

Д. Б. Нижегородова¹, А. С. Щеколова², А. И. Зинченко², М. Ю. Юркевич¹,
Г. И. Иванчик³, М. М. Зафранская¹, С. Б. Бокуть¹

¹Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова
Белорусского государственного университета, г. Минск, Республика Беларусь

²ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

³ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»,
г. Минск, Республика Беларусь

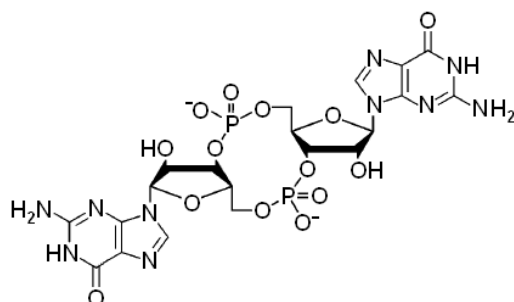
ВЛИЯНИЕ c-di-GMP НА ПРОДУКЦИЮ ИНТЕРФЕРОНА- γ МОНОНУКЛЕАРАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ *IN VITRO*

Установлено разнонаправленное влияние c-di-GMP на митоген- и антиген-специфическую продукцию ИФН γ мононуклеарами периферической крови человека, что может быть использовано для разработки принципиально новых терапевтических агентов, лимитирующих неблагоприятное воздействие экологических факторов на формирование иммунологически-обусловленной патологии человека.

► **Ключевые слова:** циклический дигуанилат, интерферон- γ , митоген, миелин-индуцируемая реактивность.

Введение

Бис-(3',5')-циклический димерный гуанозинмонофосфат (c-di-GMP) (рис. 1) представляет собой внутриклеточный вторичный мессенджер, являющийся принципиальной иницирующей молекулой в c-di-GMP-зависимых сигнальных путях реализуемых только у *Bacteria* и *Archea*, но не эукариот, с целью регуляции множества биологических процессов, включая подвижность и адгезию бактериальных клеток, межклеточные коммуникации, синтез экзополисахаридов, формирование биопленок и экспрессию генов вирулентности [1]. Вместе с тем, в исследованиях последних лет установлено, что c-di-GMP способен выступать в роли аллостерического регулятора транспортной функции гемоглобина человека [2]. Показано также, что c-di-GMP может действовать как «сигнал опасности» на эукариотические клетки и проявлять как заметную противоопухолевую активность, ингибируя пролиферацию раковых клеток *in vitro* [3], так и выраженную иммуномодулирующую адьювантную активность в отношении различных бактериальных инфекций [4, 5]. Вдобавок одним из проявлений иммуномодулирующей активности c-di-GMP может служить обнаруженная способность данного соединения влиять на продукцию интерферонов (ИФН) клетками иммунной системы.



c-di-GMP

Рисунок 1 – Структурная формула 3',5'-циклического димерного гуанозинмонофосфата

Известно, что интерферон- γ (ИФН γ) представляет собой один из основных цитокинов, который участвует в регуляции механизмов врожденного и приобретенного иммунитета, клеточного цикла, процессов апоптоза и воспалительной реакции посредством контроля транскрипции широкого спектра генов. Особенную функцию ИФН γ играет в увеличении чувствительности иммунной системы к агонистам инфекционной и опухолевой природы [6].

Цель работы – оценить спонтанную, митоген- и миелин-индуцированную продукцию ИФН γ мононуклеарами периферической крови (МПК) у здоровых доноров в отсутствие и в присутствии различных концентраций c-di-GMP.

Материалы и методы

Материалом для исследования явилась гепаринизированная периферическая венозная кровь здоровых доноров ($n = 5$).

Культуральный метод. МПК выделяли центрифугированием в течение 30 мин при 1500 об/мин и 4 °С в градиенте плотности Histopaque-1077 («Sigma», Германия) с последующей 2-кратной отмывкой в фосфатно-буферном растворе (ФБР, «Gibco», Германия) в течение 10 мин при 1500 об/мин и 4 °С. МПК культивировали в концентрации $2 \cdot 10^5$ клеток/лунку 96-луночного планшета в культуральной среде RPMI-1640 с добавлением 25 мМ HEPES, 2 мМ L-глутамина, 1% антибиотика («Sigma», Германия), 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки («Gibco», Германия), в течение 3 дней (при оценке внутриклеточной продукции ИФН γ), в течение 6 и 10 дней (при оценке внеклеточного синтеза ИФН γ , соответственно, при митогенной и миелин-специфической стимуляции) при 37 °С в атмосфере с 5% содержанием CO $_2$. По окончании культивирования супернатанты клеточных культур отбирали в стерильные эппендорфы и замораживали при -70 °С.

Исследуемый образец *c-di-GMP* синтезировали в Институте микробиологии из GTP с использованием рекомбинантной дигуанилатциклазы *Thermotoga maritima* [7] и добавляли в культуру клеток в концентрациях 10^{-6} М, 10^{-5} М, 10^{-4} М. В качестве митогена использовали фитогемагглютинин (ФГА, «Sigma», Германия) в конечной концентрации 2,5 мкг/мл; в качестве миелинового антигена – рекомбинантный миелин-олигодендроцитарный гликопротеин с аминокислотной последовательностью 1-125 (рМОГ, РНПЦ ТиМБ, Беларусь) в конечной концентрации 10 мкг/мл.

Метод проточной цитофлуориметрии. Для количественного определения уровня внутриклеточной продукции ИФН γ за 12 часов до окончания культивирования продукцию цитокина стимулировали путем добавления в культуру МПК форбол 12-миристат 13-ацетата (10 нг/мл) («Sigma», Германия), кальциевой соли иономицина (1 мкг/мл) («Invitrogen», Великобритания) и блокатора внутриклеточного транспорта белков – брефелдина А (10 мкг/мл) («Invitrogen», Великобритания) с последующим окрашиванием МПК моноклональными антителами к поверхностному маркеру – CD3-PC7 («Beckman Coulter», США) и дальнейшей фиксацией клеток в течение 10 мин 4% раствором параформальдегида в ФБР. После отмывания клеток центрифугированием в ФБР в течение 5 мин при 1500 об/мин, к МПК добавляли моноклональные антитела IFN γ -PE («Beckman Coulter», США). Учет результатов проводили на проточном цитометре FC500 («Beckman Coulter», США) на 50 000 клеточных событий.

Иммуноферментный анализ. Концентрацию ИФН γ , синтезируемого клетками, определяли в клеточных супернатантах митоген-/миелин-стимулированных культур МПК методом иммуноферментного анализа. Для характеристики внеклеточной продукции ИФН γ использовали набор для иммуноферментного анализа «гамма-интерферон-ИФА-БЕСТ» (А-8752, «Вектор-Бест», Россия) в соответствии с рекомендациями изготовителя. Образцы супернатантов культур клеток, а также стандартные и контрольные образцы инкубировали с иммобилизованными на стенках 96-луночного планшета моноклональными антителами к цитокину в течение 120 мин при температуре 37 °С в шейкере. После удаления образцов и тщательного отмывания в лунки добавляли биотинилированные антитела и инкубировали в течение 60 мин при температуре 37 °С в шейкере. Не связавшиеся антитела удаляли 5-кратным отмыванием буферным раствором, добавляли стрептавидин с пероксидазой хрена и инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С в шейкере. Несвязавшийся конъюгат удаляли 5-кратным отмыванием буферным раствором, добавляли субстратную смесь и инкубировали 25 мин при комнатной температуре, а затем вносили стоп-реагент. Измерение оптической плотности раствора в лунках и соответствующей концентрации цитокина в образцах выполняли с использованием иммуноферментного анализатора «ThermoFischer» (Германия) при $\lambda = 450$ нм, референс – $\lambda = 620$ нм.

Статистический метод. Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета Statistica 7.0. Полученные данные представлены в медианах с 25% и 75% процентилями. Определение достоверности различий осуществляли непараметрическим критерием Вилкоксона для зависимых переменных. Проверка на нормальность распределения выполнялась с использованием критерия Холмогорова-Смирнова. Во всех случаях результаты принимали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Влияние *c-di-GMP* на спонтанную продукцию ИФН γ в культурах МПК. Нестимулированная внутриклеточная и внеклеточная продукция ИФН γ оценивалась, соответственно, в 3- и 6/10-дневных культурах МПК здоровых доноров в отсутствие и в присутствии *c-di-GMP*.

На рис. 2 представлены оригинальная точечная диаграмма и ее проекция в виде гистограммы, полученные в результате проточной цитофлуориметрии, на которых отражено распределение внутри-

клеточной продукции ИФН γ среди CD3-позитивных (CD3⁺) и CD3-негативных (CD3⁻) субпопуляций МПК у здорового донора. Установлено, что в культурах МПК основными клетками-продуцентами ИФН γ являются субпопуляции, не экспрессирующие Т-клеточный маркер CD3, к которым относят натуральные киллеры (НК-клетки), НКТ-клетки, В-лимфоциты и специализированные антиген-презентирующие клетки (АПК). Так, в отсутствие с-di-GMP количество CD3-негативных клеток, синтезирующих ИФН γ , в 21,4 раза превышало таковое в субпопуляции CD3⁺Т-лимфоцитов (табл. 1).

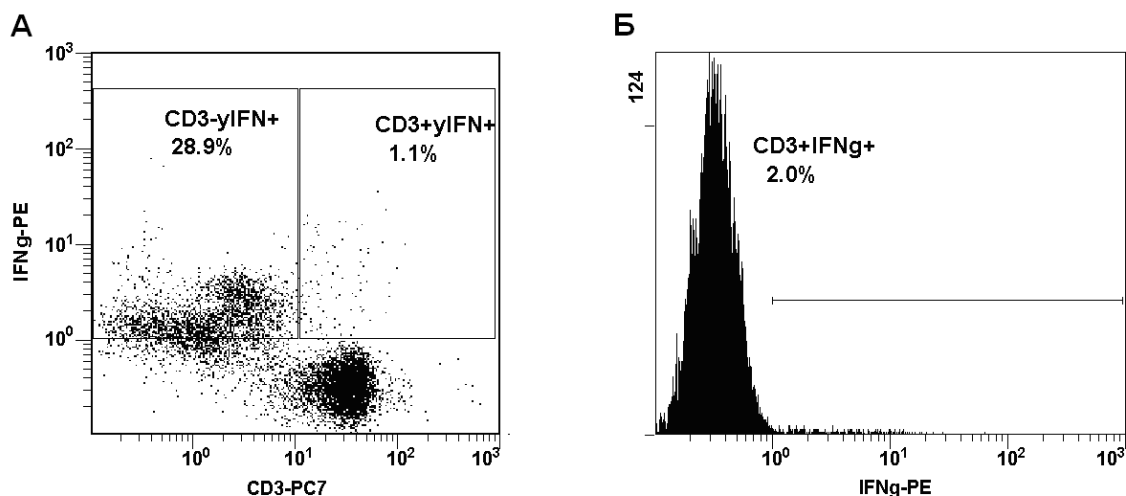


Рисунок 2 – Распределение внутриклеточной продукции ИФН γ клетками с фенотипом CD3⁺ и CD3⁻ среди МПК, культивируемых в питательной среде в течение 3 дней:

А – точечная диаграмма распределения внутриклеточной продукции ИФН γ среди МПК, по оси X отобрано распределение CD3⁺ и CD3⁻ субпопуляций МПК, по оси Y – ИФН γ ⁺ и ИФН γ ⁻ клеток;
Б – гистограмма уровня внутриклеточной продукции ИФН γ CD3⁺Т-лимфоцитами

При добавлении с-di-GMP в культуру МПК в концентрациях 10⁻⁶–10⁻⁴ М обнаружена тенденция к увеличению внутриклеточной продукции ИФН γ CD3-негативными клетками в 1,29 (1,25ч1,3) раза, в то время как удельное содержание CD3⁺ИФН γ ⁺Т-лимфоцитов повышалось в 2,9 (2,5ч3,3) раза. К Т-лимфоцитам, активно синтезирующим ИФН γ , относят цитотоксические CD3⁺CD8⁺ Т-клетки, $\gamma\delta$ -лимфоциты с фенотипом CD3⁺CD4⁻CD8⁻ и некоторые популяции CD3⁺CD4⁺ Т-клеток. Дозозависимого эффекта с-di-GMP в отношении спонтанной внутриклеточной продукции ИФН γ не отмечено (табл. 1).

Таблица 1

Спонтанная внутриклеточная продукция ИФН γ (%) различными субпопуляциями клеток в культурах МПК в присутствии с-di-GMP

Культура клеток	Культуральная среда	с-di-GMP		
		1·10 ⁻⁶ М	1·10 ⁻⁵ М	1·10 ⁻⁴ М
CD3 ⁺ ИФН γ ⁺ Т-клетки	1,14 (0,9ч1,3)	3,78 (2,9ч4,2)	2,84 (2,6ч4,5)	3,36 (3,1ч4,9)
CD3 ⁻ ИФН γ ⁺ клетки	24,4 (18,9ч26,2)	31,7 (28,7ч35,4)	30,5 (29,2ч36,1)	31,5 (28,3ч35,9)

Характеристика внеклеточной нестимулированной продукции ИФН γ в 6- и 10-дневных культурах МПК представлена в табл. 2. Показано, что концентрация ИФН γ в культурах МПК увеличивалась пропорционально продолжительности культивирования клеток. В присутствии с-di-GMP в 6-дневных культурах МПК наблюдалось статистически значимое дозозависимое повышение внеклеточного спонтанного синтеза ИФН γ , в то время как в 10-дневных культурах МПК концентрация ИФН γ увеличивалась лишь при стимуляции МПК с-di-GMP в концентрации 10⁻⁴ М.

Влияние с-di-GMP на митоген-индуцированную внеклеточную продукцию ИФН γ в культурах МПК. Культивирование МПК в условиях митогенной стимуляции приводило к статистически значимому резкому увеличению внеклеточного ИФН γ (994 (368ч1621) пг/мл) по сравнению со спонтанным синтезом цитокина (14,3 (13,0ч15,6) пг/мл). Добавление с-di-GMP в низких концентрациях (1·10⁻⁶–1·10⁻⁵ М) в культуру ФГА-стимулированных МПК не влияло на синтез ИФН γ клетками, в то время как при высокой концентрации с-di-GMP (1·10⁻⁴ М) наблюдалось статистически значимое повышение митоген-индуцированной продукции цитокина МПК у здоровых доноров (рис. 3).

Концентрация ИФН γ (пг/мл) в супернатантах нестимулированных культур МПК

Культура клеток	Культуральная среда	с-di-GMP		
		$1 \cdot 10^{-6}$ М	$1 \cdot 10^{-5}$ М	$1 \cdot 10^{-4}$ М
6-дневные МПК	14,3 (13,0ч15,6)	22,6 * (17,4ч27,8)	79,1 * (76,0ч82,1)	175,6 * (140,0ч211,0)
10-дневные МПК	28,3 (20,0ч36,5)	28,3 (27,8ч28,7)	27,8 (27,6ч28,9)	213,3 * (48,0ч378,5)

Примечание: «*» – статистически значимые различия с уровнем достоверности $p < 0,05$

Приведенные данные согласуются с результатами, полученными нами ранее, которые показали, что с-di-GMP в низких концентрациях не влияет на митоген-стимулированную пролиферацию Т-лимфоцитов. Только в присутствии высоких концентраций ($1 \cdot 10^{-4}$ М) циклического дигуанилата наблюдалось его незначительное иммуносупрессивное действие (коэффициент супрессии варьировал в диапазоне 9,9–27,7%) [8].

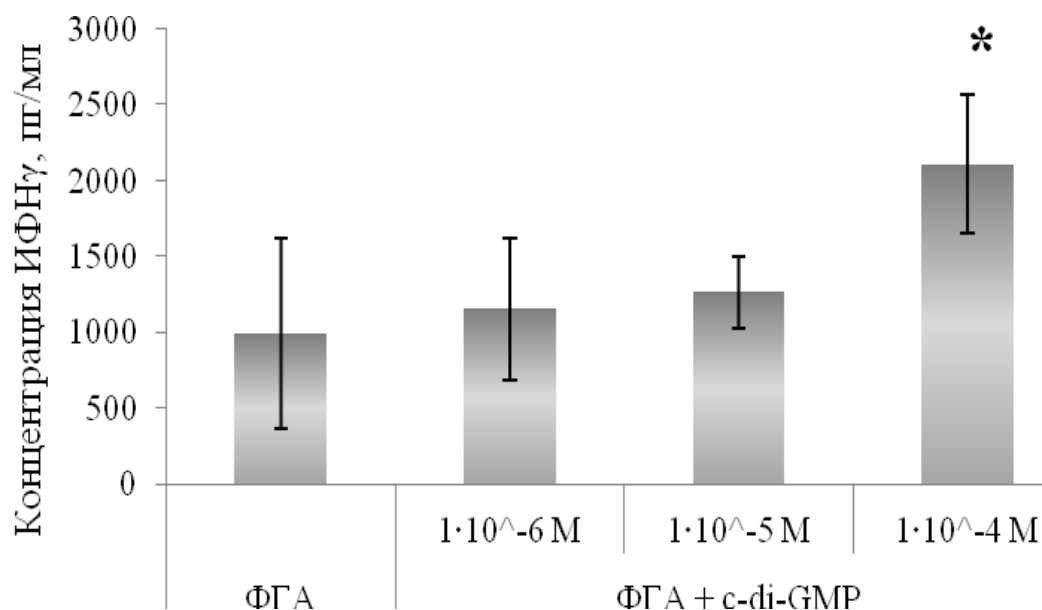


Рисунок 3 – Внеклеточная продукция ИФН γ (пг/мл) в митоген-стимулированных культурах МПК в присутствии различных концентраций с-di-GMP: * – $p < 0,05$

Принимая во внимание, что основными клетками-продукторами ИФН γ являются популяция CD3-негативных клеток, а митогенная активность ФГА проявляется не только в отношении Т-лимфоцитов, но и НК-клеток [9], и учитывая иммуносупрессивный эффект с-di-GMP в высоких дозах на клеточную пролиферацию CD3⁺Т-лимфоцитов, можно заключить, что с-di-GMP в высокой концентрации оказывает цитокин-стимулирующее действие на субпопуляцию НК-клеток. Данная популяция опосредует ранний неспецифический иммунный ответ по отношению к вирус-инфицированным клеткам, внутриклеточным бактериям и паразитам, а также модулирует активность других эффекторных клеток врожденного и приобретенного иммунитета посредством продукции цитокинов и реализации контактного киллинга трансформированных и инфицированных клеток.

Влияние с-di-GMP на антиген-специфическую внеклеточную продукцию ИФН γ в культурах МПК. Для оценки влияния с-di-GMP на антиген-индуцированную секрецию ИФН γ в качестве специфического антигена использовали рМОГ, потенциальные аутореактивные клоны лимфоцитов к которому в норме могут циркулировать в организме здорового донора [10]. Культивирование МПК в условиях миелиновой стимуляции сопровождалось статистически значимым увеличением антиген-специфической продукции ИФН γ (66,4 (40,0ч92,9) пг/мл) по сравнению со спонтанным синтезом цитокина (28,3 (20,0ч36,5) пг/мл). Однако при добавлении с-di-GMP в культуру миелин-индуцированных МПК регистрировалась противоположная митоген-индуцированному синтезу динамика продукции ИФН γ : отмечалось статистически значимое снижение внеклеточной секреции цитокина, независимо от концентрации циклического дигуанилата (рис. 4).

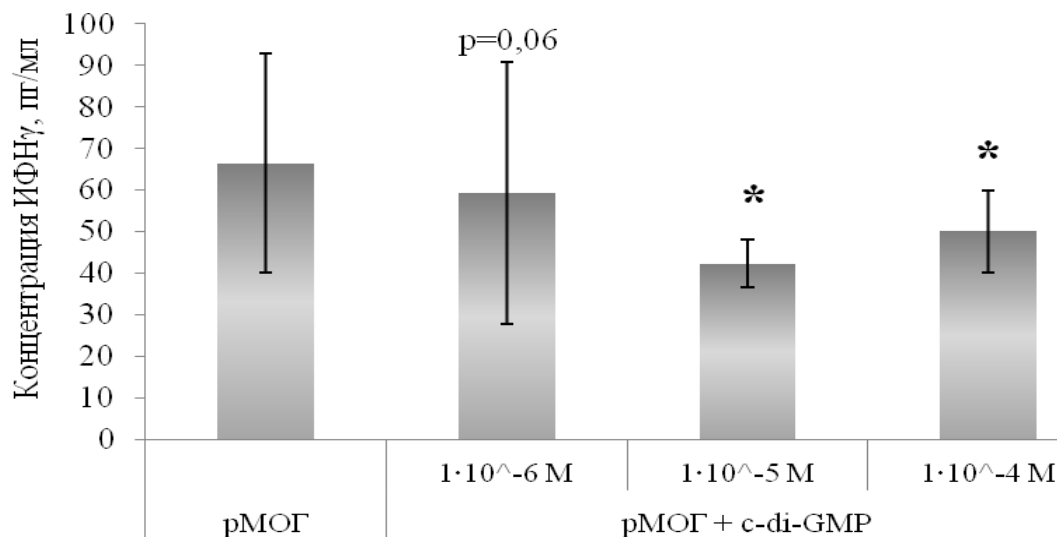


Рисунок 4 – Внеклеточная продукция ИФН γ (пг/мл) в миелин-стимулированных культурах МПК в присутствии различных концентраций c-di-GMP: * – $p < 0,05$

Полученные ранее данные также свидетельствуют о специфическом дозозависимом иммуносупрессивном эффекте c-di-GMP на миелин-специфическую пролиферацию CD3⁺T-лимфоцитов (коэффициент супрессии варьировал в диапазоне 8,2–90,5%) [11]. Известно, что в культуре клеток в ответ на стимуляцию аутоантигеном пролиферируют лишь потенциально аутореактивные Т-лимфоциты, Т-клеточный рецептор которых способен распознавать антигенную детерминанту pMOG. К таким лимфоцитам относятся как CD3⁺CD4⁺T-хелперы, так и цитотоксические CD3⁺CD8⁺T-клетки [12]. При этом и те, и другие обладают способностью к секреции ИФН γ , который, в свою очередь, склонен проявлять не только иммуномодулирующее действие, но и инициировать иммунопатологические реакции аутоиммунного характера.

Выводы

Низкие концентрации c-di-GMP могут быть использованы для терапии иммунообусловленных патологий, поскольку не оказывают ингибирующего действия на неспецифический синтез ИФН γ клетками иммунной системы, что может учитываться при разработке качественно новых терапевтических препаратов. Более высокие концентрации c-di-GMP способствуют митоген-индуцированной активации ИФН γ -секретирующих клеток врожденного иммунитета. Наряду с подавлением специфической пролиферации Т-лимфоцитов, c-di-GMP способен также модулировать процессы миелин-стимулированной дифференцировки Т-лимфоцитов в эффекторные клетки, продуцирующие ИФН γ , что дает основание предполагать вовлеченность c-di-GMP в трансдукцию сигнала синтеза ИФН γ .

Список литературы

1. Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis / D. Kalia [et al.] // Chem. Soc. Rev. – 2013. – Vol. 42. – Pp. 305–341.
2. Комплексообразование бис-(3',5')-циклического димерного гуанозинмонофосфата с гемоглобином человека / В.А. Головач [и др.] // Докл. НАН Беларуси. – 2014. – Т. 58, №4. – С. 82–86.
3. 3',5'-cyclic diguanylic acid (c-di-GMP) inhibits basal and growth factor-stimulated human colon cancer cell proliferation / D.K.R. Karaolis [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2005. – Vol. 329. – Pp. 40–45.
4. Libanova, R. Cyclic di-nucleotides: new era for small molecules as adjuvants / R. Libanova, P.D. Becker, S.A. Guzman // Microbial Biotechnol. – 2012. – Vol. 5. – Pp. 168–176.
5. Evidence for cyclic diguanylate as a vaccine adjuvant with novel immunostimulatory activities / P.M. Gray [et al.] // Cell Immunol. – 2012. – Vol. 278. – Pp. 113–119.
6. Schroder, K. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions / K. Schroder, P. Hertzog, T. Ravasi, D. Hume // J. Leukoc. Biol. – 2004. – Vol. 75. – Pp. 163–189.
7. Korovashkina, A.S. Enzymatic synthesis of c-di-GMP using inclusion bodies of *Thermotoga maritima* full-length diguanylate cyclase / A.S. Korovashkina, A.N. Rymko, S.V. Kvach, A.I. Zinchenko // J. Biotechnol. – 2012. – Vol. 164, N 2. – Pp. 276–280.
8. Головач, В. А., Нижегородова, Д. Б., Макарова, Т. П., Щеколова, А. С., Зинченко, А. И., Зафранская, М. М., Бокуть, С. Б. Влияние бис-(3',5')-циклического димерного гуанозинмонофосфата (c-di-

GMP) на индуцированную митогенами пролиферацию Т-лимфоцитов. Метаболический синдром: эксперимент, клиника, терапия = Metabolic syndrome: experiment, clinics and therapy : сб. науч. ст. / НАН Беларуси [и др.] ; редкол.: Л. И. Надольник (гл. ред.) [и др.]. – Гродно : ГрГУ, 2015. – С. 221–226.

9. Regulatory NK cells suppress antigen-specific T-cell response / G. Deniz [et al.] // J. Immunol. – 2008. – Vol. 180. – Pp. 850–857.

10. Autoreactive T cells in healthy individuals / N. Danke [et al.] // J. Immunol. – 2004. – Vol. 172. – Pp. 5967–5972.

11. Нижегородова, Д. Б. Иммуномодулирующее действие c-di-GMP на функциональную активность Т-лимфоцитов / Д. Б. Нижегородова, А. С. Щеколова, А. И. Зинченко, М. М. Зафранская, С. Б. Бокуть // Радиация, экология и техносфера = Radiation, environmental and man – risk factor : материалы респ. науч. – практ. конф. (Гомель, 3-4 дек. 2015 г.) / редкол. : И. А. Чешник (гл. ред. [и др.]). – Минск : Ин-т радиэкологии, 2015. – С. 69–73.

12. Zafranskaya, M. Interferon- β therapy reduces CD4+ and CD8+ T-cell reactivity in multiple sclerosis // M. Zafranskaya, P. Oschmann, R. Engel, A. Weishaupt, J. van Noort, H. Jomaa, M. Eberl // Immunology. – 2007. – Vol. 121, N1. – Pp. 29–39.

**D. B. Nizheharodava, A. S. Shchekolova, A. I. Zinchenko, M. Yu. Yurkevich,
G. I. Ivanchyk, M. M. Zafranskaya, S. B. Bokut**

THE EFFECT OF c-di-GMP ON INTERFERON- γ PRODUCTION BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS IN VITRO

Cyclic dimeric guanosine 3',5'-monophosphate effects mitogen- and antigen-specific IFN γ production by human peripheral blood mononuclear cells differently what may be used for design of qualitatively new therapeutic agents.