

12. Miao W., Zhu B., Xiao X., et al. Effects of titanium dioxide nanoparticles on lead bio-concentration and toxicity on thyroid endocrine system and neuronal development in zebrafish larvae. *Aquat Toxicol.* 2015; 161:117–126.
13. Hussein M. M., Ali H. A., Saadeldin I. M., Ahmed M. M. Querectin alleviates zinc oxide nanoreprotoxicity in male Albino rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 2016; 30(10):489–496.

УДК 616.419-089.843-07:616.428-091-092.9

<sup>1</sup>Чарушина Ю. А., <sup>1</sup>Логонова Н. П., <sup>2</sup>Заморина С. А., <sup>2</sup>Раев М. Б.

## **МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ БРЫЖЕЕЧНЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ НА АЛЛОГЕННУЮ ТРАНСПЛАНТАЦИЮ КЛЕТОК КРАСНОГО КОСТНОГО МОЗГА И ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДОВ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКОГО $\beta$ 1-ГЛИКОПРОТЕИНА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

*<sup>1</sup>Пермский государственный медицинский университет  
им. академика Е. А. Вагнера, Пермь, Российская Федерация*

*<sup>2</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН —  
филиал Пермского федерального исследовательского центра  
Уральского отделения РАН, Пермь, Российская Федерация*

---

*Аннотация.* Целью работы явилось изучение влияния коротких пептидных фрагментов ТБГ (трофобластический  $\beta$ 1-гликопротеин) на морфофункциональное состояние брыжеечных лимфатических узлов при аллогенной трансплантации клеток красного костного мозга в эксперименте.

*Методика работы* заключается в оценке толерогенного действия пептидов ТБГ в области введения аллогенных клеток (брыжеечные лимфоузлы).

*Контингент испытуемых:* белые крысы-самцы линии Wistar (n = 56), возраст от 2–3 месяцев. Использовали модель локальной аллотрансплантации.

*Основные результаты* работы показали, что введение коротких пептидных фрагментов ТБГ на фоне аллогенной трансплантации клеток костного мозга снижает воспаление в брыжеечных лимфатических узлах, стабилизирует микроокружение и поддерживает пролиферацию и дифференцировку клеток иммунной системы в направлении T reg популяции лимфоцитов. Динамика накопления транскрипционного фактора FOXP3 была медленной и проявилась только к концу эксперимента (35 суток). В результате пептиды трофобластического  $\beta$ 1-гликопротеина проявили свойства иммуномодулятора, что важно для формирования иммунной толерантности.

*Ключевые слова:* аллогенный трансплантат, красный костный мозг, белки беременности, брыжеечные лимфатические узлы, FOXP3, дендритные клетки, иммунная толерантность.

<sup>1</sup>Charushina Yu. A., <sup>1</sup>Loginova N. P., <sup>2</sup>Zamorina S. A., <sup>2</sup>Raev M. B.

## MORPHOLOGICAL FEATURES OF THE RESPONSE OF MESENTERIC LYMPH NODES TO ALLOGENIC TRANSPLANTATION OF RED BONE MARROW CELLS AND THE ACTION OF PEPTIDES OF PREGNANCY SPECIFIC $\beta$ 1-GLYCOPROTEIN IN THE EXPERIMENT

<sup>1</sup>Perm State Medical University named after academician E. A. Wagner, Perm, Russian Federation

<sup>2</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences — branch of the Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

---

**Abstract.** The purpose of the work was to study the effect of short peptide fragments of PSG (PREGNANCY SPECIFIC  $\beta$ 1-GLYCOPROTEIN) on the morphofunctional state of mesenteric lymph nodes during allogeneic transplantation of red bone marrow cells in an experiment.

The method of work is to evaluate the tolerogenic effect of TBG peptides in the area of injection of allogeneic cells (mesenteric lymph nodes). Object of study: white male rats of the Wistar line (n = 56), age from 2–3 months. A local allotransplantation model was used.

The main results of the work showed that the introduction of short peptide fragments of PSG against the background of allogeneic bone marrow cell transplantation reduces inflammation in the mesenteric lymph nodes, stabilizes the microenvironment and supports the proliferation and differentiation of immune system cells towards the T reg lymphocyte population. The dynamics of accumulation of the transcription factor FOXP3 was slow and appeared only at the end of the experiment (35 days). As a result, peptides of PREGNANCY SPECIFIC  $\beta$  1-GLYCOPROTEIN exhibited immunomodulator properties, which is important for the formation of immune tolerance.

**Keywords:** allogeneic transplant, red bone marrow, pregnancy proteins, mesenteric lymph nodes, FOXP3, dendritic cells, immune tolerance.

### ВВЕДЕНИЕ

Ключевой проблемой в трансплантологии гематопоэтических стволовых клеток является иммунологический конфликт, развивающийся как в направлении «хозяин против трансплантата» (РХПТ), так и «трансплантат против хозяина» (РТПХ). В развитии любого из этих состояний участвуют все звенья иммунной системы, содержащие в достаточном количестве иммунокомпетентные клетки. Учитывая, что факторами, индуцирующими толерантность, являются белки, ассоциированные с беременностью, было предложено решить проблему РХПТ с помощью трофобластического  $\beta$ 1-гликопротеина (ТБГ). Потенциал ТБГ позволяет рассматривать его как один из ключевых факторов, формирующих иммунную толерантность организма матери к развивающемуся эмбриону [1]. В работе использовались пептидные фрагменты данного белка (YECSE, YQCE, YVCS и YACS), более доступные в экономическом и этическом плане.

Установлено, что в экспериментах на животных аналогом внутривенного введения является внутрибрюшинный способ введения препаратов [2]. Препараты (в том числе клетки красного костного мозга), попадающие в брюшную полость, всасываются сосудистыми сплетениями серозных оболочек и поступают в общий лимфо- и кровоток. Структурно-функциональные изменения брыжеечных лимфатических узлов служат проявлением системного ответа лимфатической системы, а также реакцией на массированное всасывание препаратов через серозные оболочки, попадающие в регион лимфосбора брыжеечных лимфатических узлов [2]. Лимфатические узлы представляют собой место развития иммунного ответа, участок иммунокооперативных взаимодействий. На любые эндогенные и экзогенные воздействия лимфатические узлы динамично, лабильно реагируют изменением своих структурно-функциональных особенностей [3–5].

По данным литературы моноциты и макрофаги играют ключевую роль в отторжении трансплантата. Эти мононуклеары распознают аллоантигены и запускают воспалительный каскад, который активизирует адаптивный иммунный ответ [6, 7]. Для оценки формирования локального иммунного ответа важен уровень Т-регуляторных клеток (Treg), основная функция которых — контроль силы и продолжительности сложной многокомпонентной иммунной реакции. Транскрипционный фактор FOXP3 является специфическим маркером для Treg, так как он необходим для дифференцировки и функционирования этих клеток [8]. В этой связи изучение реактивности компонентов функциональных систем организма позволяет оценить общее влияние применения пептидов ТБГ на органы иммунной системы, в частности, на брыжеечные лимфатические узлы.

Целью работы явилось изучение влияния коротких пептидных фрагментов ТБГ (трофобластический  $\beta$ 1-гликопротеин) на морфофункциональное состояние брыжеечных лимфатических узлов при аллогенной трансплантации клеток красного костного мозга в эксперименте.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте задействованы белые крысы-самцы линии Wistar ( $n = 56$ ) в возрасте от 2–3 месяцев ( $m \approx 250$  г). Животных разделили на три группы: 1-я группа контроль ( $n = 8$ ) — интактные животные; 2-я группа ( $n = 24$ ) — внутрибрюшинно вводили 10 мл аллогенной суспензии красного костного мозга; 3-я группа ( $n = 24$ ) — внутрибрюшинно вводили 10 мл аллогенной суспензии костного мозга и подкожно раствор смеси синтетических пептидов в рабочей концентрации 12,5 мг. Применяли пептиды ТБГ (YACS — A, YQCE — Q, YVCS — V, YECE — E), синтезированные на заказ фирмой «Рашен пептайд» (Россия), предварительно очищенные нами от эндотоксина при помощи колонок производства Thermo Scientific. Использовали модель локальной аллотрансплантации. Методы: гистологические (окраска гематоксилином и эозином, по Браше); иммуногистохимический: исследование проводили аппаратным способом с использованием иммуногистохимических автостейнеров Autostainer 360 (Thermo, Великобритания). Для определения качественного состава использовали моноклональное антитело (Cloude-Clon Corp, США) к фактору транскрипции: FOXP3 (recombinant; Tyr191-Glu412); моноклональные антитела (Gen Tex, США) к: CD68 — маркер макрофагов; S-100 — маркер дендритных клеток. Положительным результатом иммуногистохимической реакции являлось специфическое окрашивание клеток

(коричневый цвет). Выведение животных из эксперимента проводили на 3-и, 2-е и 35-е сутки. Исследовали брыжеечные лимфатические узлы.

Исследование препаратов проводили на морфометрической установке (Olympus, Япония) с последующим анализом изображений в программе Image Pro Plus (free version) в автоматическом режиме. В оценке параметров иммуногистохимического окрашивания к фактору транскрипции: FOXP3 использовался пороговый метод бинаризации Оцу. Результаты расчета представлены после обработки данных в программе ImageJ для автоматической морфометрии в виде количества клеток с положительной экспрессией в поле зрения.

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prizm 8, используя двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) и post-hoc тест Тьюки для множественных сравнений. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования показали, что при аллогенной трансплантации клеток костного мозга в брыжеечных лимфатических узлах на 3-и сутки верифицировали увеличение лимфоидной массы во всех функциональных зонах органа. Синусы расширены и заполнены лимфоцитами. В крупных лимфоидных узелках выявлены процессы пролиферации и дифференцировки клеток, явления плазматогенеза. В светлых центрах скопление макрофагов с резко оксифильной цитоплазмой. Межузелковое пространство не просматривается, заполнено лимфоцитами. В посткапиллярных венулах паракортикальной зоны визуализируются признаки миграции клеток. Во всех функциональных зонах коры увеличилось число дендритных клеток (ДК). В зоне узелков положительная экспрессия S-100 имела в пределах всей их площади. Клетки располагались преимущественно поодиночке, диффузно, формируя контакты с лимфоцитами. На 3-и сутки в 1,5 раза увеличивается экспрессия транскрипционного фактора FOXP3 по сравнению с группой контроля (*табл. 1*). Экспрессия FOXP3 имела в лимфоцитах лимфоидных узелков и в паракортексе.

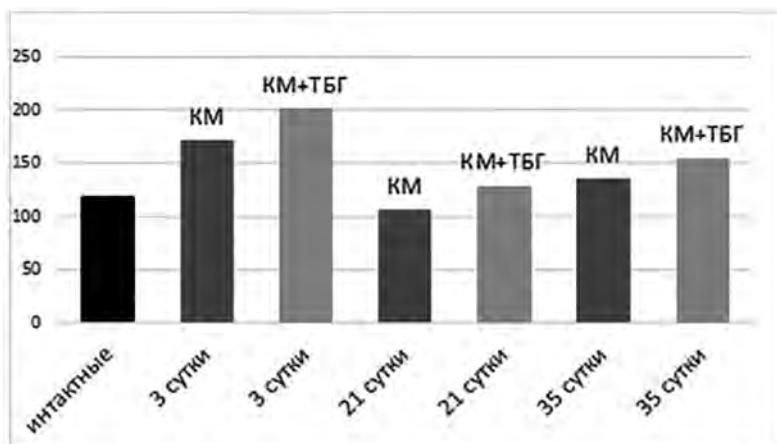


Рис. 1. Динамика накопления дендритных клеток (S-100) в корковом веществе брыжеечных лимфатических узлов. КМ — костный мозг; ТБГ — пептиды

На 21-е сутки в зонах органа продолжают активные процессы пролиферации и дифференцировки лимфоидных клеток, что визуально отражается на размерах и структуре Т- и В-зависимых зон. Имеются скопления плазматических клеток и макрофагов (CD68) практически во всех зонах органа. К этому сроку имелись особенности накопления ДК. Их численность в корковом веществе резко снижается и становится ниже показателя контрольной группы (рис. 1). Низкий уровень ДК в функциональных зонах коркового вещества, по-видимому, способствовал снижению и экспрессии FOXP3, численность которых соответствовала контрольной группе (табл. 1). К концу эксперимента (35 суток) продолжалось снижение экспрессии маркера FOXP3, уступая 40% группе контроля.

Таблица 1

ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ FOXP3 В КЛЕТКАХ КОРКОВОГО ВЕЩЕСТВА  
БРЫЖЕЕЧНЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ

Группы Объект	Контроль	3-и сутки		21-е сутки		35-е сутки	
	(интактные)	км	км + тбг	км	км+тбг	км	ккм+тбг
Корковое вещество	299,9 ± 11,4	476,8 ± 32,9*	296,9 ± 19,7	300,2 ± 24,1	207,6 ± 28,7*	176,3 ± 15,1*	334,2 ± 8,5*

\* — значимые различия ( $p < 0,05$ ), между группами по отношению к контролю (M + m).

КМ — костный мозг; ТБГ — пептиды

Введение пептидов дополнительно к аллогенной трансплантации клеток костного мозга (3 гр) показало, что на 3-и сутки идет активация функциональных зон органа. В наружной коре формируются крупные лимфоидные узелки с активными герминативными центрами. Узелки сливаются, междузелковые пространства не просматриваются. В паракортикальной зоне вокруг посткапиллярных венул формируются лимфоцитарные муфты. В этой части коры имеются крупные скопления из макрофагов (CD68) и плазматических клеток. Интенсивно проявилась экспрессия S-100 в лимфоидных узелках, в междузелковом пространстве и в паракортикальной зоне органа. Экспрессия же FOXP3 не отличалась или была ниже показателей группы контроля (табл. 1). Маркер Treg лимфоцитов верифицировали диффузно в клетках наружной и глубокой коры органа. К середине эксперимента (21-е сутки) в органе имелось резкое снижение содержания ДК и Treg лимфоцитов. Но лимфоидные узелки продолжают оставаться крупными, активными. Между ними хорошо просматриваются промежуточные синусы, тенденции к слиянию узелков нет. Синусы широкие, в их просвете присутствуют лимфоциты, макрофаги и эозинофилы. Экспрессия же FOXP3 снизилась в паракортикальной зоне органа. В этой части органа между диффузными скоплениями лимфоцитов присутствуют эозинофилы (единичные), макрофаги и плазматические клетки на разных стадиях дифференцировки. К концу же исследования (35-е сутки) в органе отмечается рост числа как ДК, так и Treg популяции лимфоцитов. Клетки обильно, диффузно накапливались во всех зонах коры, достоверно превышая показатели группы сравнения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, внутрибрюшинное введение клеток костного мозга вызвало локальную реакцию активации брыжеечных лимфатических узлов. Короткие пептидные фрагменты онкофетального белка (трофобластический  $\beta 1$ -гликопротеин) на фоне аллогенной трансплантации фракции ККМ снижают воспаление в брыжеечных лимфатических узлах и поддерживают пролиферацию и дифференцировку клеток иммунной системы в направлении регуляторной популяции лимфоцитов, что важно для формирования иммунной толерантности к аллоантигенам. Этому способствуют и клетки микроокружения: макрофаги, дендритные клетки. В течение исследования динамика накопления маркера FOXP3 была медленной и проявилась только к концу эксперимента. Можно предположить, что этому послужил накопительный эффект пептидов ТБГ, способствующий увеличению клеток с экспрессией FOXP3 к концу исследования. В результате пептиды ТБГ проявили свойства иммуностимулятора и поддержали дифференцировку Treg лимфоцитов в брыжеечных лимфатических узлах при локальном действии аллогенного трансплантата.

Исследование выполнено при финансовой поддержке правительства Пермского края в рамках научного проекта № С-26/509.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Cooke K. R., Luznik L., Sarantopoulos S., Hakim F. T., Jagasia M., et al.* The Biology of chronic Graft-versus-Host Disease: A task force report from the National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2017; 23(2):211–234. DOI: 10.1016/j.bbmt.2016.09.023
2. *Исакова Н. Б., Старкова Е. В.* Брыжеечные лимфатические узлы при моделировании рака прямой кишки и в условиях химиотерапии // *Сибирский онкологический журнал.* 2013. № 4(58). С. 50–57.
3. *Петренко В. М.* Лимфатическая система и организация иммунитета // *Инновационная наука.* 2017. № 9. С. 68–70.
4. *Романов В. О., Любовцева Л. А., Воробьева О. В., Романова Л. П.* Локализация CD8-позитивных клеток лимфатических узлов в различные сроки после введения аллогенного костного мозга // *Морфологические ведомости.* 2021. № 30(1). С. 549. DOI: [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2022.30\(1\).549](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2022.30(1).549)
5. *Abbas A. K., Lichtman A. H., Pillai S.* Cellular and Molecular Immunology. 8<sup>th</sup> Edition. Wiley: New Jersey, 2014. P. 544.
6. *Ochando J., Kwan W.H., Ginhoux F., Hutchinson J. A., Hashimoto D., Collin M.* Mononuclear phagocytic system in organ transplantation. *Am. J. Transplant.* 2016; 16(4):1053–1069.
7. *Ordikhani F., Pothula V., Sanchez-Tarjuelo R., Jordan S., Ochando J.* Macrophages in Organ Transplantation. *Front. Immunol.* 2020; 11:582939. DOI: 10.3389/fimmu.2020.582939
8. *Hori S.* FOXP3 as a master regulator of Treg cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2021; 21:618–619. DOI: 10.1038/s41577-021-00598-9