РАЗДЕЛ III. БИОЛОГИЯ

Головачева Н.А.¹, Сафронова Е.А.¹, Николаев Р.В.²

Дендритные клетки, нагруженные наночастицами с мРНК pp65 CMV, как инструмент для генерации CMV специфичных Т-клеток

¹Московский государственный университет технологий и управления им. К.Г. Разумовского (Первый казачий университет)²НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева
(Россия, Москва)

doi: 10.18411/lj-03-2021-18

ids: lj-03-2021-18

Аннотация

На основании проведённого исследования мы выяснили, что использование дендритных клеток приводит к значительному росту Т-клеточного иммунного ответа в отношении pp65 CMV. Проведена оценка генерации CMV специфичных Т-клеток методом ELISPOT. Результаты полученные по окончании работы показали очевидный рост количества клеток при их инкубации с нагруженными дендритными клетками. Согласно подсчётам, после инкубации с МНК+ CMVpp65 составило 0.09 ± 0.3 клеток, после инкубации с ДК+ CTL 0.91 ± 1.14 клеток, ненагруженных ДК + МНК – 1.27 ± 1.1 , а нагруженных ДК +МНК 25.09 ± 9.55 клеток, соответственно.

Ключевые слова: цитомегаловирус, pp65CMV, дендритные клетки, мононуклеарные клетки, ELISPOT.

Abstract

Based on our research, we found that the use of dendritic cells leads to a significant increase in the T-cell immune response against pp65 CMV. The generation of CMV-specific T cells was assessed by ELISPOT. The results obtained at the end of the work showed an obvious increase in the number of cells during their incubation with loaded dendritic cells. According to calculations, after incubation with MNC + CMVpp65 it was 0.09 ± 0.3 cells, after incubation with DC + CTL 0.91 ± 1.14 cells, unloaded with DC + MNC - 1.27 ± 1.1 , and those loaded with DC + MNC 25.09 ± 9.55 cells, respectively.

Keywords: cytomegalovirus, pp65CMV, dendritic cells, mononuclear cells, ELISPOT.

Цитомегаловирус (CMV), представитель семейства β -герпесвирусов, является причиной заболеваемости и смертности у реципиентов трансплантатов и органов гемопоэтических стволовых клеток. После первичного проникновения ЦМВ сохраняется в течение жизни инфицированного носителя. У иммунокомпетентных людей это скрывающееся состояние достаточно эффективно контролируется всей иммунной системой, этот факт доказывает низкая вирусная нагрузка, сильный CMV-специфический клеточный иммунный ответ, опосредованный Т-клетками, против определенных иммунодоминантных мишеней, таких как белок pp65 CMV [1, 4]. Было высказано предположение, что для долгосрочного контроля над вирусом ЦМВ-специфические Т-клетки также важны для иммунной защиты против ЦМВ. Для обнаружения Т-лимфоцитов, продуцирующих CMVpp65-специфический интерферон (IFN), криоконсервированные моноциты периферической крови (PBMC) здоровых людей и пациентов были использованы в иммуноферментном анализе IFN- γ после повторного испытания *in vitro* с ЦМВ pp65 антигенами.

В настоящее время дендритные клетки изучаются во всём мире активнее, причем интерес к ним не перестаёт расти. Это связано с ролью, которую ДК играют в

организме не только в развитии иммунного ответа, но также в формировании и поддержании различных патологических процессов. ДК рассматриваются как важный инструмент в иммунотерапии инфекционных, онкологических, а также аутоиммунных и аллергических заболеваний [2, 3].

В связи с этим целью наших исследований было выявление возможности использования дендритных клеток, нагруженных наночастицами с мРНК pp65 CMV, в качестве инструмента для генерации CMV специфичных Т-клеток.

Материалы и методы. Работа проводилась в лаборатории «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России и на кафедре биологии и ихтиологии МГУТУ им. К.Г. Разумовского (ПКУ).

Материалом для определения влияния нагруженных дендритных клеток на Т-клеточный иммунитет послужили 11 образцов периферической крови от CMV серонегативных здоровых мужчин и женщин возрастом от 18 до 33 лет.

В начале эксперимента произвели выделение мононуклеаров из периферической крови (рис. 1).

Рис. 1 – Кровь, смешанная со средой RPMI в соотношении 1:1

Рис. 2 – Набор реагентов для проведения иммуномагнитной сепарации моноцитов

После выделения мононуклеарной фракции использовали метод иммуномагнитной сепарации моноцитов с помощью набора Monocyte Isolation Kit 2 human (рис. 2).

После этого получали зрелые дендритные клетки из моноцитов, нагружали липидными наночастицами мРНК pp65 CMV и производили оценку генерации CMV специфичных Т-клеток.

Анализ полученных результатов проводился с использованием программного продукта CTL ImmunoSpot.

Результаты исследований. В результате выделения мононуклеарных клеток из 11 проб крови от серонегативных здоровых мужчин и женщин в возрасте от 18 до 33 лет мы получили достаточное количество жизнеспособных клеток (табл. 1).

Как видно из данных таблицы 1, мононуклеары периферической крови людей выделялись в количестве от $2.2-5.6 \times 10^6$ клеток в 10 мкл, а их среднее количество составляло $3.9 \pm 0.99 \times 10^6$ клеток в 10 мкл. Разное количество жизнеспособных клеток могло зависеть от исходного количества набранной периферической крови и от индивидуальных факторов (возраста, питания, физических нагрузок, вредных привычек, климатических условий проживания).

Таблица 1

Результаты выделения мононуклеарной фракции клеток, моноцитов и дендритных клеток от крови 11 серонегативных здоровых людей

№ п/п	Количество мононуклеаров ($\times 10^6$)	Количество моноцитов ($\times 10^6$)	Количество дендритных клеток ($\times 10^6$)
1	3.5	1.75	0.4
2	4.8	3.2	0.7

3	3.1	2.06	0.4
4	3.5	2.3	0.3
5	4.1	2.05	0.4
6	5.2	3.4	0.7
7	3.8	2.5	0.5
8	3.3	1.65	0.4
9	4.2	2.8	0.6
10	2.2	1.47	0.6
11	5.6	2.8	0.7
M±m	3.9± 0.99	2.36 ±0.64	0.52±0.15

В результате проведения иммуномагнитной сепарации все присутствующие клетки остались в магнитной колонке, а нужные нам моноциты прошли вниз в пробирку. Моноциты периферической крови выделялись в количестве от $1,47$ до $3,4 \times 10^6$ клеток в 10 мкл, а их среднее значение составило $2,36 \pm 0,64 \times 10^6$ клеток в 10 мкл. (табл. 1).

После получения моноцитов методом иммуномагнитной сепарации был процесс создания незрелых дендритных клеток, далее зрелых и нагруженных липидными наночастицами с мРНК pp65 CMV. Дендритные клетки выделялись в количестве от 0.3 до $0,7 \times 10^6$ клеток в 10 мкл, а их среднее значение составило $0,52 \pm 0,15 \times 10^6$ клеток в 10 мкл.

Зрелость ДК видна по их морфологии и по присутствию или отсутствию некоторых маркерных молекул на поверхности. Методом проточной цитометрии наблюдали, что полученные клетки по наличию поверхностных маркеров соответствуют зрелым дендритным клеткам. Проточная цитометрия проводилась с применением флуоресцентно-меченных моноклональных антител к HLA-DR, CD83, HLA-ABC, CD86 производства Becton-Dickinson на цитофлуориметре FacsCantoII.

Данный график представлял экспрессию маркеров CD83 и HLA-DR в пределах 91.0-91.6 %, тогда как маркеры CD86 и HLA-ABC составляли 83.0 и 87.0 %, соответственно.

Обобщенные данные полученные данные после анализа на проточном цитометре свидетельствуют о том, что выращенные дендритные клетки каждого из 11 образцов исследуемой крови высоко экспрессировали маркеры зрелых дендритных клеток. Маркер CD83, экспрессировал в среднем на 80.8 %, тогда как маркер CD86 80.8%, HLA- ABC составляла 83.4%, а HLA-DR - 85%, соответственно.

После инкубации с МНК+ CMVpp65 составило $0,09 \pm 0,3$ клеток, после инкубации с ДК+ CTL $0,91 \pm 1,14$ клеток, ненагруженных ДК + МНК - $1,27 \pm 1,1$, а нагруженных ДК +МНК $25,09 \pm 9,55$ клеток, соответственно. Результаты подсчёта выращенных клеток методом ELISPOT представлены на рисунках 4-7.

Рис. 4. МНК + CMVpp65

Рис. 5. Нагруженные ДК + CTL

Рис. 6. Ненагруженные ДК + МНК

Примечание: МНК – мононуклеарные клетки; CMV – цитомегаловирус; pp65 – белок CMV; ДК – дендритные клетки; CTL – специализированная среда.

Рис. 7. Нагруженные ДК + МНК

Таким образом, на основании проведенного исследования мы выяснили, что использование дендритных клеток приводит к значительному росту Т-клеточного иммунного ответа в отношении pp65 CMV. Проведена оценка генерации CMV специфичных Т-клеток методом ELISPOT. Результаты полученные по окончании работы показали очевидный рост количества клеток при их инкубации с нагруженными дендритными клетками.

1. Выдумкина С.П., Зазимко Л.А., Кузенкова А.В. Частота острой цитомегаловирусной инфекции среди лиц разновозрастных групп // Вопросы вирусологии. 1999. № 1. С. 19-21.
2. Kholodnova N.V. A modern view of the problem of congenital cytomegalovirus infection: diagnosis, treatment and prevention / N.V. Kholodnova, L.N. Mazankova, A.A. Volter, I.E. Turina // Detskiye Infektsii Children's Infections. 2019; 18(4):56-63
3. Sergeeva O.V. mRNABased Therapeutics – Advances and Perspectives / O. V. Sergeeva, V. E. Koteliansky, T. S. Zatsepin // BIOCHEMISTRY (Moscow), 2016, Vol. 8, No. 7, pp. 709-722.
4. Tortorella D. Viral subversion of the immun-system / Tortorella D., Gewurz B.E., Furman M.H. // Ann. Rev. Immunol. 2000 Vol. 18 № 1 P. 861-926.

Гринько Н.Н.

Полиморфизм фенотипических признаков сортов фасоли овощной (*Phaseolus vulgaris* L.), сокультивируемых в малообъемной гидропонике с семенными салатами (*Lactuca sativa* L.) из генофонда ВИР

*Адлерская опытная станция–филиал ФГБНУ ФИЦ ВИГРР им. Н.И.Вавилова
(ВИР)
(Россия, Сочи)*

doi: 10.18411/lj-03-2021-19

idsp: ljjournal-03-2021-19

Аннотация

Определена изменчивость фенотипических признаков сортов фасоли овощной (*Phaseolus vulgaris* L.), сокультивируемых с семенными салатами (*Lactuca sativa* L.) из генофонда ВИР в малообъемной гидропонике. Отобраны сорта с ценными фенотипическими признаками – раннеспелость, высота растения, число бобов/растения, длина боба, ширина боба, масса боба, число семян/боб, масса 100 шт семян.

Ключевые слова: фасоль овощная (*Phaseolus vulgaris* L.), ценные фенотипические признаки, раннеспелость, высота растения, число бобов/ растения, длина боба, ширина боба, масса боба, число семян / боб, масса 100 шт семян, сокультивирование, генофонд салатов (*Lactuca sativa* L.) ВИР, малообъемная гидропоника.