

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ ПОСЛЕ ИНДУКЦИИ ЛИМФОПЕНИИ ЦИКЛОФОСФАНОМ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ НА МЫШАХ

Гринько Екатерина Константиновна

Студентка

*Московская государственная академия ветеринарной
медицины и биотехнологии-МВА имени К. И. Скрябина
г. Москва*

Марзанова Саида Нурбиевна

Кандидат биологических наук, доцент

*Московская государственная академия ветеринарной
медицины и биотехнологии-МВА имени К. И. Скрябина
г. Москва*

Донецкова Альмира Дмитриевна

Доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник, доцент

“Государственный научный центр “Институт иммунологии”

Федерального медико-биологического агентства,

Российский национальный исследовательский

медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России

г. Москва

RESEARCH OF RESTORATION PROCESSES AFTER INDUCTION OF LYMPHOPENIA BY CYCLOPHOSPHANE IN AN EXPERIMENTAL MODEL ON MOUSE

Grinko Ekaterina

Student

*Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education
“Moscow State Academy of Veterinary
Medicine and Biotechnology - MVA named after K.I. Skryabin”, Moscow*

Marzanova Saida

Candidate of Science, assistant professor

*Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education
“Moscow State Academy of Veterinary
Medicine and Biotechnology - MVA named after K.I. Skryabin”, Moscow*

Donetskova Almira

Doctor of Science, assistant professor

National Research Center – Institute of Immunology Federal

Medical-Biological Agency of Russia,

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

DOI: [10.31618/nas.2413-5291.2020.2.56.249](https://doi.org/10.31618/nas.2413-5291.2020.2.56.249)

Аннотация

Цель работы: оценка динамики восстановления Т-клеток после воздействия циклофосфана (ЦФ). ЦФ вводили в дозе 125 мг/кг с последующим забоем мышей на 0, 10, 20, 30, 60 сутки и определением субпопуляционного состава методом проточной цитометрии. Показано, что тимоциты более уязвимы к действию препарата, чем лимфоциты селезенки. Восстановительные процессы в тимусе начинаются раньше с последующим медленным восстановлением лимфоцитов селезенки. В результате действия ЦФ происходит усиление феномена конверсии фенотипа наивных Т-клеток в центральные Т-клетки памяти с относительным накоплением последних.

Abstract

Objective: to evaluate the dynamics of T-cell recovery after exposure to cyclophosphamide (CP). CP was injected at a dose of 125 mg/kg, followed by killing of mice on days 0, 10, 20, 30, 60 and determination of the subpopulation composition by flow cytometry. It was shown that thymocytes are more vulnerable to the action of the CP than spleen lymphocytes. Cell restoration in the thymus begins earlier with delayed recovery of spleen lymphocytes. Due to CP, there is an increase in the conversion of the naive T-cells into central memory T-cells with a relative accumulation of the latter.

Ключевые слова: циклофосфан; Т-лимфоциты; наивные Т-клетки; центральные Т-клетки памяти; конверсия фенотипа; проточная цитофлуориметрия.

Keywords: cyclophosphamide; T-lymphocytes; naïve T cells; central memory T cells; conversion of the phenotype; flow cytometry.

В течение жизни иммунная система подвергается воздействию различных факторов, которые могут вызывать ее угнетение [1, с. 18]. При прекращении действия повреждающего фактора обычно происходит восстановление иммунной системы. В организме существуют механизмы восстановления численности лимфоцитов, в частности Т-клеток: тимопоэза гомеостатическая пролиферация [5, с. 385-386].

Химиотерапевтические препараты, которые применяются в медицине, являются одним из факторов, вызывающих иммуносупрессию [2, с. 24]. Алкилирующие химиотерапевтические препараты повреждают генетический аппарат активно делящихся клеток, уменьшают количество иммунокомпетентных клеток в первичных и вторичных лимфоидных органах [3, с. 134]. Циклофосфамид, или циклофосфан – один из распространенных препаратов из группы алкилирующих агентов, который активно применяется в настоящее время.

Препарат имеет сложные пути превращения с участием НАДФ и оксидаз (цитохрома P450), алкогольдегидрогеназы и альдегиддегидрогеназы, в результате которых циклофосфан превращается в цитотоксичный фосфорамидный мустард и акролеин [4, с. 16-18][6, с. 731].

После воздействия цитостатика число Т-клеток восстанавливается за счет усиления тимопоэза в тимусе и за счет гомеостатической пролиферации в периферических лимфоидных органах. Оценка вклада каждого из этих механизмов в регенерацию Т-клеточного звена иммунной системы имеет важное значение как для понимания патогенеза этих состояний, так и для поиска адекватных методов их коррекции.

Цель исследования: оценить динамику восстановления Т-лимфоцитов после воздействия циклофосфана на мышах линии C57BL/6.

Материалы и методы.

Исследование проводилось на мышах линии C57BL/6, самках в возрасте 6-8 недель, полученных из питомника «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Москва). Мыши содержались в контролируемых условиях: температура окружающего воздуха $22 \pm 2^\circ\text{C}$; относительная влажность $65 \pm 5\%$. Доступ к воде и корму был свободным, световой режим естественным.

Животные были разделены на 2 группы: экспериментальной группе вводили препарат Циклофосфан-ЛЭНС внутривентриально в дозе 125 мг/кг, контрольной группе (8 мышей) циклофосфан не вводился. Мышей забивали 10, 20, 30 и 60 суток после введения препарата (по 5 мышей в каждой группе).

Вся работа с лабораторными животными проводилась в соответствии с 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».

Эвтаназия мышей осуществлялась методом цервикальной дислокации шейных позвонков. У мышей извлекали тимус и селезенку. Клеточную суспензию из органов готовили мягким раздавливанием в стеклянном гомогенизаторе. Количество клеток считали в камере Горяева, предварительно окрасив суспензию красителем генциановым фиолетовым.

В настоящем исследовании определяли общее содержание клеток, процент и абсолютное содержание Т-лимфоцитов (CD3^+) и их субпопуляций (Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов), «возрастной» фенотип Т-клеток (наивные Т-лимфоциты, центральные Т-клетки памяти) на проточном цитометре BD FACS Canto™ II (Becton Dickinson) в стандартном режиме с использованием моноклональных антител.

Моноклональные антитела фирмы «eBioscience» (США) (препараты для изотипических контролей той же фирмы) использовали в следующей комбинации:

1. Анти-CD3-FITC + анти-CD4-PerCP-Cy5.5 + анти-CD8-APC-eFluor780 + анти-CD44-PE-Cy7 + анти-CD62L-PE (селезенка);

2. Анти-CD3-FITC + анти-CD4-PerCP-Cy5.5 + анти-CD8-APC-eFluor780 + анти-CD44-PE-Cy7 + анти-CD25-APC (тимус).

Обработка результатов проводилась с использованием компьютерной программы Statistica 12.5 (StatSoft Inc., США), где использовали метод непараметрического анализа. Исследованные данные представляли в виде Me (L-N), где Me – медиана, L – нижний квартиль, N – верхний квартиль. Для сравнения данных с контролем применяли непараметрический U-критерий Манна-Уитни, при этом значимое различие между группами считали статистически значимым при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При исследовании общей численности клеток (рисунок 1, таблица 1) было показано, что тимоциты более чувствительны к токсическому действию циклофосфана: на 10 сутки их количество упало до 37 % от показателей интактного контроля. Восстановление содержания тимоцитов произошло к 20 суткам. Снижение лимфоцитов селезенки происходило более медленно: к 20 суткам их количество стало достоверно ниже показателей интактных мышей, достигнув 47 % от их уровня; восстановление лимфоидных элементов селезенки произошло лишь к 60 суткам после введения циклофосфана.

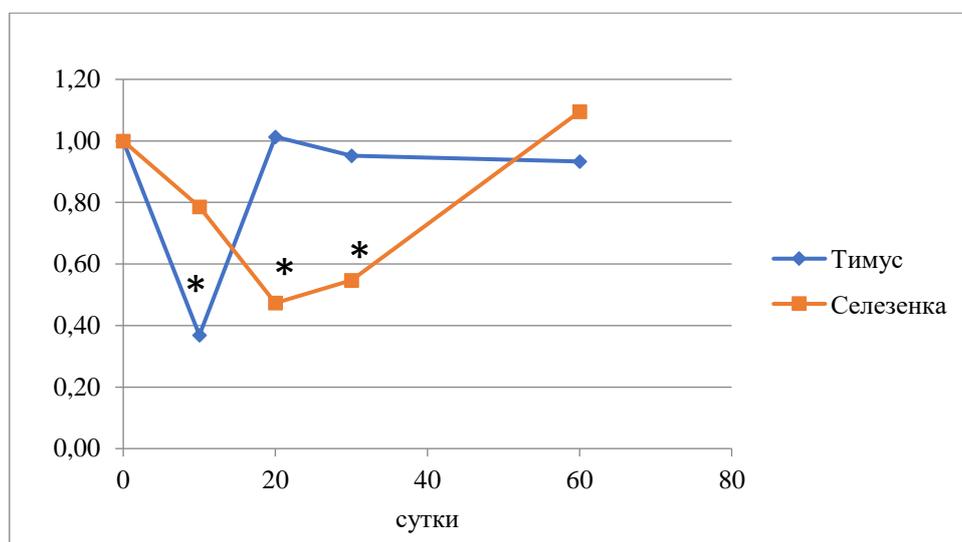


Рисунок 1 - Динамика изменения общей численности клеток тимуса и селезенки мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана (нормализованные относительно контроля данные).
*- обозначены достоверно различные значения

Таблица 1

Численность тимоцитов и лимфоцитов селезенки мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана, млн

Сутки	Тимоциты	Спленоциты	CD3 ⁺ CD4 ⁺ Т-хелперы	CD3 ⁺ CD8 ⁺ ЦТЛ
0	162,80 (142,30-183,00)	127,88 (118,5-139,5)	26,17 (23,93-29,41)	24,9 (24,38-26,26)
10	60,00* (57,00-66,00)	100,50 (91,00-100,50)	17,67 (14,39-20,19)	13,39 (12,55-13,58)*
20	165,00 (154,00-172,00)	60,50 (56,50-64,50)*	12,61 (12,17-13,29)*	6,55 (6,16-7,28)*
30	155,00 (155,00-159,00)	70,00 (62,50-71,25)*	16,34 (12,73-17,66)*	6,14 (6,13-6,60)*
60	152,00 (148,50-162,00)	140,00 (110,00-148,50)	27,37 (21,52-27,39)	18,97 (13,58-20,45)*

* – P < 0,05 в сравнении с контролем (0 сутки)

Таким образом, можно констатировать, что активно пролиферирующие тимоциты более чувствительны к действию циклофосфана по сравнению с лимфоцитами селезенки. Отсрочка восстановления спленоцитов, по-видимому, связана с лимфопозом, идущим в центральных органах иммунной системы.

Оценка восстановления периферических Т-клеток была выполнена отдельно для Т-хелперов (фенотип CD3⁺CD4⁺) и цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) (фенотип CD3⁺CD8⁺) в селезенке. После введения циклофосфана численность обеих субпопуляций стала постепенно снижаться (таблица 1, рисунок 2): численность

ЦТЛ уже на 10 сутки снизилась до 54 % от уровня интактного контроля; численность Т-хелперов достоверно снизилась только на 20 сутки, достигнув 48 % от уровня интактного контроля. С 30 суток, началось восстановление численности обеих субпопуляций, которое полностью завершилось для Т-хелперов на 60 сутки после введения цитостатика, тогда как ЦТЛ к этому времени не восстановили свою численность полностью, достигнув только 76 % от уровня интактного контроля. Можно констатировать, что ЦТЛ являются более уязвимой популяцией при назначении циклофосфана в терапевтических дозировках по сравнению с Т-хелперами.

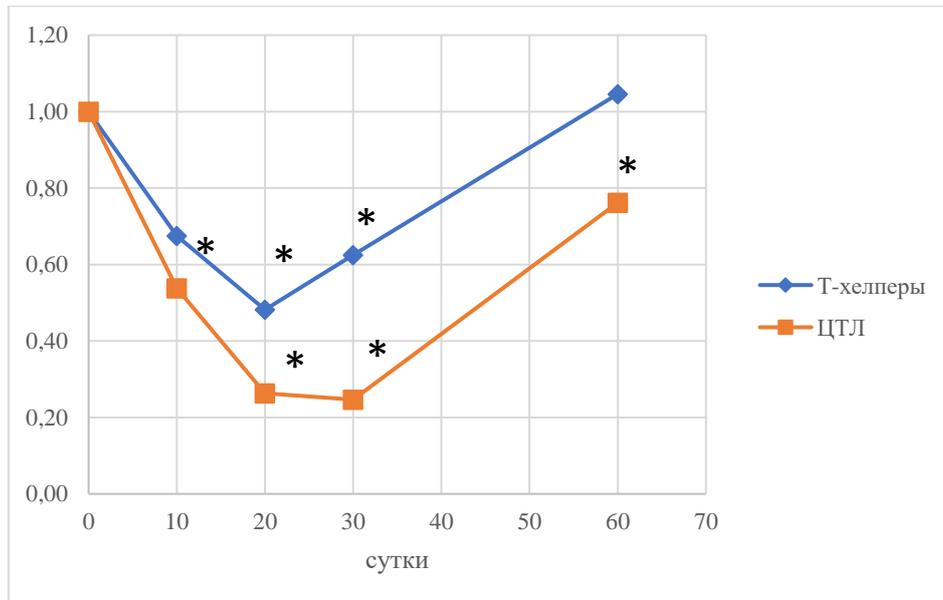


Рисунок 2 – Динамика изменения численности основных популяций лимфоцитов селезенки мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана (нормализованные данные)
*- обозначены достоверно различные значения

Существенным механизмом поддержания и восстановления численности периферических Т-клеток является гомеостатическая пролиферация, которая при значительном своем повышении в условиях Т-лимфопении ведет к конверсии фенотипа наивных Т-клеток. У мышей «возрастной» фенотип принято оценивать по коэкспрессии поверхностных маркеров – CD44 и CD62L. Наивные Т-клетки имеют фенотип CD62L⁺CD44^{lo/-}, а центральные Т-клетки памяти CD62L⁺CD44^{hi}. Оценив их соотношение, можно судить о вкладе тимопоэза и гомеостатической пролиферации в процесс восстановления популяций периферических Т-лимфоцитов.

Численность наивных Т-хелперов в нашем эксперименте снижалась вплоть до 20 суток, численность центральных Т-клеток памяти до 30 суток (таблица 4).

Дальнейшее восстановление численности «возрастных» субпопуляций Т-хелперов проходило с явным преобладанием центральных Т-клеток памяти, уровень которых на 60 сутки после введения препарата в 1,9 раза превышал уровень интактного контроля, тогда как численность наивных Т-хелперов не восстановилась к концу эксперимента.

Таблица 4

Численность «возрастных» субпопуляций Т-хелперов (CD4⁺) и ЦТЛ (CD8⁺) мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана, млн

сутки	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)
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* (7,7-8,93)	0,40* (0,4-0,59)	3,40* (3,35-3,95)	1,07* (0,64-1,08)
60	13,94* (9,1-15,38)	1,51 (0,84-1,59)	11,82* (7,55-12,01)	4,29 (3,18-5,07)

* – P < 0,05 в сравнении с контролем (0 сутки)

Tcm – центральные клетки памяти, Tnaive – наивные Т-клетки

При анализе «возрастных» субпопуляций ЦТЛ селезенки после введения циклофосфана тенденция к преобладанию лимфоцитов с фенотипом центральных Т-клеток памяти начинала проследиваться только в конце восстановления численности обеих субпопуляций – в период с 30

по 60 сутки после назначения циклофосфана (таблица 4).

Таким образом, анализ «возрастного» фенотипа периферических Т-клеток указывает, по-видимому, на существенный вклад гомеостатической пролиферации в восстановление

численности как Т-хелперов, так и ЦТЛ, с усилением феномена конверсии фенотипа наивных Т-клеток в центральные Т-клетки памяти и относительным накоплением последних.

Подводя итог проведенному исследованию, можно утверждать, что циклофосфан преимущественно поражает быстро делящиеся популяции тимоцитов. Восстановление Т-клеточного звена иммунной системы начинается с центральных лимфоидных органов – нормализации тимопоэза. Однако уровень повреждения периферических Т-клеток оказывается настолько глубоким, что восстановившийся к 20 суткам тимопоэз не способен компенсировать дефицит Т-клеточных популяций как минимум в течение 60 суток после введения циклофосфана. Сохраняющийся дефицит периферических Т-лимфоцитов ведет к усилению конверсии фенотипа наивных Т-клеток и накоплению Т-хелперов и ЦТЛ с фенотипом центральных Т-клеток памяти. Клональная экспансия периферических Т-клеток ведет к сужению репертуара Т-клеточных рецепторов, возможному накоплению аутоагрессивных клонов и преждевременному старению иммунной системы, что необходимо учитывать при назначении циклофосфана в терапевтических целях.

Список литературы:

1. Баторов Е.В. Влияние мезенхимальных стромальных клеток на иммунную реконституцию в посттрансплантационном периоде у больных лимфомами. Новосибирск, 2013. – 134 с.
2. Зассеева М.Д. Изменения гистологической структуры тимуса мыши и митотической активности тимоцитов в ходе акцидентальной трансформации и иммунного ответа. Санкт-Петербург, 2015. – 124 с.
3. Ильичев А.В., Лебединская Е.А., Фадеева Е.В., Лебединская О.В., Ахматова Н.К., Четвертных В.А., Годовалов А.П., Мелехин С.В., Киселевский М.В., Мальдов Д.Г.. Действие тимфорта на мононуклеарные лейкоциты и лимфоидные органы мышей на фоне введения циклофосфана. // Медицинская иммунология. – 2011. – Т. 13 (2). –133-138 С.
4. Телегин Л. Ю. Фармакогенетика циклофосфамида. — М.: ИНФРА-М, 2012. – 81 с.
5. Ярилин А.А. Иммунология: учебник / А.А. Ярилин. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. - 752 с.
6. Yoon T.D., Lee H.W., Kim Y.S., et al. Identification and analysis of expressed genes using a cDNA library from rat thymus during regeneration following cyclophosphamide-induced T cell depletion // Int J Mol Med. - 2013. – Voi. 31(3). – P. 731-739.