

*На правах рукописи*

**Меняйло Максим Евгеньевич**

**ИНТЕРЛЕЙКИН-8 В РЕГУЛЯЦИИ АДАПТИВНОГО  
ИММУНОГЕНЕЗА**

03.03.01 – физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Томск – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Селедцов Виктор Иванович

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук,  
профессор, член-корреспондент РАН,  
зам. директора по научной работе  
ФГУП «Гос. НИИ  
ОЧБ» ФМБА России

Симбирцев Андрей Семенович

доктор медицинских наук,  
профессор кафедры  
органической химии,  
ФГАОУ ВО «НИ ТГУ»

Чурина Елена Георгиевна

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения российской академии наук (г. Екатеринбург)

Защита состоится: «29» июня 2018 г. в 11:00 ч на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, г. Томск, Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России и на сайте <http://ssmu.ru>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Петрова Ирина Викторовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность темы исследования и степень ее разработанности**

Воспаление лежит в основе широкого спектра физиологических и патологических процессов, направленных на первичную элиминацию патогена и на восстановление гомеостаза организма (Medzhitov R., 2008; Черешнев А.А., 2001). Эффективность адаптивного иммунного ответа зависит от адекватной и своевременной реакции многокомпонентной иммунной системы организма на антиген (Charlin D.D., 2010). Цитокины и хемокины играют ключевую роль в автономном механизме регуляции, как воспаления, так и адаптивных иммунных процессов (Zhang J.M., An J., 2007). Интерлейкин-8 (IL-8) является ключевым хемокином, который индуцирует хемотаксис гранулоцитов, моноцитов/макрофагов (Мц/Мф) и лимфоцитов в очаг воспаления. IL-8 активирует гранулоциты и стимулирует их дегрануляцию, а также способствует выработке цитокинов мононуклеарными клетками (Zheng M. et al., 1998; Köhidai L., Csaba G., 1998; de Oliveira S. et al., 2013).

Иммунорегуляторная роль IL-8 не ограничивается стимуляцией миграции иммунокомпетентных клеток и активацией врожденных эффекторных иммунных функций. Есть основания предполагать, что IL-8 способен прямо влиять на функциональную активность Мц/Мф и Т-лимфоцитов, и, тем самым, оказывать значимое регуляторное воздействие на адаптивный иммуногенез не только на ранних, но и на поздних этапах его развития. Мц/Мф играют важную роль в инициации вторичных иммунных реакций. Анализ поверхностных маркеров CD119 (рецептор IFN- $\gamma$ ), CD124 (рецептор IL-4), CD197 на Мц/Мф дает возможность определить их активационный статус и направленность их функциональной активности. Хелперную направленность, силу и продолжительность антиген-индуцированных иммунных реакций определяют антиген-специфические Т-лимфоциты. Анализ экспрессии поверхностных маркеров CD45RA (общий лейкоцитарный антиген) и CD197 (С-С-рецептор хемокина 7) на Т-лимфоцитах позволяет выделить наивные Т-лимфоциты, Т-клетки памяти и эффекторные Т-клетки (Кудрявцев И. и др., 2014; Zhu J. et al., 2010). Экспрессия CD25 ( $\alpha$ -цепь рецептора IL-2) и CD38 (циклическая ADP рибозогидролаза) молекул характеризует активационный статус Т-клеток.

Большая значимость IL-8 в генерации воспаления вызывает живой интерес у многих исследователей. Однако, до сих пор, исследования были преимущественно сосредоточены на роли IL-8 в регуляции врожденного иммунитета. Предполагается, что IL-8 не только участвует в регуляции локальных и системных воспалительных иммунных реакций, но и может воздействовать на генерацию долговременной иммунной памяти, и, таким образом, играть значимую роль в адаптивном иммуногенезе. Это влияние может опосредоваться прямыми эффектами IL-8 как на моноцитарно/макрофагальные функции, так и на Т-клеточный иммуногенез. Подтверждению (или опровержению) этой закономерности и посвящена данная работа.

**Цель работы** - исследовать прямые эффекты IL-8 на активацию и функциональные свойства моноцитов/макрофагов и Т-лимфоцитов человека.

В соответствии с указанной целью решались следующие **задачи**:

1. Охарактеризовать прямые эффекты IL-8 на активационный статус моноцитов/макрофагов.
2. Оценить влияние IL-8 на моноцитарно/макрофагальную продукцию IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ .
3. Охарактеризовать экспрессию рецептора к IL-8 на покоещихся и активированных Т-клетках.
4. Исследовать прямые эффекты IL-8 на активацию Т-клеточных субпопуляций.
5. Оценить влияние IL-8 на продукцию Т-лимфоцитами провоспалительных (IFN- $\gamma$ , IL-2) и противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10).

**Научная новизна.** Впервые показано, что IL-8, добавленный в культуру Мц/Мф вместе с ЛПС способен заметно увеличивать среди активированных Мц/Мф количество клеток, экспрессирующих CD119 и снижать содержание клеток, экспрессирующих CD124. Представлены данные, свидетельствующие о том, что IL-8 может содействовать миграции вовлеченных в иммуногенез Мц/Мф в лимфоидные органы и, тем самым, способствовать генерализации и интенсификации адаптивных иммунных процессов. Впервые показано, что активация Т-лимфоцитов сопровождается приростом клеток, экспрессирующих рецептор IL-8 (CXCR1, CD181), среди наивных и терминально-дифференцированных CD4-позитивных (CD4<sup>+</sup>) Т-клеток и снижением таких клеток среди CD4-позитивных Т-лимфоцитов эффекторной памяти. Экзогенный IL-8 способен поддерживать жизнеспособность эффекторных CD4-позитивных и CD4-негативных (CD4<sup>-</sup>) Т-клеток и за счет этого снижать относительное количество наивных Т-лимфоцитов. Также впервые показана способность IL-8 избирательно снижать, оцениваемую по экспрессии CD25, активацию высокодифференцированных CD197-негативных Т-клеток, которые утратили способность мигрировать в лимфоидные органы и подвергаться там размножению. Установлено, что IL-8 усиливает продукцию активированными Т-клетками IL-2 и снижает секрецию IL-10.

**Теоретическая и практическая значимость.** Полученные фундаментальные данные впервые четко очерчивают значимость IL-8 в механизме регуляции адаптивного иммуногенеза. Показано, что IL-8 является как активатором эффекторных иммунных функций, так и, за счет прямого влияния на Мц/Мф и Т-клетки оказывает позитивное влияние на формирование иммунной памяти. С практической точки зрения, воздействия, направленные на модуляцию секреции или регуляцию биологической активности IL-8, могут найти применение в лечении широкого спектра заболеваний, в основе которых лежат иммунопатологические расстройства.

Результаты диссертационной работы используются в учебном процессе в центре медицинских биотехнологий БФУ им. И.Канта.

**Методология и методы исследования.** Согласно поставленным задачам, выбраны современные высокоинформативные методы исследования, которые позволяют детально охарактеризовать функциональное состояние иммунокомпетентных клеток. В качестве объекта исследования использовались первичные культуры Мц/Мф и Т-лимфоцитов, полученные из взвеси мононуклеарных клеток периферической венозной крови здоровых доноров.

Основные методы исследования:

1. Выделение МНК методом градиентного центрифугирования на фиколле.
2. Позитивная магнитная колоночная сепарация (получение CD14 и CD3-позитивных клеток из взвеси мононуклеарных клеток условно здорового донора).
3. Культуральные методы исследования.
4. Оценка жизнеспособности и функциональной активности клеток.
5. Определение мембранных маркеров (CD4, CD3, CD25, CD38, CD197, CD45RA, CD14, CD16, CD119, CD124) методом проточной цитофлуориметрии.
6. Оценка концентрации цитокинов (IL-10, IL-4, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) в супернатантах клеточных культур.
7. Статистический анализ результатов.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. IL-8 играет значимую роль в аутокринной и паракринной регуляции функциональной активности моноцитов/макрофагов. Он поддерживает провоспалительную (M1) активность Мц/Мф и их миграцию в лимфоидные органы.
2. IL-8 вовлечен в паракринную и аутокринную регуляцию ростовой, дифференцировочной и функциональной активности разных Т-клеточных субпопуляций. IL-8 препятствует развитию избыточных Т-клеточных реакций на периферии, а также содействует развитию адаптивных Т-клеточных процессов, формирующих иммунную память.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Высокая степень достоверности полученных результатов основывается достаточным объемом экспериментального материала, использованием современных методов (проточная цитофлуориметрия, иммуномагнитная сепарация, культуральные методы, иммуноферментный анализ) исследования и высокотехнологичного оборудования, а также адекватных критериев для статистической обработки результатов.

Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на XV Всероссийском научном форуме с международным участием им. Академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (г. Санкт-Петербург, 2015 г.); Всероссийской научно-практической школе-конференции «Аллергология и

клиническая иммунология (иммунодиагностика, иммунопрофилактика и иммунотерапия)» (г. Ялта, 2015 г.); I-м Калининградском научном иммунологическом форуме (г. Калининград, 2016 г.); Всероссийской научно-практической с международным участием конференции «Научные биомедицинские технологии: от фундаментальных исследований до внедрения» (г. Пермь, 2016 г.); VII Всероссийском симпозиуме с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии» (г. Астрахань, 2017 г.); XXIII съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (г. Воронеж, 2017 г.).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 14 научных работ, из них 5 полнотекстовых статей в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, определенных ВАК РФ и 9 статей и тезисов в материалах конференций и симпозиумов.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 115 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 67 рисунками и 3 таблицами. Библиографический указатель включает 234 источника (22 отечественных и 212 иностранных).

**Личный вклад автора.** Автор принимал непосредственное участие в разработке дизайна и планировании исследования. Результаты получены, проанализированы и обобщены в выводах и положениях автором лично.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материал и методы исследования

В основу работы положены результаты комплексного исследования 42 условно здоровых доноров (мужчин и женщин в возрасте от 21 до 40 лет). **Критериями исключения** из исследования являлись: возраст моложе 21 года и старше 40 лет; период обострения хронических воспалительных заболеваний; инфекционные, онкологические, аутоиммунные, наследственные и психические болезни; алкогольная и наркотическая зависимости. Материалом для исследования служила венозная кровь (20 мл), взятая стандартным методом из локтевой вены с помощью стандартных вакуумных систем «BD VACUTAINER™» («Greiner-bio-one», Австрия) с гепарином 20 Ед/мл. Разрешение на проведение исследования получено в локальном этическом комитете (№ 7 от 10 марта 2015 г.). Все экспериментальные исследования проводились на базе Центра медицинских биотехнологий БФУ им. И. Канта (руководитель-доктор медицинских наук, профессор, Селедцов В.И.).

Выделение мононуклеарных клеток (МНК) проводили посредством центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографин (Ficoll-Paque™ PREMIUM sterile solution, GE Healthcare, США), плотность  $1,077 \pm 0,001$  g/ml. Для получения монокультур CD14<sup>+</sup> или CD3<sup>+</sup> клеток из взвеси МНК, был использован метод позитивной колоночной иммуномагнитной сепарации, в основе которого лежит технология MACS (magnetic-activated cell sorting, «Miltenyi Biotec»,

Германия). Подсчёт клеток осуществляли на автоматическом счётчике частиц (Z2, Beckman coulter, США). Для определения чистоты выделенной популяции и её жизнеспособности, клетки инкубировали с флуорохром-конъюгированными АТ, специфичными к CD14 или CD3 (eBioscience, США) и раствором PI (пропидиум иодид) (eBioscience, США). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре (BD Accuri<sup>®</sup> C6 Flow Cytometer, BD Biosciences, США) с использованием программного обеспечения C6Flow Plus. Подсчет чистоты и оценку жизнеспособности CD14<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup> клеток проводили до и после культивирования.

Согласно поставленным целью и задачами был предложен алгоритм проведения экспериментального блока, который позволяет оценить роль IL-8 в регуляции адаптивного иммуногенеза. **Моноцитарно/макрофагальная** модель предназначена для исследования прямого влияния IL-8 на активацию и функциональные свойства Мц/Мф. **Т-клеточная модель** позволяет оценивать прямые эффекты IL-8 на активацию и функциональные свойства Т-лимфоцитов.

Полученные методом положительной селекции CD14<sup>+</sup> Мц/Мф помещали в 24-х луночный планшет в концентрации 1,0-1,5 x 10<sup>6</sup> кл/мл и культивировали в среде TechMACS (Miltenyi Biotec), содержащей 5,0 x 10<sup>-5</sup> М2-Меркаптоэтанола (Acros Organics, США) во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>, при 37°C в течение 24 часов. В качестве активатора Мц/Мф использовали бактериальный ЛПС из *Salmonella typhi* (Пирогенал, МЕДГАМАЛ ФНИЦЭМ им. Н.Ф. ГАМАЛЕИ, Россия) в концентрации 1 мкг/мл. Рекомбинантный IL-8 (Miltenyi Biotec) добавляли в пробы в концентрациях 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 нг/мл вместе с активатором. Использовали следующие варианты культивирования Мц/Мф:

- 1) клетки без активатора;
- 2) клетки без активатора + IL-8 (10,0 нг/мл);
- 3) клетки с активатором (ЛПС);
- 4) клетки с активатором + IL-8 (0,01 нг/мл);
- 5) клетки с активатором + IL-8 (0,1 нг/мл);
- 6) клетки с активатором + IL-8 (1,0 нг/мл);
- 7) клетки с активатором + IL-8 (10,0 нг/мл).

После культивирования, клетки использовали для цитометрического исследования, в супернатантах определяли содержание цитокинов. Эффекты IL-8 на активацию Мц/Мф оценивали по изменению количества клеток, экспрессирующих маркеры CD14, CD16, CD119, CD124, CD197. Для проточной цитометрии применяли АТ, конъюгированные с флуоресцентными метками: CD14-PerCP (eBioscience, США), CD16-FITC, CD119-PE, CD124-APC и CD197-PE/AF488 (BioLegend, США). Настройку цветовой компенсации проводили с помощью одноцветных контролей. Для выставления границ зоны позитива и учета неспецифического связывания использовали неокрашенный контроль и изотип контроля (Iso IgG2a, κ - APC, PE, AF488 и Iso IgG1, κ - PE, BioLegend, США). Результаты оценивали на проточном цитофлуориметре (Accuri C6, BD Biosciences, США). Анализ полученных данных проводили в программе CSampler Software (BD Biosciences, США).

Выделенные CD3<sup>+</sup> Т-клетки культивировали в 24-луночных планшетах (объем клеток 1 мл, концентрация 1,0-1,5 x 10<sup>6</sup> кл/мл) в бессывороточной среде TexMACS (Miltenyi Biotec, Германия), содержащей 5,0 x 10<sup>-5</sup> М2-Меркаптоэтанола (Acros Organics, США), в течение 48 часов во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>, при 37°C. Для активации Т-клеток использовали частицы, конъюгированные с человеческими антителами к CD2/CD3/CD28 (T Cell Activation/Expansion Kit, MACS Miltenyi Biotec, Германия). Рекомбинантный IL-8 (Miltenyi Biotec) добавляли в клеточные пробы в концентрациях 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 нг/мл вместе с активатором. Были использованы следующие варианты культивирования Т-лимфоцитов:

- 1) клетки без активатора;
- 2) клетки без активатора + IL-8 (10,0 нг/мл);
- 3) клетки с активатором (анти-CD2/CD3/CD28);
- 4) клетки с активатором + IL-8 (0,01 нг/мл);
- 5) клетки с активатором + IL-8 (0,1 нг/мл);
- 6) клетки с активатором + IL-8 (1,0 нг/мл);
- 7) клетки с активатором + IL-8 (10,0 нг/мл).

После 48-часового культивирования, получившийся надосадок отбирали для последующего определения содержания цитокинов методом иммуноферментного анализа. Клетки после отмывки обрабатывали мечеными флуорохромами антителами и анализировали экспрессию мембранных молекул методом проточной цитофлуориметрии. Для идентификации мембранных молекул на Т-лимфоцитах использовали коктейль АТ, конъюгированных с флуоресцентной меткой: анти-CD4-PerCP, анти-CD181-FITC (eBioscience, США), анти-CD197-PE, анти-CD45RA-APC (BD Pharmingen, США), анти-CD25-FITC и анти-CD38-AF488 (BioLegend, США). Все манипуляции проводили согласно инструкциям производителей. Для выставления границ зоны позитива использовали неокрашенные контроли. Для повышения точности и учета неспецифического связывания антител при гейтировании использовали изотип-контроли (ISO MOPC-21 IgG1, κ; ISO MPC-11, IgG2b, κ) и FMO-контроли (Fluorescence minus one). Результаты оценивали на проточном цитофлуориметре (Accuri C6, BD Biosciences, США). Анализ полученных данных проводили в программе CSampler Software (BD Biosciences, США).

Для определения концентраций исследуемых цитокинов в культурах CD14<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup> клеток использовали метод твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с применением наборов с адсорбированными в ячейках планшета антителами к IL-10, IL-6, IL-1β, TNF-α (при анализе CD14<sup>+</sup> клеток) и IL-2, IFN-γ, IL-4, IL-10 (при анализе CD3<sup>+</sup> клеток) («Вектор Бест» Россия). Выполнение ИФА осуществляли на автоматическом иммуноферментном анализаторе («ChemWell 2910», Awareness Technology, inc., США). Настройку программы для проведения ИФА составляли, основываясь на алгоритме, предложенным производителем тест систем.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences, США). Оценку



полученных результатов проводили методами статистического описания и проверки статистических гипотез. Анализ выборки проводили на основе гипотезы нормальности распределения (Колмогорова-Смирнова). В качестве средневыборочной характеристики использовали медиану (M), первый и третий квартили ( $Q_1$ - $Q_3$ ). Для оценки статистической достоверности исследуемых выборок использовали непараметрический критерий Вилкоксона для зависимых выборок, не подчиняющихся нормальному закону распределения. Различия между выборками считались значимыми при уровне  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Влияние IL-8 на функциональные свойства моноцитов/макрофагов

На рисунке 1 представлена использованная стратегия гейтирования Мц/Мф.

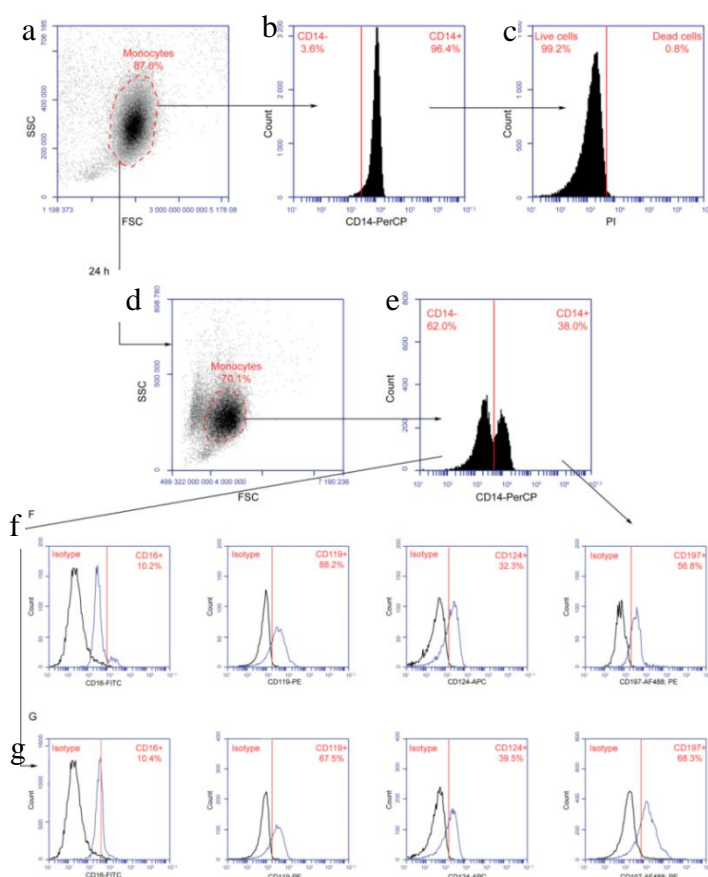


Рисунок 1 – Алгоритм цитометрического анализа Мц/Мф:

- распределение клеток по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию до инкубации;
- содержание  $CD14^+$  клеток до инкубации;
- жизнеспособность клеток, определяемая по окрашиванию PI: зона позитива – мертвые, зона негатива – живые;
- распределение клеток по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию после инкубации 24 часа;
- идентификация  $CD14^+$  ( $CD14$ -позитивных) и  $CD14^-$  ( $CD14$ -негативных) клеток;
- содержание  $CD16^+$ ,  $CD119^+$ ,  $CD124^+$ ,  $CD197^+$  клеток из  $CD14$ -позитивных Мц/Мф;

g) содержание CD16<sup>+</sup>, CD119<sup>+</sup>, CD124<sup>+</sup>, CD197<sup>+</sup> клеток из CD14-негативных Мц/Мф.

Согласно полученным данным, активация не оказывала значимого влияния на количество Мц/Мф, несущих молекулы CD16, CD119, CD124, CD197. Вместе с тем, добавление ИЛ-8 к активируемым CD14<sup>+</sup> Мц/Мф оказывало существенное влияние на их поверхностные и функциональные свойства. ИЛ-8 (во всех концентрациях) обладал способностью снижать число CD14<sup>-</sup>/CD16<sup>+</sup> и CD14<sup>-</sup>/CD124<sup>+</sup> (10 нг/мл) клеток среди активируемых Мц/Мф (данные не представлены).

CD16 (FcγRIII) обеспечивает вовлечение иммунокомпетентных клеток в процесс антителозависимой цитотоксичности. ИЛ-8 в концентрациях 0,01 нг/мл и 0,1 нг/мл вызывал снижение количества CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> среди активируемых Мц/Мф (таблица 1).

Таблица 1 – Содержание CD16<sup>+</sup>, CD119<sup>+</sup>, CD124<sup>+</sup>, CD197<sup>+</sup> (%) клеток среди активированных Мц/Мф

Маркер	Активация	Активация+ИЛ-8 нг/мл			
		0,01	0,1	1,0	10,0
CD16	10,5 (4,8-15,3)	7,4* (3,3-10,9)	6,0* (2,7-11,4)	5,9 (3,0-9,1)	5,3 (4,2-11,2)
CD119	80,2 (65,9-88,0)	90,1 (72,9-98,7)	90,7 (63,8-97,9)	90,7 (75,5-98,8)	91,3* (66,1-98,5)
CD124	45,5 (33,9-56,7)	44,7 (33,4-51,6)	44,1 (19,1-49,1)	43,2* (31,2-49,4)	43,1* (31,8-48,0)
CD197	90,7 (63,7-94,4)	97,2* (93,6-98,8)	94,6 (92,5-98,2)	97,1* (93,8-98,9)	97,1* (93,7-98,8)

Примечание: здесь и далее данные представлены в виде медианы, в скобках первый и третий квартили;

\*p<0,05 - в сравнении с клетками, активированными ЛПС в отсутствие ИЛ-8.

CD119 является α-цепью рецептора к IFN-γ. Связывание данного рецептора с соответствующим цитокином приводит к классической провоспалительной (M1) активации Мц/Мф (Martinez F.O., Gordon S., 2014; Tau G., 1999). Добавление ИЛ-8 приводило к увеличению количества CD14<sup>+</sup>/CD119<sup>+</sup> клеток, однако, статистически значимым, данное изменение было только при инкубации с максимальной концентрацией данного хемокина (10,0 нг/мл) (таблица 1).

Молекула CD124 относится к 1 типу рецепторов ИЛ-4. Связывание этого рецептора с соответствующим лигандом способствует M2 альтернативной активации Мц/Мф, которая ослабляет их воспалительную активность (Martinez F.O., Gordon S., 2014; Nelms K., 1999). Как показано в таблице 1, добавление к активированным клеткам ИЛ-8 в концентрациях 1,0 и 10,0 нг/мл приводило к снижению числа CD14<sup>+</sup>/CD124<sup>+</sup> Мц/Мф.

CD197 регулирует хоуминг Т-клеток во вторичные лимфоидные органы, такие как лимфатические узлы и селезенка (Förster R. et al., 2008). ИЛ-8 в трех концентрациях (0,01; 1,0; 10,0 нг/мл) вызывал достоверное увеличение содержания CD197-позитивных клеток среди активированных Мц/Мф (таблица 1).

Таким образом, полученные данные указывают на способность IL-8 повышать чувствительность Мц/Мф к действию IFN- $\gamma$  и усиливать их миграцию в лимфоидные органы.

Исследуя продукцию цитокинов Мц/Мф, выявили, что активация ЛПС значительно усиливала продукцию TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 и IL-10. При этом IL-8 не оказывал достоверного влияния на продукцию TNF- $\alpha$ . При максимальной концентрации IL-8 (10,0 нг/мл) оказывал значимое позитивное влияние на клеточную продукцию IL-1 $\beta$ . Также, исследуемый хемокин оказывал стимулирующее действие на продукцию IL-6, однако, его действие было статистически достоверным только при концентрациях 0,01 и 1,0 нг/мл. В нашей экспериментальной системе IL-8 не оказывал значимого влияния на продукцию IL-10 (таблица 2).

Таблица 2 – Продукция цитокинов (пг/мл) активированными моноцитами/макрофагами

Исследуемый цитокин	Активация	Активация+IL-8 пг/мл			
		0,01	0,1	1,0	10,0
TNF- $\alpha$	1114 (722-1586)	1223 (555-1636)	1200 (807-1666)	1139 (780-1724)	1136 (666-1347)
IL-1 $\beta$	390 (268-631)	434 (234-713)	466 (266-700)	498 (429-800)	516* (402-749)
IL-6	14314 (9383-16584)	17850* (11856-21251)	16182 (10776-20545)	15120* (12115-19545)	12554 (10212-16776)
IL-10	126,8 (95,9-152,9)	137,9 (103,1-195,0)	161,7 (96,8-182,0)	149,9 (91,1-166,4)	127,5 (90,2-151,7)

Примечание: \* $p < 0.05$  – в сравнении с клетками, активированными ЛПС в отсутствие IL-8.

Таким образом, полученные данные указывают на способность IL-8 усиливать осуществляемую активированными Мц/Мф продукцию провоспалительных цитокинов.

На основе полученных данных, можно предполагать, что провоспалительный эффект IL-8, не связан с усилением экспрессии на Мц/Мф низкоаффинных рецепторов к Fc фрагменту IgG. Вместе с тем, IL-8, добавленный в культуру в максимальной концентрации (10,0 нг/мл) заметно увеличивал содержание среди ЛПС-активированных Мц/Мф количество клеток, экспрессирующих рецептор к IFN- $\gamma$ , и снижал содержание клеток, экспрессирующих рецептор к IL-4. Эти данные указывают на способность IL-8 поддерживать классическую активацию Мц/Мф. Поскольку Мц/Мф являются основными продуцентами IL-8 в иммунной системе, предполагается, что высокие концентрации этого цитокина могут достигаться в ближайшем микроокружении этих клеток и, что IL-8 играет значимую роль в аутокринном поддержании провоспалительной активности Мц/Мф.

Ранее было показано, что классическая активация Мц/Мф характеризуется повышенной экспрессией CCR7 (Zhang Z. et al., 2011). Показано, что IL-8 способен увеличивать среди Мц/Мф содержание CCR7<sup>+</sup> клеток. Таким образом, IL-8 может содействовать миграции вовлеченных в иммуногенез Мц/Мф в

лимфоидные органы и, тем самым, способствовать генерализации и интенсификации адаптивных иммунных процессов.

В своей модели выявили лишь статистически незначимую тенденцию ИЛ-8 повышать Мц/Мф продукцию TNF- $\alpha$ . Более значимый прирост был, однако, отмечен со стороны секреции ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6, цитокинов, которые наряду с ИЛ-8 вовлечены в аутокринную регуляцию функциональной активности Мц/Мф. ИЛ-1 $\beta$  является одним из основных медиаторов воспаления, участвует в пролиферации, активации и апоптоза лимфоцитов (Duque G.A., Descoteaux A., 2014). ИЛ-6 представляет собой цитокин, который участвует как в воспалительных, инфекционных ответах, так и в регуляции метаболических и регенеративных процессов (Scheller J. et al. 2011). Следует учесть, что в наших экспериментах эндогенная продукция ИЛ-8 ЛПС активированными Мц/Мф могла несколько смазывать эффекты экзогенного ИЛ-8 как на экспрессию мембранных молекул, так и на продукцию цитокинов.

### **Влияние ИЛ-8 на Т-клеточный адаптогенез**

#### **Влияние ИЛ-8 на экспрессию рецептора ИЛ-8 на Т-лимфоцитах и на Т-клеточную продукцию ИЛ-8**

Первоначально установили, что активация Т-клеток приводила к повышению концентрации ИЛ-8 в культуральных супернатантах с 141,7 (50,0-120,0) пг/мл до 303,3 (200,0-236,0) пг/мл. Эти данные предполагают вовлеченность ИЛ-8 в аутокринную регуляцию функциональной активности Т-лимфоцитов. Далее исследовали мембранную экспрессию рецептора ИЛ-8 (CD181) на Т-клеточных субпопуляциях.

CD45RA изоформа молекулы семейства CD45 – общелейкоцитарного антигена. Наивные Т-лимфоциты экспрессируют большую изоформу CD45 – CD45RA. Активированные Т-клетки памяти экспрессируют короткую изоформу CD45RO (Arlettaz L. et al., 1999). CD197 (CCR7, СС-рецептор хемокина 7) экспрессируется на ДК, наивных Т и В-лимфоцитах, Т-регуляторных и на Т-клетках центральной памяти (Förster R. et al., 2008). Эта молекула вовлечена в хоуминг Т-клеток в лимфоидные органы. На основе определения мембранной экспрессии молекулы CD4, Т-лимфоциты относили к CD4-позитивным (CD4<sup>+</sup>) и CD4-негативным (CD4<sup>-</sup>) клеткам. Среди них по наличию или отсутствию молекул CD45RA и CD197 идентифицировали Т-клетки с наивным фенотипом (CD45RA<sup>+</sup>CD197<sup>+</sup>), Т-лимфоциты центральной памяти (CD45RA<sup>-</sup>CD197<sup>+</sup>), эффекторные Т-клетки (CD45RA<sup>-</sup>CD197<sup>-</sup>) и терминально-дифференцированные эффекторные Т-лимфоциты (CD45RA<sup>+</sup>CD197<sup>-</sup>) (рисунок 2).

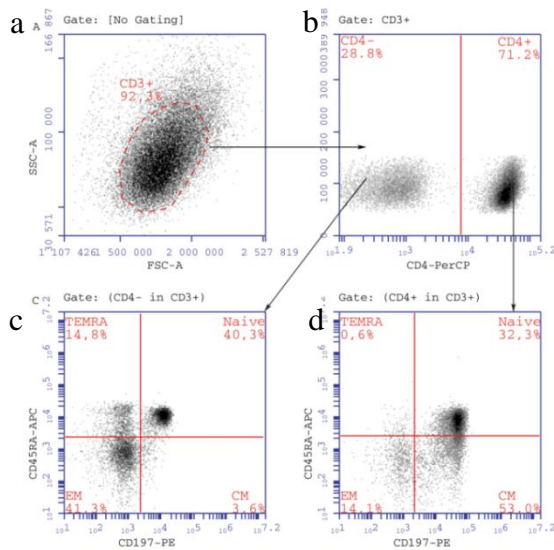


Рисунок 2 – Идентификация субпопуляций Т-клеток:

- а) распределение клеток по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию;
- б) определение  $CD4^+$  и  $CD4^-$  Т-клеток по уровню экспрессии молекулы CD4;
- с) определение субпопуляций среди  $CD4^+$ -позитивных Т-клеток по уровню экспрессии молекул CD197 и CD45RA;
- д) определение субпопуляций среди  $CD4^-$ -негативных Т-клеток по уровню экспрессии молекул CD197 и CD45RA.

На **рисунке 3** представлен разработанный нами алгоритм цитометрического анализа для определения количества  $CD181^+$  Т-клеток.

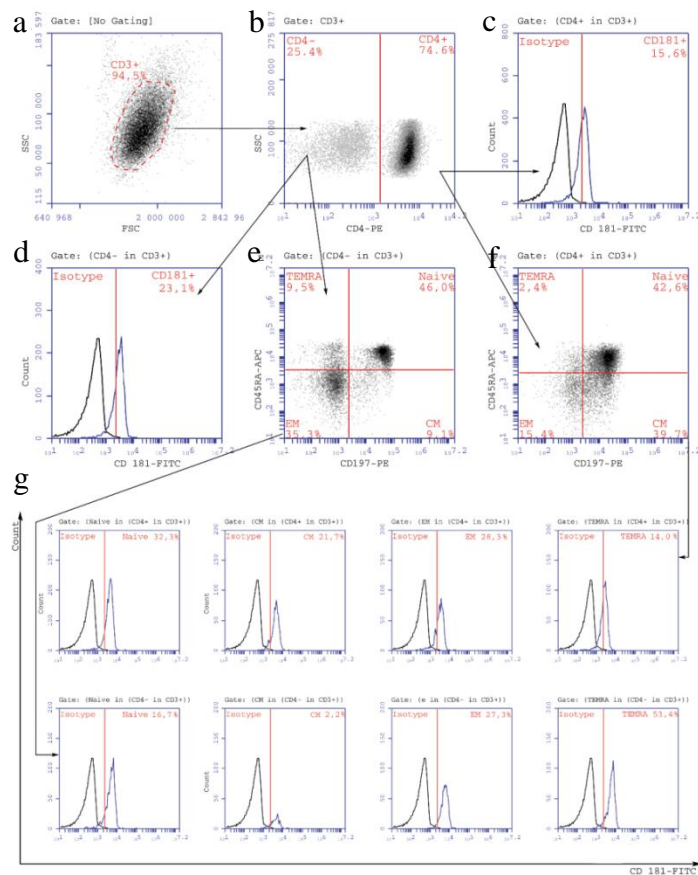


Рисунок 3 – Алгоритм цитометрического анализа Т-лимфоцитов при определении  $CD181^+$  клеток

- a) распределение клеток по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию;
- b) идентификация CD4-позитивных и CD4-негативных клеток. Зона позитива и зона негатива, соответственно.
- c) содержание CD181<sup>+</sup> лимфоцитов среди CD4-позитивных клеток;
- d) содержание CD181<sup>+</sup> лимфоцитов среди CD4-негативных клеток;
- e) идентификация наивных Т-клеток, Т-лимфоцитов центральной памяти, Т-клеток эффекторной памяти и терминально-дифференцированных Т-эффекторов среди CD4-негативных клеток по экспрессии молекул CD197 и CD45RA;
- f) идентификация наивных Т-клеток, Т-лимфоцитов центральной памяти, Т-клеток эффекторной памяти и терминально-дифференцированных Т-эффекторов клеток среди CD4-позитивных клеток;
- g) содержание CD181<sup>+</sup> лимфоцитов среди наивных Т-клеток, Т-лимфоцитов центральной памяти, Т-клеток эффекторной памяти и терминально-дифференцированных Т-эффекторов в CD4-позитивной и CD4-негативной Т-субпопуляциях.

Первоначально было установлено, что ИЛ-8 во всех исследованных концентрациях не оказывал значимого влияния на содержание CD181<sup>+</sup> клеток среди неактивированных Т-лимфоцитов.

Добавление ИЛ-8 (10 нг/мл) к активируемым Т-клеткам приводило к значимому снижению относительного числа CD181<sup>+</sup> клеток среди CD4-негативных наивных Т-лимфоцитов. В популяции CD4-позитивных наивных Т-лимфоцитов, Т-клеточная активация сопровождалась увеличением количества CD181<sup>+</sup> клеток. Добавление ИЛ-8 в активационные пробы приводило к достоверному снижению числа CD181<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD197<sup>+</sup>. Интересно, что как Т-клеточная активация, так и ИЛ-8 не оказали значимого влияния на экспрессию CD181 среди CD4-позитивных Т-клеток центральной памяти. Аналогичные результаты были получены среди CD4-негативных Т-лимфоцитов. Активация Т-клеток, а также добавление ИЛ-8 не оказывали статистически достоверного влияния на изменение количества CD181<sup>+</sup> Т-клеток. В то же время, Т-клеточная активация приводила к снижению относительного количества CD181<sup>+</sup> среди CD4-позитивных Т-лимфоцитов эффекторной памяти. Однако эти эффекты ИЛ-8 на активируемые Т-клетки оказались статистически незначимыми. Активация значимо не влияла на количество CD181<sup>+</sup>CD4-негативных Т-эффекторов. В то же время, ИЛ-8, добавленный к активируемым Т-клеткам, вызывал достоверное увеличение числа CD181<sup>+</sup> CD4-негативных Т-лимфоцитов эффекторной памяти. Т-клеточная активация увеличивала число исследуемых CD181<sup>+</sup> клеток среди CD4-негативных терминально-дифференцированных Т-эффекторов, тогда как ИЛ-8 снижал число CD181<sup>+</sup> CD4-негативных Т-эффекторов в активируемых пробах (таблица 3).

Таблица 3 – CD181<sup>+</sup> (%) клетки среди CD4<sup>+</sup> и CD4<sup>-</sup> Т-лимфоцитов

Субпопуляция	Без активации	Активация	Активация + ИЛ-8 (10,0 нг/мл)
CD4 <sup>+</sup>	10,5 (7,2-14,6)	15,5* (13,2-16,6)	16,5 (15,4-17,5)
CD4 <sup>+</sup> наивные клетки	26,5 (25,4-29,0)	37,0* (33,8-38,7)	37,5 (33,7-41,2)

CD4 <sup>+</sup> клетки центральной памяти	22,2 (21,7-29,4)	23,8 (18,6-28,2)	20,2 (14,5-25,1)
CD4 <sup>+</sup> клетки эффекторной памяти	44,5 (39,1-45,3)	29,9* (26,8-32,7)	33,9 (29,5-34,2)
CD4 <sup>+</sup> терминально-дифференцированные эффекторы	5,6 (3,6-7,1)	10,4* (6,9-13,9)	7,9 (7,2-15,0)
CD4 <sup>-</sup>	15,5 (14,9-21,1)	25,7* (14,9-26,6)	21,0** (15,9-22,8)
CD4 <sup>-</sup> наивные клетки	14,2 (12,0-20,8)	15,5 (9,7-18,2)	8,9** (8,2-9,9)
CD4 <sup>-</sup> клетки центральной памяти	1,8 (1,4-1,9)	1,4 (1,0-3,3)	2,7 (1,7-3,1)
CD4 <sup>-</sup> клетки эффекторной памяти	28,3 (26,4-29,7)	28,4 (19,8-28,9)	22,0** (16,5-26,6)
CD4 <sup>-</sup> терминально-дифференцированные эффекторы	54,4 (51,0-57,7)	60,2 (52,0-64,4)	45,1** (40,7-52,4)

Примечание: \*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробами без активатора;

\*\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробами с активатором.

Согласно представленным данным, содержание клеток экспрессирующих рецептор к IL-8 в целом согласуется с литературными данными (Chuntharapai A. et al., 1994). Интересно, что наибольшее содержание CD181<sup>+</sup> клеток было отмечено среди покоящихся CD4-позитивных клеток эффекторной памяти и среди CD4-негативных терминально-дифференцированных T-эффекторов, которые характеризуются высокой степенью зрелости. Следует, однако, иметь в виду, что активация T-лимфоцитов может индуцировать экспрессию CD181 на относительно низкодифференцированных T-лимфоцитах, способных мигрировать в лимфоидные органы и там подвергаться клональной экспансии (Francis J.N. et al., 2004). Отсюда можно предполагать участие IL-8 в механизмах, позитивно регулирующих формирование долговременной иммунной памяти. Это предположение согласуется с ранее опубликованными данными, показавшими, что IL-8 способен индуцировать экспрессию CD181 на активированных CD8<sup>+</sup> T-лимфоцитах центральной памяти (Gasser O. et al., 2005). В нашей работе показано разнонаправленное влияние IL-8 на экспрессию CD181, выявляемую на разных T-клеточных субпопуляциях. Возможно, это связано с интернализацией рецептора после его связывания с IL-8 (Jones S.A. et al., 1996; L'Heureux G.P. et al., 1995). В целом, полученные данные, указывающие на способность активированных T-лимфоцитов продуцировать IL-8, а также экспрессировать на своей поверхности рецептор к IL-8 предполагают значимость IL-8 в автономной аутокринной и паракринной регуляции T-клеточного адаптогенеза.

### **Прямое влияние IL-8 на субпопуляционный состав T-лимфоцитов**

T-клеточная активация приводила к достоверному приросту относительного числа CD4-позитивных T-лимфоцитов с фенотипом наивных T-лимфоцитов.

Интересно, что добавление к Т-клеткам ИЛ-8 вместе с активирующими частицами практически нивелировало этот прирост (таблица 4).

Таблица 4 – Субпопуляционный состав Т-лимфоцитов (%)

Субпопуляции	Без активации	Активатор+ИЛ-8 нг/мл				
		0,0	0,01	0,1	1,0	10,0
CD4 <sup>+</sup> наивные клетки	18,0 (3,1-32,3)	30,2* (20,1-42,4)	20,5** (12,5-27,8)	21,8** (11,7-24,6)	20,5** (11,0-24,3)	20,5** (11,1-26,7)
CD4 <sup>+</sup> центральной памяти	47,0 (33,0-53,7)	36,8* (22,9-43,6)	43,0 (24,2-50,5)	40,5 (25,4-48,6)	42,3 (26,0-49,7)	44,6 (23,8-52,6)
CD4 <sup>+</sup> эффекторной памяти	31,5 (16,4-49,4)	26,4* (14,8-34,2)	34,7** (23,6-44,9)	34,3** (24,8-45,2)	32,2** (26,5-43,3)	32,5** (24,9-42,5)
CD4 <sup>+</sup> терминально-дифференцированные	0,9 (0,4-4,0)	4,25* (1,13-9,13)	7,1** (2,7-15,1)	7,3 (2,6-15,1)	6,9 (2,3-14,1)	7,2 (2,3-14,5)
CD4 <sup>-</sup> наивные клетки	52,1 (32,3-61,1)	49,4 (44,1-62,4)	42,0** (25,3-61,1)	40,5** (24,9-60,9)	42,3** (25,3-60,6)	43,8 (25,7-60,8)
CD4 <sup>-</sup> центральной памяти	19,7 (15,1-35,5)	14,6* (9,4-24,0)	8,9** (4,1-15,6)	7,7** (3,5-16,0)	8,8** (3,8-18,9)	9,8** (4,73-17,55)
CD4 <sup>-</sup> клетки эффекторной памяти	12,2 (7,2-24,7)	12,9 (8,4-24,0)	24,2** (13,0-37,3)	24,6** (12,4-37,4)	23,9** (11,9-37,5)	22,6** (11,9-39,0)
CD4 <sup>-</sup> терминально-дифференцированные	6,9 (3,6-13,1)	12,1* (8,8-27,8)	18,5 (11,1-33,9)	20,8 (10,5-34,1)	19,2 (10,7-33,4)	19,0 (11,0-32,7)

Примечание: \*p<0,05 - в сравнении с пробами без активатора;

\*\*p<0,05 - в сравнении с пробами с активатором.

ИЛ-8, добавленный к активируемым Т-клеткам в концентрациях 0,01; 0,1 и 1,0 нг/мл, приводил к достоверному снижению числа CD4-негативных наивных Т-лимфоцитов. Т-клеточная активация также достоверно снижала число CD4-позитивных Т-лимфоцитов центральной памяти. При этом добавление ИЛ-8 не оказывало существенного влияния на этот процесс (таблица 4).

Т-клеточная активация также снижала содержание среди Т-лимфоцитов CD4-негативных клеток центральной памяти. При всех исследованных концентрациях ИЛ-8 достоверно способствовал такому снижению. На фоне активации снижалось относительное число CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов эффекторной памяти. Сочетанное действие активирующих частиц и ИЛ-8 (во всех концентрациях) сопровождалось увеличением количества активированных CD4-позитивных Т-лимфоцитов эффекторной памяти. ИЛ-8 во всех исследованных



концентрациях увеличивал относительное содержание CD4-негативных эффекторных клеток среди активированных Т-лимфоцитов. Т-клеточная активация также приводила к достоверному увеличению относительного количества CD4-позитивных терминально-дифференцированных эффекторных Т-лимфоцитов. IL-8 в концентрации 0,01 нг/мл увеличивал содержание терминально-дифференцированных Т-эффекторов среди активированных Т-клеток. Т-клеточная активация обеспечивала относительный прирост CD4<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup>/CD197<sup>-</sup> Т-клеток. При этом IL-8 существенно не оказывал влияния на эту популяцию клеток (**таблица 4**).

Первичная антигенная стимуляция приводит к активации наивных Т-клеток, они пролиферируют и дифференцируются в эффекторные Т-лимфоциты и Т-клетки памяти (Sallusto F. et al., 2000; Rufer N. et al., 2003). В наших экспериментах *in vitro*, Т-клеточная активация сопровождалась относительным приростом Т-клеток с фенотипом CD45RA<sup>+</sup>CD197<sup>-</sup>, а также CD4-позитивных и CD4-негативных Т-лимфоцитов. Это увеличение, по-видимому, происходило за счет относительного снижения содержания в культуре Т-лимфоцитов центральной памяти, которое могло быть связано с дифференцировочным процессом. Возможно, стимуляция дифференцировочного процесса в наших экспериментах была частично связана со способностью IL-8 активировать продукцию Т-лимфоцитами ряда цитокинов, в том числе – IL-2, IL-7, которые стимулируют дифференцировку и созреванию Т-лимфоцитов в эффекторные Т-клетки (Létourneau S. et al., 2009; Alves N.L. et al., 2003).

### **Прямое влияние IL-8 на активацию Т-лимфоцитов**

Молекула CD25  $\alpha$ -субъединица IL-2, является общепринятым маркером лимфоидной активации, приводящей к IL-2-зависимой пролиферации лимфоцитов (Lin J., Weiss A., 2001; Monti P. et al., 2009). CD38 – циклическая ADP-рибозогидролаза, в большом количестве экспрессируется на зрелых активированных Т-лимфоцитах, после стимуляции митогеном (Deterre P. et al., 2000).

Стратегия гейтирования определения количества CD25<sup>+</sup> Т-клеток представлена на **рисунке 4**. Для оценки количества CD38<sup>+</sup> клеток, стратегию гейтирования проводили аналогичным образом.

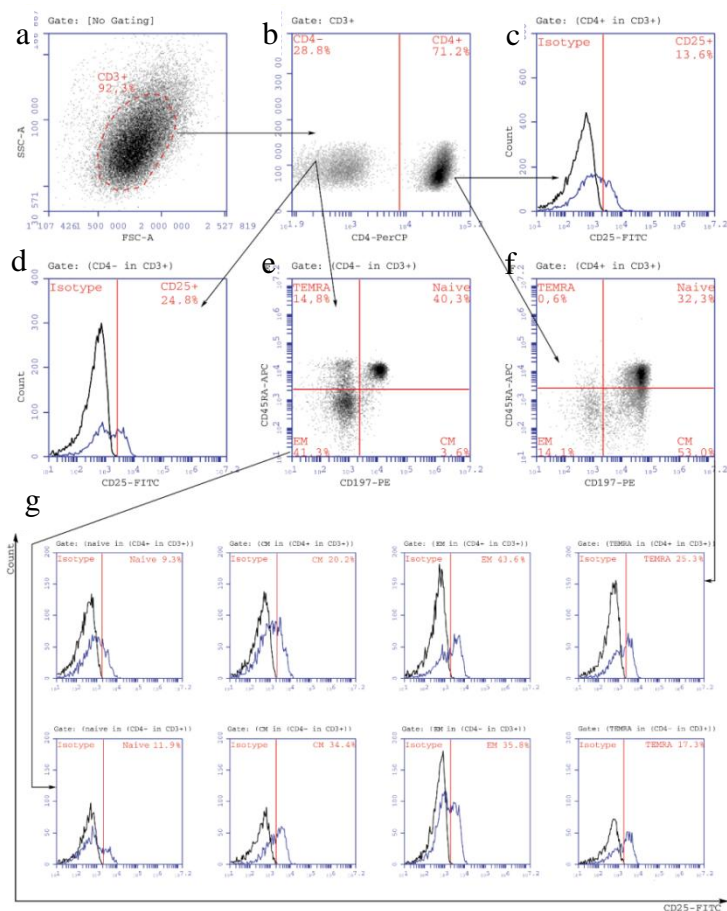


Рисунок 4 – Алгоритм цитометрического анализа Т-лимфоцитов при определении CD25<sup>+</sup> клеток:

- a) распределение клеток по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию;
- b) идентификация CD4-положительных и CD4-негативных клеток. Зона позитива и зона негатива, соответственно.
- c) содержание CD25<sup>+</sup> лимфоцитов среди CD4-положительных клеток;
- d) содержание CD25<sup>+</sup> лимфоцитов среди CD4-негативных клеток
- e) идентификация наивных Т-клеток, Т-лимфоцитов центральной памяти, Т-клеток эффекторной памяти и терминально-дифференцированных Т-эффекторов среди CD4-негативных клеток по экспрессии молекул CD197 и CD45RA;
- f) идентификация наивных Т-клеток, Т-лимфоцитов центральной памяти, Т-клеток эффекторной памяти и терминально-дифференцированных Т-эффекторов клеток среди CD4-положительных клеток;
- g) содержание CD25<sup>+</sup> лимфоцитов среди наивных Т-клеток, Т-лимфоцитов центральной памяти, Т-клеток эффекторной памяти и терминально-дифференцированных Т-эффекторов в CD4-положительных клетках и CD4-негативных Т-субпопуляциях.

Согласно полученным результатам, IL-8 не оказывал существенного влияния на экспрессию CD25 на неактивированных Т-клетках. Т-клеточная активация приводила к достоверному увеличению относительного количества CD4-положительных и CD4-негативных Т-лимфоцитов, несущих молекулу CD25. При этом IL-8 в концентрации 10,0 нг/мл снижал содержание CD25<sup>+</sup> клеток, как среди CD4-положительных, так и CD4-негативных Т-лимфоцитов. При других концентрациях IL-8 эффекты были статистически не значимы (таблица 5). Относительное количество CD38<sup>+</sup> активированных CD4-положительных и CD4-негативных Т-лимфоцитов достоверно возрастало в результате Т-клеточной

активации. При этом IL-8 не оказывал существенного влияния на содержание CD38<sup>+</sup> клеток среди исследуемых Т-лимфоцитов.

Таблица 5 – Содержание CD25<sup>+</sup> (%) клеток среди CD4-позитивных и CD4-негативных Т-лимфоцитов

субпопуляция	без активации	активация + IL-8 (нг/мл)				
		0	0,01	0,1	1	10
CD4 <sup>+</sup>	0,1 (0-0.2)	6.0* (2.6-14.4)	6,5 (1.8-13.3)	6,0 (2.0-14.1)	7,1 (1.5-14.5)	4.6** (1.8-12.6)
CD4 <sup>+</sup> наивные клетки	0,0 (0.0-0.1)	3.3* (1.4-5.1)	4,3 (1.3-5.7)	3,5 (1.8-8.0)	3,8 (1.9-8.9)	3,5 (1.1-6.8)
CD4 <sup>+</sup> клетки центральной памяти	0,05 (0-0.2)	9.2* (5.4-11.5)	10,3 (4.7-18.7)	9,9 (6.1-17.4)	11,3 (8.3- 20.4)	10,1 (4.2-15.5)
CD4 <sup>+</sup> клетки эффекторной памяти	0,35 (0.1-0.9)	21.9* (6.9-44.4)	10.7** (4.9-38.4)	11.7** (5.3-42.1)	11.7** (4.2- 42.2)	9.5** (6.3-41.0)
CD4 <sup>+</sup> терминально- дифференциро- ванные	0 (0.0-0.9)	27.1* (6.1-55.9)	12.9** (2.7-51.0)	11.4** (4.4-50.2)	9.7** (1.9- 45.7)	12.7** (5.4- 48.8)
CD4 <sup>-</sup>	0,2 (0.1-0.4)	19.3* (1.5-30.6)	20,5 (5.8-27.2)	22 (4.4-27.4)	21,1 (6.2-28.8)	18.1** (4.5-25.7)
CD4 <sup>-</sup> наивные клетки	0 (0.0-0.1)	13.9* (5.6-15.3)	13,4 (11.7-16.2)	14,8 (11.0-16.2)	14,6 (14.1-16.7)	11,4 (11.2-11.8)
CD4 <sup>-</sup> клетки центральной памяти	0 (0.0-0.1)	29.7* (11.5- 36.4)	28,9 (4.3-39.8)	26,6 (2.9-40.1)	25,2 (7.5-41.0)	24,1 (3.2- 40.0)
CD4 <sup>-</sup> клетки эффекторной памяти	0,5 (0.2-0.7)	29.8* (8.2-53.9)	8.2** (6.5-52.2)	10.4** (6.1-56.4)	9.5** (6.4-53.7)	14.3** (5.8-52.9)
CD4 <sup>-</sup> терминально- дифференциро- ванные	0,4 (0.1-0.7)	17.7* (9.4-28.4)	16,0 (6.6-29.6)	14.9** (6.6-29.6)	13.7** (4.2-30.7)	13.7** (9.1-27.6)

Примечание: \*p<0,05 - в сравнении с пробами без активатора;

\*\*p<0,05 - в сравнении с пробами с активатором.

Как и ожидалось, Т-клеточная активация усиливала экспрессию CD25<sup>+</sup> клеток среди CD4-позитивных и CD4-негативных наивных Т-лимфоцитов. При этом IL-8 не оказывал существенного влияния на активационный статус Т-клеток, регистрируемый по экспрессии молекулы CD25. Присутствие IL-8 в пробах существенным образом не меняла картину (**таблица 5**). Активация Т-лимфоцитов также приводила к относительному росту CD38<sup>+</sup> клеток среди CD4-позитивных и CD4-негативных наивных Т-клеток. IL-8 не оказывал значимого влияния на этот процесс.

Т-клеточная активация приводила к значимому приросту относительного количества CD25<sup>+</sup> клеток среди CD4-позитивных и CD4-негативных Т-лимфоцитов центральной памяти. Действие IL-8 на активируемые CD4<sup>+</sup> и CD4<sup>-</sup> Т-лимфоциты центральной памяти не оказывало влияние на количество CD25<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (**таблица 5**). Т-клеточная активация приводила к значимому росту относительного количества CD38-позитивных клеток среди CD4-позитивных и негативных Т-лимфоцитов центральной памяти. При этом IL-8 во всех исследованных концентрациях существенно не изменял пропорцию CD38<sup>+</sup> клеток в этих Т-клеточных субпопуляциях.

Активация Т-лимфоцитов приводила к значительному увеличению количества CD25<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> и CD25<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup> Т-лимфоцитов эффекторной памяти. Интересно, что IL-8 достоверно снижал относительное число CD25<sup>+</sup> как среди CD4-позитивных, так и среди CD4-негативных Т-лимфоцитов эффекторной памяти в пробах с Т-клеточной активацией (**таблица 5**). Также, Т-клеточная активация приводила к увеличению относительного числа CD38<sup>+</sup> среди CD4-позитивных и CD4-негативных Т-лимфоцитов эффекторной памяти. IL-8 не оказывал значимого влияния на этот процесс в исследуемых субпопуляциях (данные не представлены).

При добавлении к Т-клеткам активирующих частиц, количество CD25<sup>+</sup> клеток с фенотипом CD4-позитивных и CD4-негативных терминально-дифференцированных Т-эффекторов значительно возрастало. Действие IL-8 во всех концентрациях на CD4-позитивные терминально-дифференцированные эффекторные Т-лимфоциты носило однонаправленный характер и сопровождалось уменьшением относительного числа CD25<sup>+</sup> клеток в пробах с Т-клеточной активацией. Достоверное снижение числа CD25<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup> терминально-дифференцированных Т-эффекторов в активационных пробах отмечалось в концентрациях IL-8: 0,1; 1,0; 10,0 нг/мл (**таблица 5**). Аналогично, Т-клеточная активация приводила к достоверному увеличению относительного числа CD38<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> и CD38<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup> терминально-дифференцированных Т-эффекторов. IL-8 не оказывал значимого влияния на активацию этих Т-клеточных субпопуляций.

Таким образом, IL-8 способен оказывать негативный эффект на активацию эффекторных и терминально-дифференцированных Т-лимфоцитов.

### **Влияние IL-8 на Т-клеточную продукцию цитокинов**

IL-2 является основным ростовым медиатором для Т-лимфоцитов (Oppenheim J.J., 2007). Он играет важную роль в процессе дифференцировки Т-клеток в эффекторные клетки и клетки памяти. Культивирование Т-клеток с активатором приводило к значимому увеличению продукции IL-2. Нами показано, что IL-8 при концентрациях 0,01 и 10,0 нг/мл оказывал стимулирующее действие на продукцию IL-2 активированными Т-клетками (**таблица 6**).

Таблица 6 – Продукция цитокинов Т-лимфоцитами (пг/мл)

Цитокины	Без активации	Активация + IL-8 (нг/мл)				
		0	0,01	0,1	1	10
IL-2	<10	500* (158-1215)	702** (253-1314)	620 (236-1245)	662 (233-1331)	619** (218-1488)
IFN-γ	<10	3403* (1775-4479)	2993 (1134-5556)	1620 (1061-7620)	3781 (1187-7203)	4430 (694-7057)
IL-4	<2	13,9* (3,4-41,8)	6,9 (3,6-15,0)	8,4 (4,8-12,9)	9,0 (3,3-33,3)	9,3 (5,1-17,2)
IL-10	<5	439,8* (194,4-728,8)	504,8 (219,4-612,6)	385,7** (233,6-607,8)	458,3 (233,7-657,0)	285,9** (185,4-683,5)

Приложение: \* $p < 0,05$  в сравнении с пробами без активатора;

\*\* $p < 0,05$  в сравнении с пробами с активатором.

IFN-γ продуцируется CD4 Th1 Т-клетками, а также NK и натуральными естественными Т клетками (NKT) (Schroder K. et al., 2004). Активация Т-лимфоцитов стимулировала продукцию IFN-γ. При этом IL-8 не оказывал существенного влияния на продукцию IFN-γ Т-клетками (таблица 6).

IL-4 является противовоспалительным цитокином, продуцируется Th2 Т-клетками. Он подавляет провоспалительную активность Th1 клеток и Мц/Мф (Zhu J., 2015). Активация Т-клеток приводила к достоверному увеличению продукции IL-4 Т-клетками. IL-8 формировал тенденцию к снижению продукции IL-4, которая, однако, во всех исследуемых концентрациях IL-8 была статистически недостоверной (таблица 6).

IL-10 – цитокин, имеющий плеiotропные эффекты в иммунорегуляции и воспалении (Rentzos M. et al., 2009). Он снижает функциональную активность Th1 клеток. Т-клеточная активация индуцировала прирост продукции IL-10. IL-8 статистически достоверно снижал продукцию IL-10 в двух концентрациях – 0,1 и 10,0 нг/мл (таблица 6).

Как следует из представленных данных, IL-8 избирательно снижал оцениваемую по экспрессии CD25 активацию высокодифференцированных CD197<sup>-</sup> Т-клеток, утративших способность мигрировать в лимфоидные органы и подвергаться там размножению. Эти данные указывают на возможную прямую вовлеченность IL-8 в негативную регуляцию локальных Т-клеточных реакций. Эти результаты согласуются с ранее опубликованными данными о продукции регуляторными CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Т-клеток IL-8 (Himmel M.E. et al., 2011), которая резко возрастает в ответ на их активацию (Akhade A.S., Qadri A., 2015). В свете представленных данных можно предполагать, что IL-8, наряду с IL-10 и TGF-β, способен опосредовать иммуносупрессивный эффект регуляторных Т-клеток. Однако, это предположение входит в прямое противоречие с нашими данными, демонстрирующими позитивный эффект IL-8 на Т-клеточную продукцию IL-2 и негативный эффект на секрецию IL-10. Было также показано, что IL-8 свойственна тенденция снижать осуществляемую активированными Т-клетками продукцию IL-4. Такая тенденция была также описана ранее (Gesser B. et al., 1996).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя вышесказанное, необходимо подчеркнуть, что ИЛ-8 поддерживает провоспалительную активность Мц/Мф, а также содействует их миграции в лимфоидные органы, тем самым, способствуя генерализации и интенсификации адаптивных иммунных процессов. Также он способен оказывать разнонаправленное влияние на активацию и функциональную деятельность разных Т-клеточных субпопуляций. А именно, препятствует развитию избыточных Т-клеточных реакций на периферии, при этом, содействует генерации адаптивных Т-клеточных процессов, формирующих иммунную память.

### ВЫВОДЫ

1. ИЛ-8 *in vitro* увеличивает относительное количество активированных Мц/Мф, экспрессирующих CD119 и CD197 и снижает число CD16<sup>+</sup> и CD124<sup>+</sup> клеток. ИЛ-8 стимулирует секрецию Мц/Мф ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6.
2. Т-клеточная активация приводит к усилению продукции ИЛ-8, к увеличению числа CD181<sup>+</sup> клеток, среди CD4-позитивных наивных и CD4<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup> терминально-дифференцированных Т-лимфоцитах и к снижению количества CD4-позитивных Т-эффекторов. Добавление экзогенного ИЛ-8 приводит к относительному увеличению количества CD4-негативных наивных и терминально-дифференцированных Т-клеток, экспрессирующих CD181.
3. Присутствие экзогенного ИЛ-8 в культуре увеличивает относительное количество CD4-позитивных и CD4-негативных эффекторных Т-клеток и снижает количество наивных и Т-клеток центральной памяти.
4. Действие ИЛ-8 на активированные Т-лимфоциты приводит к относительному снижению количества эффекторных CD4-позитивных и CD4-негативных Т-клеток и к усилению секреции ИЛ-2.
5. ИЛ-8 способен позитивно влиять на адаптивный иммуногенез посредством прямых воздействий на дифференцировку и функциональные свойства Мц/Мф и Т-лимфоцитов.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Прямое влияние интерлейкина-8 на активацию Т-клеток / М.Е. Меняйло, В.В. Малащенко, В.А. Шмаров и др. // **Российский иммунологический журнал**. – 2016. – Т. 10(19), № 2. – С. 174-178.
2. Дифференцировка активированных Т-лимфоцитов человека под влиянием интерлейкина-8 / М.Е. Меняйло, В.В. Малащенко, В.А. Шмаров и др. // **Журнал медико-биологических исследований**. – 2017. – Т. 5, № 2. – С. 67-73.
3. Direct effects of interleukin-8 on growth and functional activity of T lymphocytes / М.Е. Menaiilo, V.V. Malashchenko, V.A. Shmarov et al. // **International immunopharmacology**. – 2017. – V. 50. – P. 178-185.
4. Роль интерлейкина-8 в непосредственной регуляции функциональной активности Т-лимфоцитов / М.Е. Меняйло, В.В. Малащенко, В.А. Шмаров и др. // **Медицинская иммунология**. – 2017. – Т. 19, № 5. – С. 529-536.

5. Interleukin-8 favors pro-inflammatory activity of human monocytes/macrophages / M.E. Meniailo, V.V. Malashchenko, V.A. Shmarov et al. // **International immunopharmacology**. – 2018. – V. 56. – P. 217-221.
6. Оценка степени экспрессии рецепторов к интерлейкину-8 на лимфоидной популяции / М.Е. Меняйло, В.В. Малащенко, В.А. Шмаров и др. // *Медицинская иммунология*. – 2015. – Т. 17, № 3s. – С. 249-250.
7. Роль интерлейкина-8 в регуляции адаптивных Т-клеточных реакций / М.Е. Меняйло, В.В. Малащенко, В.А. Шмаров и др. // *Российский иммунологический журнал*. – 2015. – Т. 9(18), № 2 (1). – С. 91-92.
8. Цитокин-опосредованная (IL-7, G-CSF, GM-CSF, EPO, IL-8) регуляция активационного статуса Т-лимфоцитов человека / А.Г. Гончаров, В.В. Малащенко, В.А. Шмаров, М.Е. Меняйло и др. // *Российский иммунологический журнал*. – 2016. – Т. 10(19), № 1. – С. 159-161.
9. Меняйло М.Е. Влияние интерлейкина-8 на уровень экспрессии активационного маркера CD38 на Т-лимфоцитах человека / М.Е. Меняйло // *Сборник тезисов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Научные биомедицинские технологии: от фундаментальных исследований до внедрения»* – Пермь. – 2016. – С. 83.
10. Меняйло М.Е. Влияние интерлейкина-8 на продукцию Т-лимфоцитами человека интерлейкина-10 / М.Е. Меняйло // *Сборник тезисов XV Всероссийского совещания с международным участием и VIII школы по эволюционной физиологии*. – Санкт-Петербург. – 2016. – С. 153-154.
11. Меняйло М.Е. Изменение фенотипического профиля активированных моноцит/макрофагов человека под воздействием интерлейкина-8 / М.Е. Меняйло, А.Г. Гончаров // *Сборник тезисов VII Всероссийского симпозиума с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии*. – Астрахань. – 2017. – С. 84-86.
12. Меняйло М.Е. CXCL8-зависимая реорганизация цитокиновых рецепторов CD119 и CD124 на активированных моноцит/макрофагах человека в условиях культивирования *in vitro* / М.Е. Меняйло, А.Г. Гончаров // *Сборник тезисов VII Всероссийского симпозиума с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии*. – Астрахань. – 2017. – С. 87-88.
13. Меняйло М.Е. IL-8 опосредованное увеличение количества ЛПС-стимулированных CD14<sup>+</sup>CD197<sup>+</sup> моноцит/макрофагов человека / М.Е. Меняйло, А.Г. Гончаров // *Сборник тезисов VII Всероссийского симпозиума с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии*. – Астрахань. – 2017. – С. 89-91.
14. Интерлейкин-8-опосредованное изменение функциональной активности моноцитов/макрофагов человека *in vitro* / М.Е. Меняйло, А.Г. Гончаров, В.А. Шмаров и др. // *Материалы XXIII съезда Физиологического общества имени И.П. Павлова*. – Воронеж: Издательство «ИСТОКИ» – 2017. – С. 2213-2215.