляции CD4⁺Tcm остается неизменной [10]. Различия результатов могут быть связаны с отсутствием разделения на субпопуляции в приведенной выше работе.

В исследовании, проведенном Włodarczyk M. и соавт. было показано, что ЦФ вызывает снижение только CD4⁺Tcm, но не CD8⁺Tcm, но не CD8⁺Т-клеток Tcm [22]. В нашей работе мы выявили уменьшение числа клеток с фенотипом центральных Т-клеток памяти обеих популяций, причем количество CD8⁺-клеток Tcm уменьшилось в 3,6 раза, а CD4⁺Т-клеток Tcm в 2 раза.

Через 2 месяца после действия ЦФ мы выявили постепенное увеличение численности клеток с фенотипом центральных Т-клеток памяти. Ряд исследований также подтверждает преобладание Tcm на фоне усиления ГП при восстановлении Т-клеток в случаях лимфопенических состояний [6, 15].

Преобладание клеток субпопуляции центральных Т-клеток памяти над наивными клетками говорит о конверсии фенотипа Т-лимфоцитов и значительном вкладе гомеостатической пролиферации в восстановление лимфоцитов. Можно предположить, что конверсия фенотипа происходит не очень активно в популяции ЦТЛ, либо наивные CD8⁺Т-клетки приобретают фенотип клеток памяти на ограниченный промежуток времени, а ГП CD4⁺Т-клеток идет более интенсивно по сравнению с CD8⁺Т-клетками.

Заключение

Таким образом, исследование восстановления Т-лимфоцитов селезенки после воздействия ци-

клофосфана показало существенный вклад гомеостатической пролиферации в восстановление численности Т-хелперов (CD4⁺) и ЦТЛ (CD8⁺) в селезенке мышей линии C57BL/6 после лимфопении, вызванной введением циклофосфана в терапевтической дозе 125 мг/кг. Было выявлено, что ЦТЛ менее устойчивы к действию ЦФ в терапевтической дозе по сравнению с Т-хелперами, причем их восстановления не происходило даже через 2 месяца после воздействия цитостатика. При оценке «возрастного» фенотипа Т-клеток было показано, что наивные Т-хелперы и наивные ЦТЛ наиболее подвержены действию ЦФ, они также не восстанавливались через 60 суток после его введения. В то же время число клеток с фенотипом центральных Т-клеток памяти преобладало к концу эксперимента: выявлена конверсия фенотипа Т-лимфоцитов с преобладанием клеток с фенотипом центральных Т-клеток памяти.

При назначении циклофосфана в терапевтических целях необходимо учитывать, что сохраняющаяся Т-клеточная лимфопения влечет за собой усиление гомеостатической пролиферации. Накопление клеток с фенотипом центральных клеток памяти, снижение содержания наивных Т-клеток с сужением репертуара Т-клеточных рецепторов приводит к преждевременному старению иммунной системы и возможному повышению риска развития аутоиммунных заболеваний.

Благодарности

Авторы выражают признательность ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, при финансовой поддержке которого была выполнена экспериментальная часть работы. Публикация подготовлена при поддержке Программы стратегического академического лидерства РУДН.

Список литературы / References

1. Гринько Е.К., Вериго К.С., Мухина Е.А., Шарова Н.И., Комогорова В.В., Литвина М.М., Марзанова С.Н., Донецкая А.Д., Митин А.Н. Динамика восстановления субпопуляций Т-лимфоцитов после действия различных повреждающих агентов // Иммунология, 2021. Т. 42, № 4. С. 346-355. [Grinko E.K., Verigo K.S., Mukhina E.A., Sharova N.I., Komogorova V.V., Litvina M.M., Marzanova S.N., Donetskova A.D., Mitin A.N. Dynamics of T-lymphocyte subpopulations' recovery after influence of various damaging agents. *Immunologiya = Immunologiya*, 2021, Vol. 42, no. 4, pp. 346-355. (In Russ.)]
2. Козлов В.А. Гомеостатическая пролиферация как основа неизбежного формирования тотального иммунодефицита // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 5. С. 403-408. Kozlov V.A. Homeostatic proliferation as a basis for the inevitable formation of total immunodeficiency. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 5, pp. 403-408. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-2014-5-403-408.
3. Шевырев Д.В., Терещенко В.П., Козлов В.А. Гомеостатическая пролиферация: от нормы к патологии // Российский иммунологический журнал, 2018. Т. 21, № 2. С. 91-105. [Shevyrev D.V., Tereshchenko V.P., Kozlov V.A. Homeostatic proliferation: from health to pathology. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018, Vol. 21, no. 2, pp. 91-105. (In Russ.)]
4. Boyman O., Letourneau S., Kreig C., Sprent J. Homeostatic proliferation and survival of naive and memory T cells. *Eur. J. Immunol.*, 2009, Vol. 39, no. 8, pp. 2088-2094.
5. Farber D.L., Yudanin N.A., Restifo N.P. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.*, 2014, Vol. 14, no. 1, pp. 24-35.

6. Goldrath A.W., Bogatzki L.Y., Bevan M.J. Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis driven proliferation. *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 192, no. 4, pp. 557-564.
7. Gudmundsdottir H., Turka L.A. A closer look at homeostatic proliferation of CD4⁺ T cells: costimulatory requirements and role in memory formation. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, no. 7, pp. 3699-3707.
8. Heninger A.K., Theil A., Petzold C., Huebel N., Kretschmer K., Bonifacio E., Monti P. IL-7 abrogates suppressive activity of human CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells and allows expansion of alloreactive and autoreactive T cells. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 189, no. 12, pp. 5649-5658.
9. Heylmann D., Bauer M., Becker H., van Gool S., Bacher N., Steinbrink K., Kaina B. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are sensitive to low dose cyclophosphamide: implications for the immune response. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 12, e83384. doi: 10.1371/journal.pone.0083384.
10. Hong S.H., Yoon I.H., Kim Y.H., Yang S.H., Park M.J., Nam H.Y., Kim B., Kim Y., Park C.S., Park C.G. High-dose cyclophosphamide-mediated anti-tumor effects by the superior expansion of CD44(high) cells after their selective depletion. *Immunobiology*, 2010, Vol. 215, no. 3, pp. 182-193.
11. Huyan X.H., Lin Y.P., Gao T., Chen R.Y., Fan Y.M. Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice. *Int. Immunopharmacol.*, 2011, Vol. 11, no. 9, pp. 1293-1297.
12. Kieper W.C., Burghardt J.T., Surt C.D. A role for TCR affinity in regulating naive T cell homeostasis. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 172, no. 1, pp. 40-44.
13. Kuwatani M., Ikarashi Y., Mineishi S., Asaka M., Wakasugi H. An irradiation-free nonmyeloablative bone marrow transplantation model – importance of the balance between donor T-cell number and the intensity of conditioning. *Transplantation*, 2005, Vol. 80, no. 9, pp. 1145-1152.
14. Lin J.X., Leonard W.J. The common cytokine receptor γ chain family of cytokines. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.*, 2018, Vol. 10, no. 9, a028449. doi: 10.1101/cshperspect.a028449.
15. Mackall C.L., Hakim F.T., Gress R.E. Restoration of T-cell homeostasis after T-cell depletion. *Semin. Immunol.*, 1997, Vol. 9, no. 6, pp. 339-346.
16. Motoyoshi Y., Kaminoda K., Saitoh O., Hamasaki K., Nakao K., Ishii N., Nagayama Y., Eguchi K. Different mechanisms for anti-tumor effects of low- and high-dose cyclophosphamide. *Oncol. Rep.*, 2006, Vol. 16, no. 1, pp. 141-146.
17. Nolz J.C., Richer M.J. Control of memory CD8⁺ T cell longevity and effector functions by IL-15. *Mol. Immunol.*, 2020, Vol. 117, pp. 180-188.
18. Prlic M., Blazar B.R., Khoruts A., Zell T., Jameson S.C. Homeostatic expansion occurs independently of costimulatory signals. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, no. 10, pp. 5664-5668.
19. Seddon B., Tomlinson P., Zamoyska R. Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4⁺ memory cells. *Nat. Immunol.*, 2003, Vol. 4, no. 7, pp. 680-686.
20. Tan J.T., Ernst B., Kieper W.C., LeRoy E., Sprent J., Surh C.D. Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8⁺ cells but are not required for memory phenotype CD4⁺ cells. *J. Exp. Med.*, 2002, Vol. 195, no. 12, pp. 1523-1532.
21. van Belle T.L., Dooms H., Boonefaes T., Wei X.Q., Leclercq G., Grooten J. IL-15 augments TCR-induced CD4⁺ T cell expansion *in vitro* by in-habiting the suppressive function of CD25^{high} CD4⁺ T cells. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 9, e45299. doi: 10.1371/journal.pone.0045299
22. Włodarczyk M., Ograczyk E., Kowalewicz-Kulbat M., Druszczyńska M., Rudnicka W., Fol M. Cyclophosphamide treatment on central and effector memory T Cells in Mice. *Int. J. Toxicol.*, 2018, Vol. 37, no. 5, pp. 373-382.
23. Yamaki S., Ine S., Kawabe T., Okuyama Y., Suzuki N., Soroosh P., Mousavi S.F., Nagashima H., Sun S.L., So T. OX40 and IL-7 play synergistic roles in the homeostatic proliferation of effector memory CD4⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.*, 2014, Vol. 44, no. 10, pp. 3015-3025.

Авторы:

Гринько Е.К. – младший научный сотрудник ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» ФМБА России; студентка ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия

Марзанова С.Н. – к.б.н., доцент ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия

Донецкова А.Д. – д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» ФМБА России; профессор ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ; профессор ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Authors:

Grinko E.K., Junior Research Associate, National Research Center – Institute of Immunology; Student, K. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russian Federation

Marzanova S.N., PhD (Biology), Associate Professor, K. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russian Federation

Donetskova A.D., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Research Associate, National Research Center – Institute of Immunology; Professor, N. Pirogov Russian National Research Medical University (Pirogov Medical University); Professor, Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russian Federation

Поступила 09.02.2022
Принята к печати 13.02.2022

Received 09.02.2022
Accepted 13.02.2022