

*На правах рукописи*

**ЯКУШИНА**  
**Валентина Дмитриевна**

**РОЛЬ ГАЛЕКТИНА-1 В МЕХАНИЗМАХ ДИСРЕГУЛЯЦИИ  
АПОПТОЗА И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ CD4<sup>+</sup>-ЛИМФОЦИТОВ**

14.03.03 – патологическая физиология  
03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Томск – 2014

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук, профессор

Рязанцева Наталья  
Владимировна

академик РАН, доктор медицинских наук,  
профессор, заслуженный деятель науки РФ

Новицкий Вячеслав  
Викторович

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства Здравоохранения Российской Федерации

Салмина Алла  
Борисовна

доктор медицинских наук, руководитель лаборатории структурных основ патогенеза социально значимых заболеваний Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр клинической и экспериментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук

Потапова Оксана  
Валентиновна

**Ведущая организация:** Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Омская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «25» сентября 2014 г. в 11<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д208.096.01 при Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России и на сайте [www.ssmu.ru](http://www.ssmu.ru)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета



Петрова Ирина Викторовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Дисрегуляция процессов дифференцировки и апоптоза CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов является патогенетическим фактором многих социально значимых заболеваний. Известно, что ряд аутоиммунных и аллергических заболеваний ассоциированы с избыточной активностью Th1-, Th2-, Th17-лимфоцитов, а также недостаточностью Т-регуляторного звена [Dardalhon V. et al., 2008; Piccirillo C.A., 2010; Korn T. et al., 2010; Lin C.H. et al., 2013]. Вместе с тем предполагается, что иммуносупрессорная активность регуляторных Т-лимфоцитов способствует опухолевой прогрессии [von Boehmer H., 2005; Yamaguchi T. et al., 2006; Yaqub S. et al., 2008; Nishikawa H. et al., 2010]. В связи с этим изучение механизмов регуляции субпопуляционного баланса CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов необходимо для понимания молекулярных основ заболеваний, связанных с дисрегуляцией иммунитета, и разработки новых патогенетически обоснованных методов диагностики и таргетной терапии.

В последнее время среди прочих молекул кооперации клеток иммунной системы внимание исследователей обращено на белок галектин-1, секретируемый стромальными клетками тимуса, лимфоузлов, самими лимфоцитами, а также клетками некоторых типов опухолей [Dhirapong A. et al., 2009]. Предполагается, что, связываясь с гликопротеинами поверхности клеток врожденного и приобретенного иммунитета, галектин-1 выполняет противовоспалительные функции [Yang R.Y. et al., 2008]. Терапевтическое значение галектина-1 показано на экспериментальных моделях аутоиммунной патологии: аутоиммунной миастении Гравис, аутоиммунного энцефаломиелита, артрита, гепатита, болезни «трансплантат против хозяина», аутоиммунного увеита и диабета [Salatino M. et al., 2008]. С другой стороны, секреция галектина-1 опухолевыми клетками рассматривается в качестве возможного механизма опухолевой прогрессии [Rubinstein N. et al., 2004; He J., Baum L.G., 2006; Compagno D. et al., 2013].

Важной особенностью галектина-1 является его разнонаправленное действие на клетки в зависимости от их субпопуляционной принадлежности, стадии активации и наличия других костимулирующих сигналов. При этом представления о механизмах иммунорегуляторного действия галектина-1 находятся на стадии формирования. К настоящему времени проведены исследования влияния галектина-1 на миграционную активность и апоптоз нейтрофилов, активацию макрофагов и продукцию ими медиаторов воспаления, а также на активацию, пролиферацию, дифференцировку и гибель В-лимфоцитов в зависимости от функционального состояния [Paclik D. et al., 2011; Anginot A. et al., 2013; Auvynet C. et al., 2013; Tsai C.M. et al., 2014]. Кроме того, представлены данные, характеризующие особенности клональной селекции, пролиферации и апоптоза CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов под действием галектина-1 [Liu S.D. et al., 2008; Moreau A. et al., 2012]. CD4<sup>+</sup>-лимфоциты также рассматриваются в качестве мишени иммунорегуляторного действия галектина-1.

**Степень разработанности.** Роль галектина-1 в регуляции гомеостаза CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов на различных этапах иммунного ответа остается недостаточно изученной. Так, к настоящему времени не установлен факт влияния галектина-1 на апоптоз, дифференцировку и функциональную активность CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов. Идентификация патогенетического значения нарушения галектин-1-опосредованной регуляции баланса CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов при различных аутоиммунных заболеваниях позволит рассматривать данный белок в качестве возможного маркера диагностики и/или терапевтического агента.

**Цель исследования:** установить роль галектина-1 в механизмах дисрегуляции апоптоза и дифференцировки CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов.

**Задачи исследования:**

1. Установить закономерности влияния рекомбинантного галектина-1 на реализацию апоптоза CD3/CD28-активированных CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов *in vitro*.
2. Оценить вовлеченность митохондриального пути в реализацию апоптоза активированных лимфоцитов при действии рекомбинантного галектина-1 *in vitro*.
3. Оценить влияние галектина-1 на уровень экспрессии мРНК транскрипционных факторов дифференцировки CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов (Tbet, Gata-3, RORc, FoxP3) и продукцию профильных цитокинов (IFN $\gamma$ , IL-13, IL-17, IL-10) при CD3/CD28-активации клеток *in vitro*.
4. Оценить экспрессию галектина-1 при патологии, сопровождающейся дисрегуляцией дифференцировки CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов (на примере ревматоидного артрита).
5. Выявить особенности влияния рекомбинантного галектина-1 на субпопуляционный состав и иммуносупрессорную функцию регуляторных CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов *in vitro*.

**Научная новизна.** Получены новые данные о влиянии галектина-1 на апоптоз и дифференцировку CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов при действии на клетки в условиях активации через CD3 и CD28, а также на фенотип и функциональную активность регуляторных Т-лимфоцитов при действии на дифференцированные клетки.

Впервые в условиях *in vitro* показано, что действие галектина-1 в концентрациях от 2,5 до 4,0 мкг/мл на активированные CD4<sup>+</sup>-лимфоциты дозозависимо индуцирует митохондриальный путь апоптоза, что характеризуется деполяризацией митохондриальной мембраны, снижением количества антиапоптотического белка Bcl-2 и увеличением содержания проапоптотического белка Bax.

Впервые установлено, что действие галектина-1 *in vitro* на CD3/CD28-активированные CD4<sup>+</sup>-лимфоциты приводит к увеличению экспрессии мРНК транскрипционных факторов дифференцировки Th2-лимфоцитов (Gata-3) и регуляторных Т-лимфоцитов (FoxP3) на фоне снижения экспрессии мРНК транскрипционных факторов дифференцировки Th1-лимфоцитов (Tbet) и Th17-лимфоцитов (RORc). Новые данные, полученные в результате оценки экспрессии транскрипционных факторов, позволяют сделать заключение, что галектин-1 регулирует направление дифференцировки активированных CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов.

Впервые проведена оценка экспрессии гена галектина-1 у пациентов с ревматоидным артритом. Полученные данные позволяют сделать заключение о том, что сниженная экспрессия галектина-1 является одним из патогенетических факторов, обуславливающих дисрегуляцию апоптоза и дифференцировки CD4<sup>+</sup>-

лимфоцитов.

Впервые было проведено комплексное исследование иммунофенотипа и функциональной активности регуляторных Т-лимфоцитов при действии галектина-1 на предварительно дифференцированные клетки. Полученные в результате новые данные позволяют объяснить иммуносупрессорную функцию галектина-1 посредством поддержания фенотипа регуляторных Т-лимфоцитов и повышения их функциональной активности.

**Теоретическая и практическая значимость.** Результаты проведенного исследования *in vitro* раскрывают механизмы нарушения регуляции апоптоза и дифференцировки CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, опосредованной галектином-1. Полученные данные о способности галектина-1 в процессе активации через CD3 и CD28 индуцировать апоптоз CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов и направлять дифференцировку по пути Th2 и регуляторных Т-лимфоцитов, а также способствовать экспансии регуляторных Т-лимфоцитов при действии на дифференцированные клетки вносят вклад в понимание механизмов дисрегуляции апоптоза и дифференцировки CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов.

Идентификация патогенетического значения нарушения регуляции апоптоза и дифференцировки CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, опосредованной галектином-1, позволяет рассматривать данный процесс в качестве основы для разработки новых методов селективной коррекции иммунного ответа. При этом галектин-1 может выступать в качестве компонента терапии или диагностического маркера при аутоиммунных заболеваниях.

**Методология и методы исследования.** Экспериментальный блок исследований выполнен на мононуклеарных лейкоцитах относительно здоровых доноров, культивированных в условиях активации CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов (модель 1) и направленной дифференцировки в регуляторные Т-лимфоциты (модель 2). Объектом исследования экспрессии мРНК галектина-1 явились мононуклеарные лейкоциты относительно здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом.

В работе использованы высокоинформативные методы, выполненные на базе Научно-образовательного центра молекулярной медицины ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России и лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий инновационного парка Балтийского федерального университета им. И. Канта. Основные методы исследования:

1. Выделение и культивирование мононуклеарных лейкоцитов;
2. Оценка количества апоптотически измененных CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов по связыванию аннексина-V и 7AAD, количества лимфоцитов со сниженным трансмембранным потенциалом митохондрий, а также содержания лимфоцитов с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FoxP3<sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> – методом проточной цитофлуориметрии;
3. Определение внутриклеточного содержания белков Bcl-2, Вах, FoxP3 и перфорина методом вестерн-блоттинга;
4. Оценка экспрессии мРНК транскрипционных факторов дифференцировки CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов (Tbet, RORc, GATA-3, FoxP3) и мРНК галектина-1 методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени;
5. Оценка содержания цитокинов IFN $\gamma$ , IL-13, IL-17, IL-10 в культуральных средах мононуклеарных лейкоцитов методом иммуноферментного анализа;
6. Статистический анализ результатов.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Галектин-1 дозозависимо индуцирует митохондриальный путь апоптоза активированных CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов.

2. Галектин-1 регулирует направленность дифференцировки CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, повышая количество Th2 и регуляторных Т-клеток на фоне снижения количества Th1- и Th17-лимфоцитов.

3. Действие галектина-1 на дифференцированные регуляторные Т-лимфоциты приводит к экспансии иммуносупрессорных клеток, характеризующихся CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>-фенотипом и повышенным содержанием фактора FoxP3 и белка перфорина.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность результатов обеспечена достаточным объемом материала и использованием современных, высокоинформативных методов. Статистическая обработка результатов выполнена с помощью надлежащих методик доказательной медицины.

Результаты проведенных исследований докладывались и обсуждались на XIV Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей (с международным участием) «Фундаментальная наука и клиническая медицина - человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2011), 14-й межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Дни иммунологии в Сибири» (Абакан, 2011), международной конференции «Программируемая гибель клеток в биологии и медицине» (Москва, 2012), международной конференции студентов и молодых ученых «Дни биохимии в СПбГМУ 2012» (Россия, Санкт-Петербург, 2012), Всероссийской Итоговой студенческой научной конференции им. Н.И. Пирогова (Томск, 2012, 2013), международной конференции "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация" (Пушино, 2013). Кроме того, результаты исследования положены в основу проекта «Технология генерации регуляторных Т-лимфоцитов *in vitro* с помощью рекомбинантного галектина-1», занявшего II место на конкурсе аспирантов «От инновационной идеи – к медицинской разработке» (Томск, 2012). Научное исследование на тему «Влияние галектина-1 на дифференцировку CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов при аутоиммунных заболеваниях», выполненное в рамках диссертационной работы, было поддержано по итогам конкурса на получение стипендии Президента России (СП-208.2012.4 от 21.11.2012).

Исследования реализованы в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 годы» («Разработка технологических основ управления дифференцировкой, межклеточной кооперацией и программированной гибелью Th-лимфоцитов с использованием рекомбинантных галектинов» (ГК №16.740.11.0636); «Разработка технологической платформы молекулярной диагностики и лечения социально-значимых заболеваний и подготовка на ее основе научно-исследовательских кадров для молекулярной медицины» (ГК № 02.740.11.0311); «Разработка технологических основ действия мишень-направленных биологически активных молекул для коррекции нарушений пролиферации и программированной гибели опухолевых клеток» (ГК № 8302)). Кроме того, исследования были поддержаны Российским фондом фундаментальных исследований «Молекулярные механизмы регуляторного влияния галектинов на дифференцировку и функциональную

активность Th-лимфоцитов» (договор №12-04-31224 мол\_а) и Советом по грантам Президента РФ «Идентификация молекулярных мишеней регуляции апоптоза и дифференцировки клеток крови при патологии инфекционного и неинфекционного генеза» (№ 16.120.11.614-НШ).

**Личное участие автора.** Автор принимал непосредственное участие в планировании исследования и разработке его методических основ, анализе литературы. Автором проведены исследования, статистическая обработка полученных данных и интерпретация результатов.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 14 работ, из которых – 4 в центральных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК.

**Объем и структура работы.** Диссертация изложена на 154 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка литературы, включающего 288 источников, из них – 19 отечественных и 269 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 7 таблицами и 14 рисунками.

## ХАРАКТЕРИСТИКА МАТЕРИАЛА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В основу работы положены результаты комплексного обследования 65 человек (32 мужчин и 33 женщин, средний возраст  $28 \pm 5$  лет). Из них – 55 относительно здоровых доноров и 10 пациентов с ревматоидным артритом (2 мужчины, 8 женщин). Критериями исключения из исследования явились: возраст - менее 18 или более 50 лет; наличие в анамнезе фактов злоупотребления алкоголем, наркотической зависимости, психических расстройств; обострение хронических соматических заболеваний, наличие инфекционных болезней, период проведения противовирусной, иммуномодулирующей, а также иной фармакотерапии. Группу здоровых доноров составили 55 практически здоровых добровольцев (30 мужчин и 25 женщин), не страдавших аутоиммунными, аллергическими и онкологическими заболеваниями и не предъявлявших на момент обследования жалоб соматического характера.

У всех обследованных лиц было получено добровольное информированное согласие на проведение необходимых манипуляций (протокол заседания этического комитета ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России от 20.12.2010 г., регистрационный № 1791).

Материалом исследования явились мононуклеарные лейкоциты, полученные из крови у здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом. Взятие крови производилось утром натощак путем пунктирования локтевой вены с последующей стабилизацией КЗ-ЭДТА.

Для достижения поставленной цели в настоящей работе были выполнены экспериментальный и клинический блоки исследования.

Экспериментальный блок исследования был выполнен на мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров, культивированных в условиях активации  $CD4^+$ -лимфоцитов (модель 1) и дифференцировки в регуляторные Т-клетки (модель 2). Первая модель отражает процесс взаимодействия  $CD4^+$ -лимфоцитов с антиген-презентирующими клетками (суть данной модели заключается в активации клеток через CD3 и CD28). Вторая модель представляет собой культивирование лимфоцитов в течение 6 сут в условиях активации и направленной дифференцировки клеток в регуляторные Т-лимфоциты.

На клетках модели активации CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов было проведено исследование апоптоза и дифференцировки при действии галектина-1. Исследование апоптоза включало оценку количества апоптотически измененных CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, количества клеток с деполяризованной мембраной митохондрий, определение уровня антиапоптотического белка Bcl-2 и проапоптотического белка Bax. В качестве показателей направления дифференцировки CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов были определены экспрессия мРНК транскрипционных факторов дифференцировки и продукция цитокинов CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов.

Клетки, дифференцированные в регуляторные Т-лимфоциты, явились объектом исследования действия галектина-1 на фенотип регуляторных Т-лимфоцитов и их функциональную активность. Исследование фенотипа регуляторных Т-лимфоцитов включало оценку количества CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>-лимфоцитов. Анализ функциональной активности дифференцированных регуляторных Т-лимфоцитов основывался на определении содержания транскрипционного фактора FoxP3 и эффекторной молекулы перфорина в цельноклеточных лизатах.

Экспериментальный блок исследований выполнен на базе Научно-образовательного центра молекулярной медицины ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (научный руководитель – д-р мед. наук, профессор Рязанцева Н.В.).

В рамках выполнения клинического блока диссертационной работы была проведена оценка экспрессии мРНК галектина-1 в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом. В связи с этим было проведено обследование 10 пациентов (2 мужчин и 8 женщин, средний возраст 32±4 года) с ревматоидным артритом. Обследованные пациенты находились на лечении в Областной клинической больнице Калининградской области (главный врач - К.И. Поляков). Постановка диагноза ревматоидного артрита была выполнена согласно приказу №21 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным ревматоидным артритом» от 13 января 2006 г. Диагностические исследования включали опрос пациентов, рентгенографию, компьютерную и ЯМР-томографию суставов, выявление ревматоидного фактора и титра антител к циклическому цитрулин-содержащему пептиду, оценку скорости оседания эритроцитов и С-реактивного белка.

На основании оценки анамнеза болезни в исследование были включены пациенты, отвечающие следующим критериям:

- активность болезни – ремиссия (DAS28 (визуальный калькулятор оценки активности заболевания при ревматоидном артрите) < 2,6);
- ревматоидный фактор – серопозитивный;
- антитела к циклическому цитрулин-содержащему пептиду – серопозитивный;
- продолжительность заболевания – не более года с момента постановки диагноза.

Критерием исключения пациентов из исследования явилось прохождение медикаментозной терапии на момент взятия крови.

Исследования, проведенные в рамках клинического блока диссертационной работы, были выполнены на базе лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий инновационного парка Балтийского федерального университета



им. И. Канта (г. Калининград) (заведующая лабораторией – д-р мед. наук Л.С. Литвинова).

Мононуклеарные лейкоциты выделяли из цельной венозной крови, стабилизированной КЗ-ЭДТА, методом градиентного центрифугирования [Натвиг Дж. и соавт., 1980]. Венозную кровь в соотношении 2:1 наслаивали на градиент плотности Ficoll-Paque ( $\rho=1,077$  г/см<sup>3</sup>) («GE Healthcare», Швеция) и центрифугировали в течение 20 мин при 300g. Кольцо клеток, образованное на границе раздела фаз, переносили в чистую центрифужную пробирку, трижды отмывали средой RPMI-1640, последовательно ресуспендируя и центрифугируя каждый раз в течение 10 мин при 300g.

Полученные мононуклеарные лейкоциты стандартизировали до  $2,0 \cdot 10^6$ /мл, культивировали в полной питательной среде RPMI-1640 (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск) при 5% CO<sub>2</sub>, 37°C.

С целью активации лимфоцитов в культуральную среду сразу после выделения клеток добавляли анти-CD3 (1 мкг/мл) и анти-CD28 (2 мкг/мл) антитела (BD Pharmingen™, США).

Исследование апоптоза и дифференцировки CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов было выполнено на клетках, культивированных с добавлением рекомбинантной формы галектина-1 (RnDSystems, США) одновременно с активирующими антителами. Используемые концентрации галектина-1 представлены в таблице 1. Активность апоптоза была исследована при добавлении галектина-1 в диапазоне доз 0,1 – 4,0 мкг/мл. На основании результатов исследования содержания апоптотически измененных клеток для оценки влияния галектина-1 на дифференцировку CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов были выбраны следующие дозы рекомбинантного галектина-1: 1,0 мкг/мл - максимальная, не вызывающая гибель клеток концентрация, и 2,0 мкг/мл - пограничная с минимальной проапоптотической дозой. Контрольную группу составили клетки, культивированные в отсутствие галектина-1.

Для исследования дифференцировки CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов за 4 ч до окончания инкубации к клеткам добавляли ФМА (50 нг/мл) и кальция иономицин (1 мкг/мл).

Продолжительность культивирования клеток при исследовании апоптоза составила 18 ч, при исследовании дифференцировки клеток – 72 ч (таблица 1).

С целью генерации субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов в культуральную среду одновременно с активирующими антителами добавляли рекомбинантные цитокины IL-2 (10 нг/мл) и TGF- $\beta$ 1 (20 нг/мл) (RnDSystems, США). Подбор доз цитокинов был осуществлен в результате анализа фенотипа регуляторных Т-лимфоцитов, клеточности и жизнеспособности культуры при добавлении используемых цитокинов в различных комбинациях концентраций. Рекомбинантную форму галектина-1 (0,5 и 1,0 мкг/мл) добавляли одновременно с активирующими антителами и цитокинами, или через 72 ч от начала культивирования (таблица 1). Контрольную группу составили клетки, культивированные в отсутствие рекомбинантных цитокинов и галектина-1. Содержание FoxP3 и перфорина анализировали в клетках, культивированных с добавлением галектина-1 через 72 ч от начала культивирования. Общая продолжительность культивирования клеток составила 6 сут.

Условия культивирования мононуклеарных лейкоцитов

Условия культивирования				Оцениваемый показатель
Дополнительные компоненты среды	Время добавления галектина-1	Концентрация галектина-1, мкг/мл	Продолжительность культивирования	
<b>Модель активации лимфоцитов</b>				
Антитела к CD3 и CD28	Сразу после выделения	0,1-4,0	18 ч	Активность апоптоза
		2,5-4,0		Деполаризация митохондриальной мембраны
		3,5		Изменение содержания белков семейства Bcl-2
Антитела к CD3 и CD28, ФМА, иономицин	Сразу после выделения	0,1; 2,0	72 ч	Уровень экспрессии мРНК транскрипционных факторов
				Продукция цитокинов
<b>Модель дифференцировки в регуляторные Т-лимфоциты</b>				
Антитела к CD3 и CD28, IL-2, TGFβ1	Сразу после выделения	0,5; 1,0	6 сут	Фенотип регуляторных Т-лимфоцитов
	Через 72 часа	1,0		Фенотип регуляторных Т-лимфоцитов Внутриклеточное содержание FoxP3 и перфорина

Количество CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов в состоянии апоптоза идентифицировали методом проточной цитофлуориметрии по связыванию лимфоцитами, окрашенными анти-CD4-FITC антителами, аннексина-V, меченного фикоэритрином, и витального красителя 7-аминоактиномицина D (7AAD). Клетки дважды отмывали от культуральной среды фосфатно-солевым буфером, содержащим 2% ЭТС. 50 мкл клеток в количестве  $1 \times 10^5$ /мл переносили в пробирки для проточного цитометра, добавляли 5 мкл антител к CD4 (ООО «Сорбент»), конъюгированных с FITC, инкубировали 30 мин в темноте при +4°C. Отмывали клетки в холодном фосфатно-солевом буфере и ресуспендировали в 100 мкл  $1 \times \text{Ca}^{2+}$ -связывающего буфера (eBioscience, США). Затем добавляли 5 мкл Аннексин-V-PE и 5 мкл 7-AAD (eBioscience, США), осторожно перемешивали и инкубировали в течение 15 мин при 25°C в темноте. Добавляли по 400 мкл  $1 \times \text{Ca}^{2+}$ -связывающего буфера в каждую пробирку и проводили анализ на проточном цитофлуориметре FACSCanto™ II (BD, США) с использованием программного обеспечения FACSDiva Version 6.1.3.

Изменение трансмембранного потенциала митохондрий исследовали методом проточной цитометрии с помощью митохондриального зонда JC-1 (5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолилкарбоцианин йодид). В чистую полистероловую пробирку переносили 1 мл клеточной суспензии, содержащей  $1 \times 10^6$  кл/мл, и центрифугировали при 400g 5 мин при комнатной температуре. К клеточному осадку добавляли 0,5 мл свежеприготовленного раствора JC-1 (DePsipher™ Kit, Trevigen Inc., США). Клетки ресуспендировали и инкубировали

10-15 мин при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Затем клетки дважды отмывали буфером. Полученный осадок ресуспендировали в 0,5 мл отмывочного буфера. Полученные образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCanto™ II (BD, США) с использованием программного обеспечения FACSDiva Version 6.1.3.

Содержание белков Bcl-2, Bax, FoxP3 и перфорина определяли методом вестерн-блоттинга. Для этого белки клеточных лизатов разделяли по молекулярной массе методом электрофореза в 5%-ном концентрирующем полиакриламидном геле (0,13 мМ Tris-HCl, pH=6,8 («Helikon», США)) и 10%-ном разделяющем полиакриламидном геле (375 мМ Tris-HCl, pH=8,8 («Helikon», США)) под действием электрического поля (10 В/см пути). Разделенные по молекулярной массе белки электрофоретически переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США) при силе тока 45 мА. Затем нитроцеллюлозную мембрану блокировали 1% желатином с последующей инкубацией с первичными моноклональными антителами к искомому белку (Bcl-2, Bax, FoxP3, перфорин) («RnDSystems», США). После трех отмывок в TTBS на мембрану наносили вторичные антитела с пероксидазной меткой («RnDSystems», США) и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. По окончании инкубации мембрану трижды отмывали и производили детекцию белков путем добавления хемиллюминесцентного субстрата («Invitrogen», США). Вывод о содержании исследуемого белка делали по изменению отношения величины сигнала метки искомого белка к величине сигнала с фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа («Sigma», США), используя программное обеспечение TotalLab.

Экспрессию мРНК генов FOXP3, RORC, TBX21, GATA-3 определяли методом RT-PCR. Выделение РНК из мононуклеарных лейкоцитов осуществляли сорбентно-колоночным методом (RNeasy Plus Mini Kit, QIAGEN, Германия). ДНК синтезировали на матрице мРНК при участии обратной транскриптазы MMuLV-RT («Promega», США). Полученный фрагмент ДНК амплифицировали методом PCR в режиме реального времени с использованием SYBR Green I на амплификаторе Mini Opticon («Bio-Rad», США). Для нормализации начального количества мРНК в образце и эффективности обратной транскрипции измерялось количество кДНК гена β-актин, относительно равной степени экспрессирующихся во всех клетках. Относительное количество кДНК в образце рассчитывали по калибровочной кривой. Результаты выражали в условных единицах (относительное количество кДНК исследуемого гена к относительному количеству кДНК гена «домашнего хозяйства»).

Определение количества интерферона (IFN) γ и интерлейкинов (IL)-13, IL-10, IL-17A в культуральных супернатантах осуществляли методом твердофазного иммуоферментного анализа типа «сэндвич» согласно протоколам фирмы-производителя («RnDSystems», США).

Содержание T-reg-лимфоцитов определяли по связыванию антител к транскрипционному фактору FoxP3 человека, меченных PE; анти-CD25, меченных APC; и анти-CD4, меченных FITC (BD Pharmingen, США) [Быковская С.Н. и др., 2013]. В работе использовался набор буферов Human FoxP3 Buffer Set (BD Pharmingen, США).

Экспрессию мРНК галектина-1 определяли методом RT-PCR. Процедуру выделения РНК проводили сорбентно-колоночным методом с помощью набора

реактивов «Ахуреп multisource total RNA miniprep kit» (Eurogen) согласно протоколу производителя. ДНК синтезировали на матрице мРНК при участии обратной транскриптазы. Полученный фрагмент ДНК амплифицировали методом ПЦР в режиме реального времени с использованием SYBR Green I. Для нормализации начального количества мРНК в образце и эффективности обратной транскрипции измерялось количество кДНК гена  $\beta$ 2-микроактина. Для определения относительного количества кДНК в образце использовался критерий dCt. Результаты выражали в условных единицах (отношение числа циклов амплификации исследуемого гена к количеству циклов амплификации гена «домашнего хозяйства»).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы SPSS 16.0. Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Шапиро-Вилка. Для оценки достоверности различий зависимых выборок использовали непараметрический критерий Вилкоксона. Для оценки достоверности различий независимых выборок использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Различие двух сравниваемых величин считали достоверным при уровне значимости  $p < 0,05$ . Результаты выражали в виде медианы (Me), первого (Q1) и третьего (Q3) квартилей.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### *Влияние галектина-1 на апоптоз активированных CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов*

На первом этапе проведенного нами исследования на модели активации клеток (модель 1) была выполнена оценка влияния галектина-1 на апоптоз CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов. Данный этап включал определение количества апоптотически измененных CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов при добавлении рекомбинантной формы галектина-1 в дозах 0,1–4,0 мкг/мл одновременно с активирующими антителами. Добавление галектина-1 в дозе 2,5 мкг/мл значительно повышало ( $p < 0,05$ ) содержание CD4<sup>+</sup>Аннексин<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup> лимфоцитов, по сравнению со значением аналогичного показателя в контрольной группе. При этом дальнейшее увеличение дозы рекомбинантного белка сопровождалось увеличением значений данного показателя. Так в диапазоне доз галектина-1 1,0; 2,5; 3,5 и 4,0 мкг/мл количество CD4<sup>+</sup>Аннексин<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup> лимфоцитов достоверно ( $p < 0,05$ ) различалось в зависимости от добавляемой дозы (рисунок 1).

Полученные нами результаты свидетельствуют о проапоптотическом дозозависимом действии галектина-1, что подтверждается рядом работ, проведенных другими исследователями на Т-клетках человека, активированных с использованием фитогемагглютинаина и IL-2, Т-клетках линий СЕМ и MOLT-4, Jurkat и Т-клетках крыс [Hahn H.P. et al., 2004; Matarrese P. et al., 2005; Brandt B., 2010].

Вероятным механизмом индукции апоптоза под действием галектина-1 является запуск митохондриального пути. Для подтверждения данной гипотезы нами выполнена оценка деполяризации митохондриальной мембраны и содержания антиапоптотического белка Bcl-2 и проапоптотического белка Вах при добавлении галектина-1 в проапоптотических дозах одновременно с антителами к

CD3 и CD28 (модель 1). Было зарегистрировано достоверное увеличение ( $p < 0,05$ ) процента клеток с деполаризованной митохондриальной мембраной при действии галектина-1 в дозах 2,5; 3,5 и 4,0 мкг/мл, по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе. При этом значения анализируемого показателя достоверно ( $p < 0,05$ ) различались в зависимости от дозы рекомбинантного белка (таблица 2).

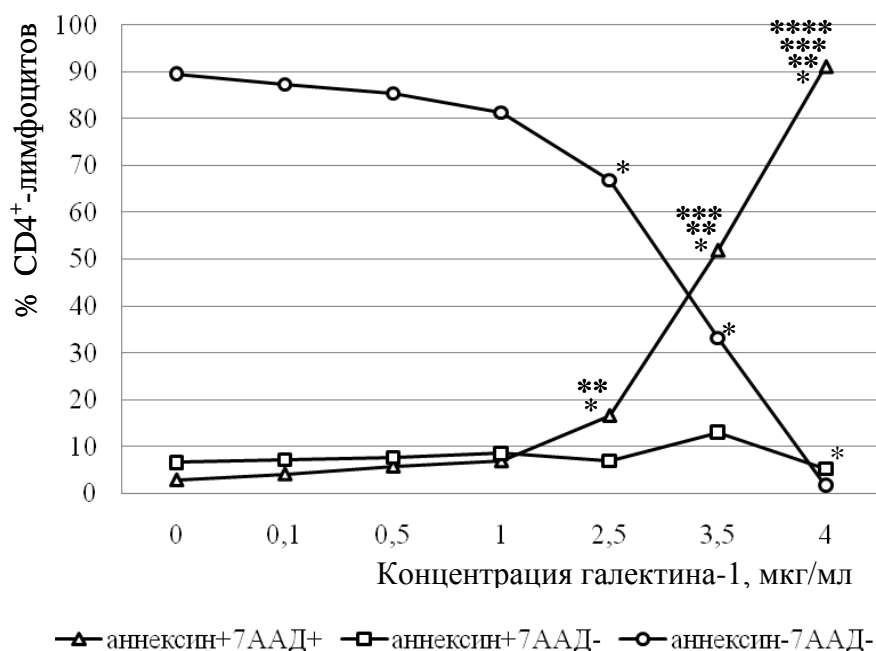


Рисунок 1. Содержание апоптотически измененных и жизнеспособных CD4+ лимфоцитов, активированных антителами к CD3 и CD28, в зависимости от концентрации рекомбинантного галектина-1 в культуральной среде: \* –  $p < 0,05$  по сравнению с аналогичными показателями в интактной культуре лимфоцитов; \*\* –  $p < 0,05$  по сравнению с аналогичными показателями, полученными при добавлении галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл; \*\*\* –  $p < 0,05$  по сравнению с аналогичными показателями, полученными при добавлении галектина-1 в дозе 2,5 мкг/мл; \*\*\*\* –  $p < 0,05$  по сравнению с аналогичными показателями, полученными при добавлении галектина-1 в дозе 3,5 мкг/мл

Добавление рекомбинантного галектина-1 в дозе 3,5 мкг/мл приводило к достоверному снижению ( $p < 0,05$ ) антиапоптотического белка Bcl-2 и повышению ( $p < 0,05$ ) - проапоптотического белка Вах (рисунок 2). Известно, что выявленные нами изменения соотношения антиапоптотических и проапоптотических белков приводят к повышению проницаемости митохондриальной мембраны с последующим выходом цитохрома с, необходимого для активации каспазы-9, а также AIF и эндонуклеазы G [Belizário J.E. et al., 2007]. Аналогичные результаты были получены В. Brandt et al. (2010), которые связали снижение экспрессии и фосфорилирование белка Bcl-2, увеличение экспрессии Ваd и активацию каспазы-9 и -3 при действии галектина-1 с его способностью индуцировать фосфорилирование МКК4, МКК7, JNK и c-Jun киназ, а также активировать транскрипционный фактор AP-1. Кроме того, используя линию клеток Jurkat 31-13 с дефектом CD3, авторы показали, что активация AP-1 и фрагментация ДНК, индуцированная галектином-1, запускаются через CD3 [Brandt В., 2010].

Количество лимфоцитов (%), окрашенных JC-1 в форме мономеров/агрегатов, при добавлении проапоптотических доз рекомбинантного галектина-1 в культуру клеток, активированных антителами к CD3 и CD28, *Me (Q<sub>1</sub> – Q<sub>3</sub>)*

Показатель	Концентрация $\gamma$ -галектина-1, (n = 15)			
	0,0 мкг/мл	2,5 мкг/мл	3,5 мкг/мл	4,0 мкг/мл
Лимфоциты, окрашенные JC-1-мономерами, %	12,55 (11,10–14,10)	27,00 (22,95–31,25) $p_1 < 0,05$	38,80 (35,75–42,98) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	49,10 (43,83–51,43) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
Лимфоциты, окрашенные JC-1-агрегатами, %	79,98 (72,40–87,00)	70,35 (66,15–74,70) $p_1 < 0,05$	58,6 (52,32–65,40) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	48,7 (42,20–51,60) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$

Примечание:  $p_1$  – уровень значимости различий, по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе;  $p_2$  – по сравнению с аналогичным показателем при добавлении галектина-1 в дозе 2,5 мкг/мл;  $p_3$  – по сравнению с аналогичным показателем при добавлении галектина-1 в дозе 3,5 мкг/мл

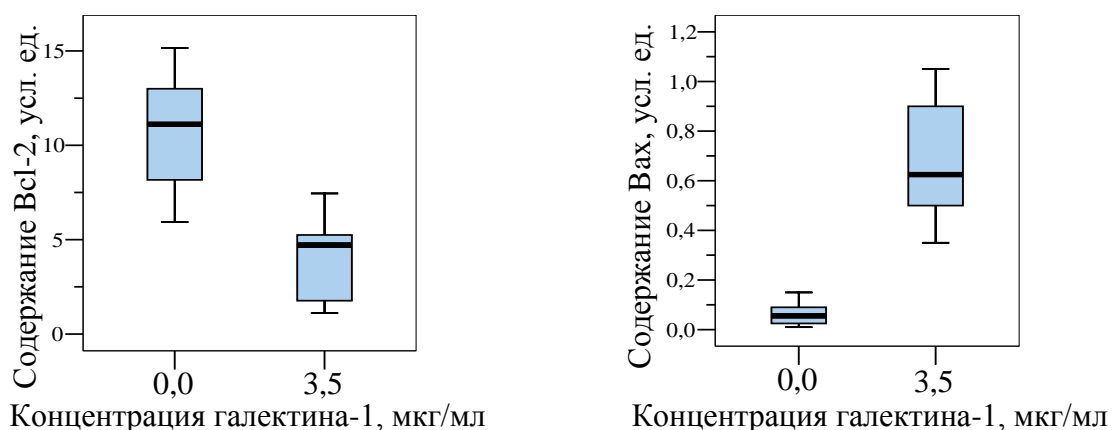


Рисунок 2. Внутриклеточное содержание антиапоптотического белка Bcl-2 и проапоптотического белка Bax в лизатах мононуклеарных лейкоцитов при действии *in vitro* рекомбинантного галектина-1 в условиях активации клеток с помощью антител к CD3 и CD28, *Me (Q<sub>1</sub> – Q<sub>3</sub>)*.

Примечание: здесь и на рисунках 3 – 6: — — медиана; ■ — 25–75% ( $Q_1$ – $Q_3$ ); I — максимум  
I — минимум

Таким образом, механизмы, задействованные в реализации индуцированного галектином-1 апоптоза, связаны с запуском митохондриального пути, что проявляется деполяризацией митохондриальной мембраны, снижением количества антиапоптотического белка Bcl-2 и увеличением проапоптотического белка Bax.

На основании исследования, проведенного на модели активации клеток *in vitro*, можно сделать вывод, что индукция митохондриального пути апоптоза в CD4<sup>+</sup>-лимфоцитах в процессе их активации через CD3 и CD28 является одним из механизмов иммуносупрессорного влияния галектина-1.

*Влияние галектина-1 на дифференцировку активированных  
CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов*

Для оценки влияния галектина-1 на направление дифференцировки CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов на модели активации клеток *in vitro* (модель 1) было проведено исследование экспрессии мРНК транскрипционных факторов Th1- (Tbet), Th2- (Gata-3), Th17-клеток (RORc) и регуляторных Т-лимфоцитов (FoxP3). Также была исследована продукция основных цитокинов, характерных для Th1-, Th2-, Th17- и регуляторных Т-лимфоцитов.

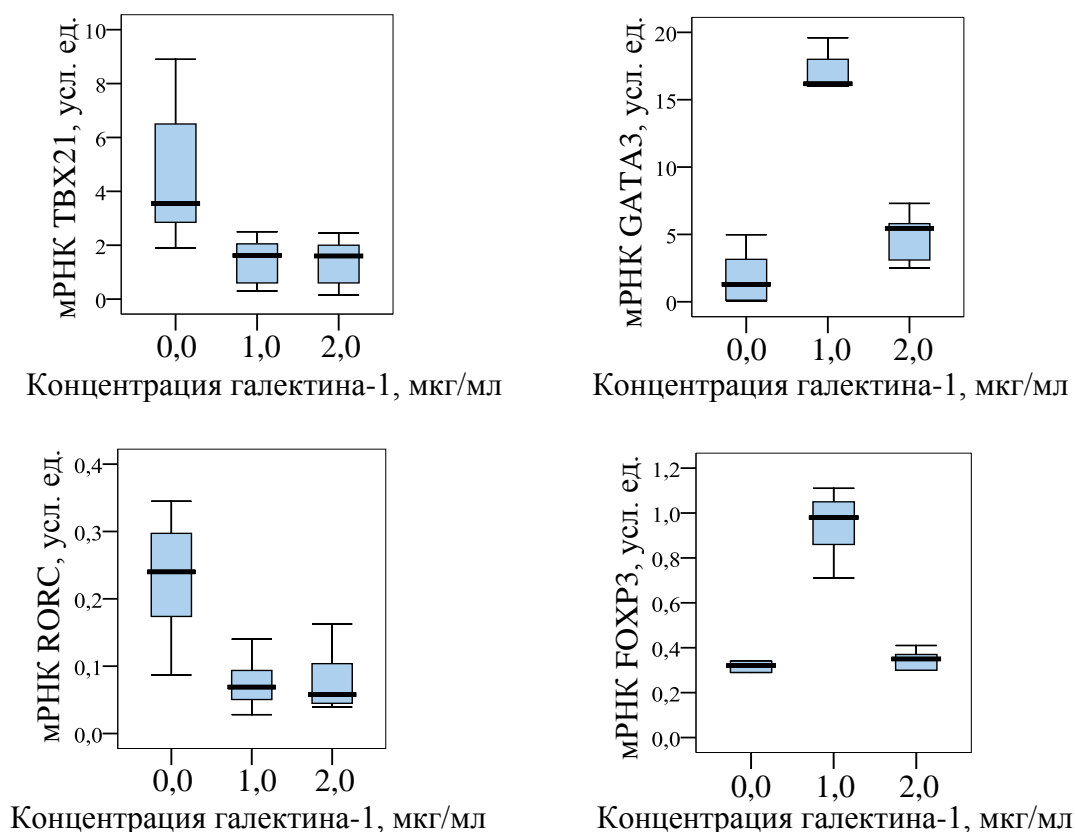


Рисунок 3. Уровень экспрессии мРНК транскрипционных факторов дифференцировки CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов в мононуклеарных клетках при действии рекомбинантного галектина-1 в условиях активации лимфоцитов антителами к CD3 и CD28, *Me* (Q<sub>1</sub>–Q<sub>3</sub>)

Добавление галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл приводило к значимому повышению ( $p < 0,05$ ) количества мРНК транскрипционных факторов Gata-3 и FoxP3 на фоне достоверного снижения ( $p < 0,05$ ) уровня мРНК Tbet и RORc (рисунок 3), по сравнению с аналогичными показателями в контрольной группе. Увеличение дозы галектина-1 до 2,0 мкг/мл сопровождалось достоверным снижением ( $p < 0,05$ ) количества мРНК Gata-3 и FoxP3, по сравнению с аналогичными показателями в культуре с добавлением галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл. Количество мРНК FoxP3 при этом значимо не отличалось от значения в контрольной группе ( $p \geq 0,05$ ), в то время как количество мРНК Gata-3 оставалось достоверно ( $p < 0,05$ ) более высоким, по сравнению со значением в контрольной группе. Количество мРНК Tbet и RORc при добавлении галектина-1 в дозе 2,0 мкг/мл оставалось на уровне данных показателей при действии галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл ( $p \geq 0,05$ ) и было достоверно ниже ( $p < 0,05$ ) аналогичных показателей в контрольной группе.

Выявленное неспецифическое снижение экспрессии мРНК транскрипционных

факторов в клетках, культивированных с добавлением галектина-1 в дозе 2 мкг/мл, вероятно, связано с гибелью клеток, так как данная доза была близка к проапоптотической (2,5 мкг/мл). Примечательно, что количество мРНК Gata-3, хотя и снижалось по сравнению с действием галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл, но было в 4 раза выше контрольных значений.

Исследование количества цитокинов в надосадочных фракциях клеток выявило достоверное повышение ( $p < 0,05$ ) продукции ИЛ-13 и отсутствие значимых изменений ( $p \geq 0,05$ ) количества ИFN- $\gamma$ , ИЛ-17 и ИЛ-10 при действии галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл, по сравнению с контрольной группой (рисунок 4).

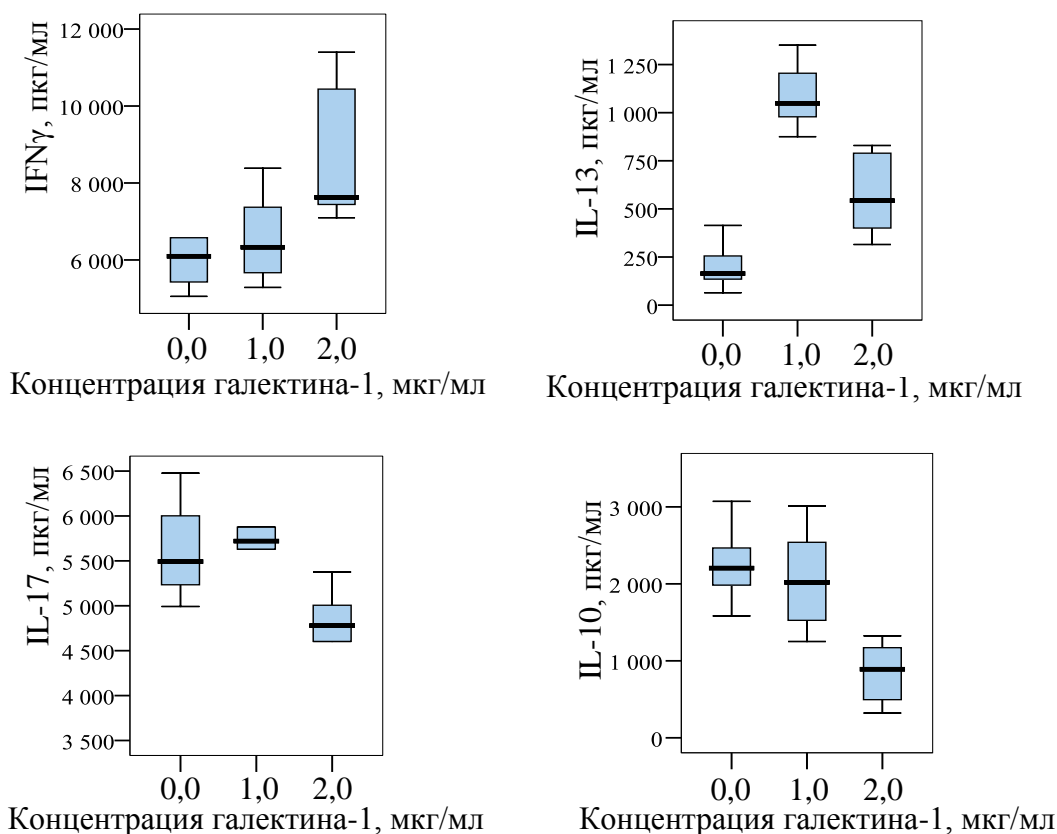


Рисунок 4. Содержание цитокинов в надосадочных фракциях культур клеток при действии рекомбинантного галектина-1 в условиях активации антителами к CD3 и CD28,  $Me (Q_1 - Q_3)$ .

При действии галектина-1 в дозе 2,0 мкг/мл количество ИЛ-13 достоверно снижалось ( $p < 0,05$ ), по сравнению со значениями данного показателя, полученными при действии галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл, оставаясь, при этом, достоверно выше данного показателя в контрольной группе. Количество ИFN- $\gamma$  достоверно повышалось ( $p < 0,05$ ) по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе и в группе с добавлением галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл. Содержание ИЛ-17 и ИЛ-10 при действии галектина-1 в дозе 2,0 мкг/мл было статистически значимо ниже ( $p < 0,05$ ) значения аналогичных показателей в контрольной группе и при добавлении галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл (рисунок 4).

Таким образом, установлено, что действие галектина-1 на CD4<sup>+</sup>-лимфоциты в процессе их активации в дозах ниже проапоптотической приводит к преобладанию дифференцировки в направлении Th2- и Treg-клеток.

На основании описанных выше результатов можно предположить, что недостаточность контроля, опосредованного галектином-1, является звеном патогенеза заболеваний, связанных с избыточной активностью Th1- и Th17-



лимфоцитов (например, ревматоидного артрита) [Gaffen S.L., 2009; Sarkar S. et al., 2010; Choу E., 2012]. Данное предположение подтверждается терапевтической эффективностью галектина-1, выявленной исследователями на экспериментальной модели ревматоидного артрита *in vivo* [Wang A.L. et al., 2010].

В результате исследования количества мРНК галектина-1 в мононуклеарных клетках было выявлено значимое снижение ( $p < 0,05$ ) экспрессии мРНК галектина-1 при ревматоидном артрите, по сравнению с аналогичным показателем у здоровых доноров (рисунок 5).

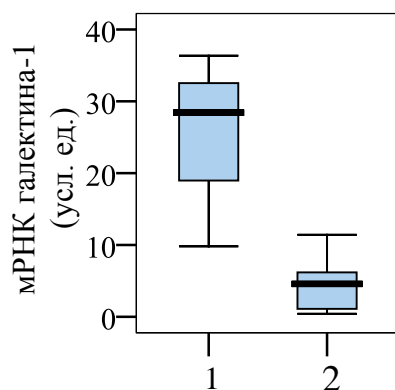


Рисунок 5. Количество мРНК галектина-1 в мононуклеарных клетках здоровых доноров (1) и пациентов с ревматоидным артритом (2)

Таким образом, сниженная экспрессия мРНК галектина-1, установленная нами при ревматоидном артрите, может являться причиной дисрегуляции дифференцировки  $CD4^+$ -лимфоцитов и неконтролируемой экспансии Th1- и Th17-лимфоцитов, что является патогенетическим звеном аутоиммунных заболеваний.

#### *Влияние галектина-1 на дифференцированные *in vitro* регуляторные $CD4^+$ -лимфоциты*

Иммунорегуляторное действие галектина-1 может также реализовываться на этапе дифференцированных  $CD4^+$ -лимфоцитов, особый интерес среди которых, на наш взгляд, представляют регуляторные Т-лимфоциты, являющиеся основными клетками, обеспечивающими «периферические» механизмы ауто толерантности.

Нами было проведено исследование влияния галектина-1 на фенотип и функциональную активность регуляторных Т-лимфоцитов (модель 2).

На 6 сут культивирования клеток в условиях направленной дифференцировки (добавление рекомбинантных IL-2 и TGF- $\beta$ 1) 59,70(49,10–61,20)% лимфоцитов характеризовались фенотипом  $CD4^+CD25^+FoxP3^-$ , 40,20(40,00–49,20)% – фенотипом  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  (таблицы 3, 4).

При добавлении галектина-1 одновременно с активирующими антителами и рекомбинантными цитокинами в дозах 0,5 и 1,0 мкг/мл количество  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  лимфоцитов составило 17,35(12,40–22,30)% и 13,35(8,50–15,60)%, соответственно, что было достоверно ниже ( $p < 0,05$ ) по сравнению с аналогичным показателем, полученным при добавлении рекомбинантных цитокинов без галектина-1 (таблица 3).

Добавление галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл через 72 ч от начала культивирования приводило к достоверному повышению ( $p < 0,05$ ) количества  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  лимфоцитов (59,10 (45,30–64,20)%) (таблица 4). При этом

введение в культуральную среду галектина-1 в дозе 0,5 мкг/мл не сопровождалось достоверным изменением ( $p \geq 0,05$ ) количества  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  лимфоцитов.

Таблица 3

Содержание субпопуляций  $CD4^+$ -лимфоцитов при добавлении в культуру клеток рекомбинантного галектина-1 одновременно с активирующими антителами,  $Me (Q_1-Q_3)$

Субпопуляции $CD4^+$ лимфоцитов на 6-е сут культивирования	Условия культивирования			
	антиCD3/CD28 антитела (контроль) (n = 15)	IL-2, TGF- $\beta_1$ , антиCD3/CD28 антитела (n = 15)	IL-2, TGF- $\beta_1$ , антиCD3/CD28 антитела, галектин-1 0,5 мкг/мл (n = 15)	IL-2, TGF- $\beta_1$ , антиCD3/CD28 антитела, галектин-1 1,0 мкг/мл (n = 15)
$CD25^-FoxP3^-$ , %	67,30 (57,30–74,60)	0,30 (0,10–1,70) $p_1 < 0,05$	4,70 (4,50–4,90) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	3,60 (3,40–3,60) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 \geq 0,05$
$CD25^+FoxP3^-$ , %	15,40 (8,40–21,70)	59,70 (49,10–61,20) $p_1 < 0,05$	77,90 (73,20–82,60) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	83,45 (80,80–87,90) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
$CD25^+FoxP3^+$ , %	17,30 (12,90–21,00)	40,20 (40,00–49,20) $p_1 < 0,05$	17,35 (12,40–22,30) $p_1 \geq 0,05$ $p_2 < 0,05$	13,35 (8,50–15,60) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$

Примечание: здесь и в таблица 4,  $p_1$  – уровень значимости различий показателей по сравнению с контрольной группой;  $p_2$  – по сравнению с клетками, культивированными с добавлением рекомбинантных цитокинов в отсутствие галектина-1;  $p_3$  – по сравнению с клетками, культивированными с добавлением рекомбинантных цитокинов и галектина-1 в дозе 0,5 мкг/мл.

Таблица 4

Содержание субпопуляций  $CD4^+$ -лимфоцитов при добавлении в культуру клеток рекомбинантного галектина-1 через 72 ч от начала культивирования,  $Me (Q_1 - Q_3)$

Субпопуляции $CD4^+$ лимфоцитов на 6-е сутки культивирования	Условия культивирования			
	антиCD3/CD28 антитела (контроль), (n=15)	IL-2, TGF- $\beta_1$ , антиCD3/CD28 антитела, (n=15)	IL-2, TGF- $\beta_1$ , антиCD3/CD28 антитела, галектин-1 0,5 мкг/мл (n=15)	IL-2, TGF- $\beta_1$ , антиCD3/CD28 антитела, галектин-1 1,0 мкг/мл (n=15)
$CD25^-FoxP3^-$ , %	67,30 (57,30–74,60)	0,30 (0,10–1,70) $p_1 < 0,05$	0,20 (0,10–1,80) $p_1 < 0,05$ $p_2 \geq 0,05$	0,30 (0,20–1,90) $p_1 < 0,05$ $p_2 \geq 0,05$ $p_3 \geq 0,05$
$CD25^+FoxP3^-$ , %	15,40 (8,40–21,70)	59,70 (49,10–61,20) $p_1 < 0,05$	54,60 (44,20–62,20) $p_1 < 0,05$ $p_2 \geq 0,05$	40,60 (33,90–54,60) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
$CD25^+FoxP3^+$ , %	17,30 (12,90–21,00)	40,20 (40,00–49,20) $p_1 < 0,05$	45,30 (37,70–54,00) $p_1 < 0,05$ $p_2 \geq 0,05$	59,10 (45,30–64,20) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$

Таким образом, добавление рекомбинантного галектина-1 одновременно с активирующими антителами ингибирует экспансию клеток с фенотипом

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>. Добавление галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл через 72 ч культивирования клеток повышает количество клеток с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>.

Для оценки влияния галектина-1 на функциональную активность регуляторных Т-лимфоцитов нами было исследовано содержание белков транскрипционного фактора FoxP3 и перфорина в клетках, культивированных в условиях направленной дифференцировки в регуляторные Т-лимфоциты, при добавлении галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл через 72 ч от начала культивирования.

Добавление галектина-1 достоверно повышало ( $p < 0,05$ ) количество белка транскрипционного фактора FoxP3 (0,68(0,62–0,92) усл. ед.) и перфорина (4,98(3,24–7,28) усл. ед.), по сравнению с аналогичными показателями в клетках, культивированных в условиях направленной дифференцировки без добавления галектина-1 (0,32(0,24–0,40) усл. ед. - для FoxP3; 3,13(2,21–4,67) усл. ед. - для перфорина) (рисунк 6).

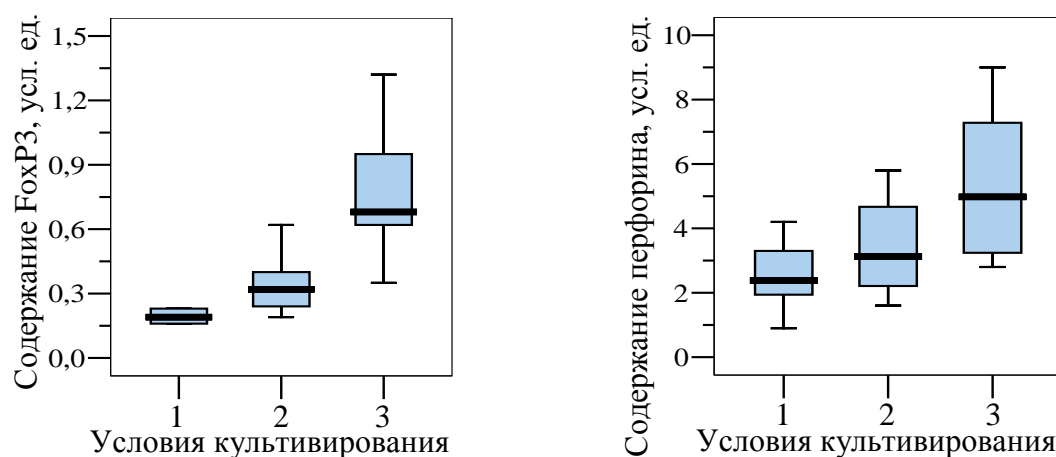


Рисунок 6. Внутриклеточное содержание транскрипционного фактора FoxP3 (а) и перфорина (б) в мононуклеарных клетках на 6-е сут культивирования. Примечание: 1 – добавление активирующих антител на 1-е сут культивирования; 2 – добавление активирующих антител и цитокинов (IL-2, TGFβ1) на 1-е сут культивирования; 3 – добавление активирующих антител и цитокинов (IL-2, TGFβ1) на 1-е сут культивирования, добавление рекомбинантного галектина-1 через 72 ч от начала культивирования

Увеличение внутриклеточного содержания белков FoxP3 и перфорина под действием галектина-1 является важным показателем влияния галектина-1 на функциональную активность регуляторных Т-лимфоцитов. Так, контактные механизмы супрессии активности эффекторных клеток характерны для FoxP3-экспрессирующих лимфоцитов. Перфорин обеспечивает пермеабиллизацию мембраны клеток-мишеней с последующим цитолизом или гранзиминдуированным апоптозом [Keefe D. et al., 2005; Cao X. et al., 2007].

Выявленные на модели *in vitro* повышение количества CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов, экспрессирующих FoxP3, увеличение количества транскрипционного фактора и продукции перфорина при действии галектина-1 на дифференцированные клетки свидетельствуют о том, что иммунорегуляторное действие данного представителя семейства лектинов включает поддержание регуляторного фенотипа и повышение функциональной активности уже дифференцированных CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее диссертационное исследование, основанное на моделях активации лимфоцитов и дифференцировки в регуляторные Т-клетки, созданных *in vitro*, было направлено на идентификацию механизмов регуляции баланса CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов при действии галектина-1.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что, действуя на CD4<sup>+</sup>-лимфоциты в процессе активации через CD3 и CD28, галектин-1 индуцирует митохондриальный путь реализации апоптоза и направляет дифференцировку клеток по пути Th2- и Treg-лимфоцитов (рисунок 7). Выявленные изменения направлений дифференцировки CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов при действии галектина-1 позволяют рассматривать эффекты данного белка не только с точки зрения иммуносупрессии. Так, на основании полученных *in vitro* результатов можно ожидать эффекторные реакции Th2-типа, т.е. запуск гуморального иммунного ответа, а также реципрокное подавление реакций Th1-типа в случае влияния галектина-1 на CD4<sup>+</sup>-лимфоциты в процессе распознавания антигена. Особое значение имеет выявленное потенцирующее влияние галектина-1 на регуляторное звено иммунного ответа, заключающееся в экспансии функционально активных экспрессирующих FoxP3 регуляторных CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, обеспечивающих поддержание аутоотолерантности.

Установленные в данной диссертационной работе особенности влияния галектина-1 на апоптоз и дифференцировку CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов могут иметь как физиологическое, так и патогенетическое значение. С одной стороны, индуцируя апоптоз и направляя дифференцировку CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов по пути Th2- и Treg-клеток, галектин-1 может обеспечивать ауторегуляцию, направленную на предотвращение избыточной активации иммунных реакций и защиту здоровых тканей от иммуно-опосредованного повреждения. Следуя данной логике, нарушения галектин-1-опосредованной регуляции баланса CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов могут представлять собой звено патогенеза аутоиммунных заболеваний. Причиной такой дисрегуляции может служить снижение экспрессии мРНК галектина-1, выявленное нами на примере ревматоидного артрита. Данное предположение подтверждается терапевтическим эффектом галектина-1, показанным на различных экспериментальных моделях заболеваний, имеющих аутоиммунный генез (миастения Гравис, энцефаломиелит, артрит, гепатит, болезнь трансплантат против хозяина, увеит и диабет). В связи с этим, генная или белковая, например в рекомбинантной форме, доставка галектина-1, а также использование его в культуральных условиях для получения регуляторных Т-лимфоцитов *in vitro* может рассматриваться в качестве основы для разработки новых подходов терапии аутоиммунных заболеваний.

С другой стороны, гибель CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, а также экспансия регуляторных Т-лимфоцитов при действии галектина-1, секретлируемого опухолевыми клетками и клетками опухолевого микроокружения, может способствовать опухолевой прогрессии в результате иммуносупрессии. Учитывая описанную в литературе способность опухолевых клеток различного происхождения (Ходжкинской лимфомы, гепатоцеллюлярной карциномы, рака молочной железы, желудка, легких и новообразований других локализаций) секретировать галектин-1, данный лектин может рассматриваться в качестве терапевтической мишени. В этом случае

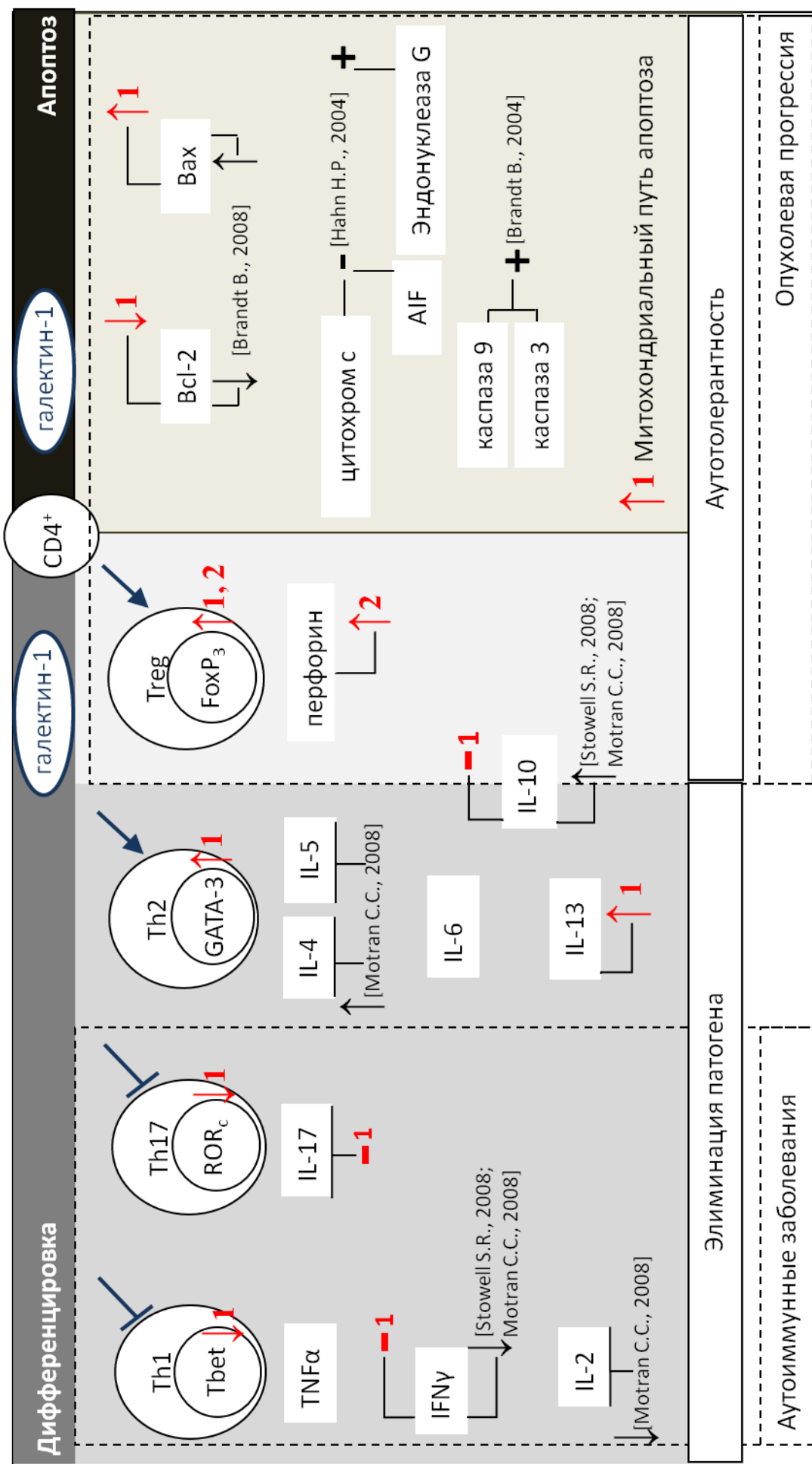


Рисунок 7. Влияние галектина-1 на дифференцировку и апоптоз CD4+-лимфоцитов по результатам собственных исследований (выделено красным цветом: 1 – результаты, полученные на модели активации лимфоцитов, 2 – результаты, полученные на модели клеток, дифференцированных в направлении регуляторных T-лимфоцитов), а также по данным литературы.

ингибирование галектина-1, например, с помощью антител или специфических ингибиторов, позволит предотвратить гибель CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, что является необходимым компонентом противоопухолевой терапии.

## ВЫВОДЫ

1. Галектин-1 оказывает дозозависимое действие на CD3/CD28-активированные лимфоциты, повышая содержание апоптотически измененных CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов при добавлении в культуральную среду в концентрациях от 2,5 до 4,0 мкг/мл.

2. Апоптоз активированных лимфоцитов, индуцированный галектином-1, реализуется через запуск митохондриального пути: действие рекомбинантного галектина-1 в проапоптотических дозах сопровождается деполяризацией митохондриальной мембраны, снижением количества антиапоптотического белка Bcl-2 и увеличением содержания проапоптотического белка Bax.

3. Галектин-1 при действии *in vitro* в дозе 1,0 мкг/мл на активированные CD4<sup>+</sup>-лимфоциты направляет дифференцировку клеток по пути Th2- и Treg-лимфоцитов, что проявляется повышением экспрессии мРНК транскрипционных факторов GATA-3 и FoxP3 и увеличением продукции IL-13 на фоне снижения содержания мРНК Tbet и RORc.

4. При патологии, характеризующейся дисрегуляцией дифференцировки CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов (на примере ревматоидного артрита), имеет место сниженная экспрессия мРНК галектина-1.

5. Действие *in vitro* галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл на дифференцированные регуляторные Т-лимфоциты приводит к экспансии клеток с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, а также увеличению внутриклеточного содержания фактора FoxP3 и цитолитического белка перфорина, определяющих иммуносупрессорные свойства данной субпопуляции клеток.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Роль галектина-1 в регуляции гомеостаза Т-лимфоцитов / Якушина В.Д., Васильева О.А., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Чечина О.Е., Прохоренко Т.С., Старикова Е.Г. // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2011. – Т.10, № 6. – С. 93-99.
2. Исследование механизмов модуляции апоптоза Т-лимфоцитов / Якушина В.Д., Белкина М.В., Марошкина А.Н., Кайгородова Е.В., Васильева О.А. // Сб. «Актуальные проблемы медицины»: материалы 14-й межрегиональной научно-практической конференции с международным участием. – Абакан: Издательство ГОУ ВПО «Хакасский государственный университет им. Н. Ф. Катанова», 2011. – С. 262–265.
3. Факторы, модулирующие апоптоз Т-лимфоцитов / Якушина В.Д., Белкина М.В., Марошкина А.Н., Кайгородова Е.В., Васильева О.А. // «Науки о человеке»: материалы XII Российского конгресса молодых ученых с международным участием. – Томск: СибГМУ. – 2011. – С. 75–76.
4. Изучение молекулярных механизмов управления апоптозом Т-лимфоцитов / Якушина В.Д., Белкина М.В., Марошкина А.Н., Кайгородова Е.В., Васильева О.А. // Сб. «Фундаментальная наука и клиническая медицина — Человек и его здоровье»: Тезисы XIV Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей (с международным участием). — СПб.: Изд-во СПбГУ, 2011. — С. 310–311.
5. Возможности использования галектина-3 в лабораторной диагностике / Васильева О.А., Якушина В.Д., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. // Клинико-лабораторный консилиум. – 2011. – Т.38, №2. – С. 12-16.

6. Галектин-1: роль в формировании особенностей врожденного и приобретенного иммунитета / Якушина В.Д., Васильева О.А., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Савельева О.Е., Прохоренко Т.С., Старикова Е.Г., Зима А.П. // **Медицинская иммунология**. – 2012. – Т.14, №1-2. – С. 21-32.
7. Оценка влияния галектина-1 на дифференцировку Т-регуляторных лимфоцитов *in vitro* / О.А. Васильева, В.Д. Якушина, Н.В. Андреева // «Медицина в XXI веке: традиции и перспективы» сборник трудов международной Интернет-Конференции, Казань, 12-15 марта 2012г. – С. 44-46.
8. Исследование влияния рекомбинантного галектина-1 на дифференцировку CD4+CD25+FoxP3+-лимфоцитов / О.А. Васильева, В.Д. Якушина, Н.В. Андреева // Бюллетень северного государственного медицинского университета, Архангельск. - 2012. – №1. – С. 138-139
9. Апоптоз регуляторных Т-лимфоцитов под действием галектина-1 / В.Д. Якушина, О.А. Васильева, И.С. Небесная, Т.Ю. Краснова // Дни биохимии в СПбГМУ: сборник тезисов международной конференции студентов и молодых ученых, посвященной 115-летию СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-петербург, 2-4 декабря 2012 г. – С. 69-70.
10. Влияние рекомбинантного галектина-1 на содержание транскрипционного фактора дифференцировки Т-регуляторных клеток *in vitro* / О.А. Васильева, В.Д. Якушина, Н.В. Андреева, И.С. Небесная, Т.Ю. Краснова // Дни биохимии в СПбГМУ: сборник тезисов международной конференции студентов и молодых ученых, посвященной 115-летию СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-петербург, 2-4 декабря 2012 г. – С. 12-13.
11. Apoptosis of regulatory T-cells under the treatment of galectin-1 / V.D. Yakushina, O.A. Vasil'eva, N.V. Andreeva, A.P. Zima, N.V. Ryazantseva // Программируемая гибель клеток в биологии и медицине: сборник тезисов, Москва, 4-5 июня 2012 г. – С. 66-67.
12. Регуляция экспрессии генов транскрипционных факторов дифференцировки Т-лимфоцитов CD4+ галектином-3 *in vitro* / Васильева О.А., Якушина В.Д., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Таширева Л.А., Старикова Е.Г., Зима А.П., Прохоренко Т.С., Краснова Т.Ю., Небесная И.С. // **Молекулярная биология**. – 2013 – Т.47, №6. – С. 1004–1010.
13. Влияние галектина-1 на апоптоз CD4+-лимфоцитов, дифференцированных *in vitro* в направлении регуляторных Т-клеток / Якушина В.Д., Васильева О.А., Новицкий В.В., Андреева Н.В., Старикова Е.Г., Таширева Л.А., Прохоренко Т.С., Зима А.П., Рязанцева Н.В. // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2013 – Т.156, №11– 616–619.
14. Апоптоз индуцирующее действие галектинов 1-го и 3-го типов на CD4+-лимфоциты *in vitro* / О.А. Васильева, В.Д. Якушина, А.П. Зима, И.С. Небесная, Т.Ю. Краснова // Российский иммунологический журнал. – 2013. – Т. 7 (16), № 2-3. – С. 138-139.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

7ААД – 7-аминоактиномицина D;	JS-1 – 5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолилкарбоцианин йодид;
АГ – антиген;	МНС – главный комплекс гистосовместимости;
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота;	РЕ – фикоэритрин;
ФМА – 4-форбол-12-миристан-13-ацетат	RT-PCR – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией;
ЭДТА – этилендиаминтетраацетат	TCR – Т-клеточный рецептор;
ЯМР – томография - магнитно-резонансная томография;	TGB – трис-глициновый буфер;
АРС – аллофикоцианин;	TGF-β1 – трансформирующий ростовой фактор, бета-1 (Transforming growth factor beta);
BCR – В-клеточный рецептор;	Th – Т-хелпер;
CD – кластер дифференцировки (cluster of differentiation);	TNFα – фактор некроза опухоли альфа;
FITC – флуоресцеин изотиоцианат;	Treg – регуляторные Т-лимфоциты;
GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа;	TTBS – раствор Трис буфера с Твин 20
IFNγ – интерферона-гамма;	
IL – интерлейкин;	