

**Т.В. Тыринова, Л.В. Сахно, А.Ю. Моренкова, М.А. Тихонова, Н.А. Ильина,
О.А. Чумасова, Н.С. Шкаруба, А.Э. Сизиков, Е.Р. Черных**

ОСОБЕННОСТИ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ МИЕЛОИДНЫМИ СУПРЕССОРНЫМИ КЛЕТКАМИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ PD-1 И TIM-3

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Российская Федерация

Резюме. Ингибиторные чекпойнт рецепторы TIM-3 и PD-1 являются важными негативными регуляторами, участвующими в ограничении иммунного ответа. Наиболее подробно биологическая значимость ингибиторных рецепторов описана для Т-клеток, тогда как для других типов клеток остается малоизученной. **Цель исследования:** изучить экспрессию рецепторов PD-1 и TIM-3 на моноцитарных миелоидных супрессорных клетках в норме и при ревматоидном артрите, а также оценить цитокин-продуцирующую активность моноцитарных миелоидных супрессорных клеток, оппозитных по экспрессии PD-1 и TIM-3. **Материалы и методы.** В исследование было включено 30 здоровых доноров и 31 пациент с ревматоидным артритом высокой или умеренной активности ($DAS28_{CO3} \geq 3,2$), получающие стандартную базисную противовоспалительную терапию. Оценку экспрессии PD-1 и TIM-3 в моноцитарных миелоидных супрессорных клетках, а также внутриклеточную продукцию цитокинов оценивали методом проточной цитометрии. **Результаты исследования.** Установлено, что моноцитарные миелоидные супрессорные клетки экспрессируют рецепторы TIM-3 и PD-1. При ревматоидном артрите содержание моноцитарных миелоидных супрессорных клеток значимо повышено ($p_U=0,02$), однако экспрессия рецептора PD-1 снижена ($p_U=0,0001$) в сравнении с контрольной группой. Экспрессия PD-1 прямо коррелирует со скоростью оседания эритроцитов ($p=0,04$), экспрессия TIM-3 – с СОЭ ($p=0,025$), $DAS28_{CO3}$ ($p=0,002$) и индексом активности CDAI (Clinical Disease Activity Index) ($p=0,034$). Установлено, что в TIM-3⁺ и PD-1⁺ моноцитарных миелоидных супрессорных клетках спонтанная продукция TNF и IL-10 выше более чем в 2 раза в сравнении с моноцитарными миелоидными супрессорными клетками, негативными по экспрессии TIM-3 и PD-1 ($p_W<0,05$). В ответ на TLR4-стимуляцию TIM-3⁺ и PD-1⁺ моноцитарных миелоидных супрессорных клеток они характеризуются меньшей способностью к продукции TNF и более выраженной – к продукции IL-10 в сравнении с моноцитарными миелоидными супрессорными клетками, негативными по экспрессии TIM-3 и PD-1 ($p_W<0,05$). **Заключение.** Дальнейшие исследования в этой области позволят выяснить, каким образом изменения экспрессии TIM-3 и PD-1 вовлечены в патогенез воспалительных заболеваний, а также установить возможные нарушения функциональной активности, ассоциированные с дисбалансом экспрессии ингибиторных рецепторов на миелоидных супрессорах.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, моноцитарные миелоидные супрессоры, фактор некроза опухоли, интерлейкин 10, чекпойнт рецепторы

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Тыринова Тамара Викторовна

tyrinova@bk.ru

Дата поступления: 01.09.2024

Образец цитирования: Тыринова Т.В., Сахно Л.В., Моренкова А.Ю., Тихонова М.А., Ильина Н.А., Чумасова О.А., Шкаруба Н.С., Сизиков А.Э., Черных Е.Р. Особенности продукции цитокинов миелоидными супрессорными клетками в зависимости от экспрессии рецепторов PD-1 и TIM-3. [Электронный ресурс] Вестник уральской медицинской академической науки. 2024, Том 21, № 3, с. 296–307, DOI: 10.22138/2500-0918-2024-21-3-296-307

Введение

Супрессорные клетки миелоидного происхождения (МС) представляют особую популяцию клеток врожденного иммунитета, которые обладают иммуносупрессорной активностью и участвуют в регуляции иммунного ответа. При различных патологических состояниях, ассоциированных с хроническим воспалением (злокачественные опухоли, хронические инфекции, аутоиммунная патология), происходит экспансия МС [1]. МС ингибируют функции клеток врожденного и приобретенного иммунитета, однако наиболее важными мишенями для МС являются эффекторные Т-клетки. МС подавляют Т-клеточный иммунный ответ через различные механизмы, среди которых выделяют деплецию L-аргинина, продукцию NO, продукцию реактивных форм кислорода, IL-10, TGFβ, а также экспрессию лиганда PD-L1 [2-5].

Гетерогенная популяция МС включает в себя несколько типов клеток, в том числе МС ранних стадий дифференцировки (Р-МС), а также две субпопуляции клеток, фенотипически схожих с соответствующими зрелыми формами миелоидных клеток: гранулоцитарные МС (Г-МС) и моноцитарные МС (М-МС). Согласно накопленным данным, повышенное содержание МС при злокачественных опухолях ассоциируется с высокой супрессорной активностью и неблагоприятным прогнозом [1], тогда как при аутоиммунной патологии нарушается функциональная активность МС, возможно переключение на проявление провоспалительных свойств [6]. В частности, показано, что при ревматоидном артрите (РА) М-МС индуцируют генерацию Th17-клеток и проявляют про-остеокластогенную активность, что может играть важную роль в патогенезе заболевания [7].

Недавние исследования демонстрируют, что МС экспрессируют ингибиторные чекпойнт рецепторы, которые вовлечены в регуляцию антигенспецифического Т-клеточного ответа [8, 9]. Как известно, присутствие этих рецепторов на Th1/Th17 и CD8⁺Т-клетках ассоциируется с их активационным статусом, а также с подавлением их функциональной активности, индукцией анергии, истощения и апоптоза [10]. В то же время экспрессия ингибиторных чекпойнт рецепторов на регуляторных Т-клетках (Трег), наоборот, ассоциирована с более высокой иммуносупрессорной и пролиферативной активностью Трег [11, 12]. Поскольку Трег и МС характеризуются схожими механизмами подавления иммунного ответа, можно предположить возможную вовлеченность ингибиторных чекпойнт рецепторов в реализацию супрессорной активности МС. Соответственно, изменения в экспрессии этих молекул могут влиять на функциональную активность М-МС в условиях патологии. Высказанные предположения подтверждаются единичными исследованиями о наличии экспрессии TIM-3 на МС при преэклампсии [8, 9], однако, функциональная значимость ингибиторных чекпойнт рецепторов на МС по-прежнему остается мало изученной.

Цель работы: изучить экспрессию ингибиторных чекпойнт рецепторов PD-1 и TIM-3 на моноцитарных миелоидных супрессорах в норме и при ревматоидном артрите, а также оценить цитокин-продуцирующую активность миелоидных супрессоров, оппозитных по экспрессии PD-1 и TIM-3

Материалы и методы

Пациенты

В исследовании участвовал 31 пациент с РА, из них 26 женщин и 5 мужчин в возрасте от 31 до 78 лет (Табл.). Все пациенты с РА характеризовались умеренной или высокой активностью патологического процесса ($DAS28_{\text{CO3}} \geq 3,2$) и получали стандартную базисную противовоспалительную терапию. Ревматоидный фактор (РФ) определялся у 77% пациентов, антитела к циклическому цитруллинсодержащему пептиду (АЦЦП) – у 81 % больных. Все испытуемые соответствовали критериям Американской коллегии ревматологов / Европейского альянса ревматологических ассоциаций (ACR / EULAR).

Контрольную группу составили 30 условно здоровых человек (доноров), сопоставимых по полу и возрасту с больными.

Взятие крови и все иммунологические исследования проводили после получения письменного информированного согласия.

Исследование экспрессии TIM-3 и PD-1

Моноцитарные МС оценивали среди мононуклеарных клеток (МНК), выделенных стандартно из периферической крови методом центрифугирования цельной венозной крови (антикоагулянт – гепа-

рин) в градиенте плотности фиколла-верографина ($p=1,077$).

Относительное содержание моноцитарных М-МС оценивали по фенотипу CD14⁺HLA-DR^{low}/− методом проточной цитометрии с использованием анти-CD14 (Pacific Blue, BD Biosciences, США) и анти-HLA-DR (PerCP, BD Biosciences, США) моноклональных антител. Для анализа экспрессии TIM-3 и PD-1 использовали анти-TIM-3 (APC, BioLegend, США) и анти-PD-1 (Pe, BD Biosciences, США) моноклональные антитела.

Для оценки уровня экспрессии молекул использовали показатель интенсивности флуоресценции моноклональных антител, связавшихся с соответствующим антигеном (MFI).

Таблица
Характеристика больных ревматоидным артритом
Table
Characteristics of patients with rheumatoid arthritis

Параметры Characteristics	Значение Indicator
Общее количество больных Total number of patients	31
Гендерное отношение: мужчины/женщины Gender ratio: Men/women	5/26
Возраст, лет; Me (IQR) Age, years; Me (IQR)	51 (44-64)
Ревматоидный фактор (РФ), определяется/не определяется Rheumatoid factor (RF), identified/not identified	24/7
Антитела к циклическим цитрулинированным пептидам (АЦЦП), определяются/не определяются Anti-citrullinated protein antibodies (ACPAs), identified/not identified	25/6
Скорость оседания эритроцитов (СОЭ), мм/час Erythrocyte sedimentation rate (ESR), mm/hour	35 (20-46)
С-реактивный белок (СРБ), мг/л C-reactive protein (CRP), mg/l	12,4 (6,3-37,5)
Индекс воспалительной активности ревматоидного артрита (disease activity score) – DAS28 _{СОЭ} Rheumatoid arthritis inflammatory activity index (disease activity score) – DAS28 _{ESR}	5,8 (5,0-6,3)
Индекс воспалительной активности ревматоидного артрита (disease activity score) – DAS28 _{СРБ} Rheumatoid arthritis inflammatory activity index (disease activity score) – DAS28 _{CRP}	5,4 (4,4-6,1)
Клинический индекс активности ревматоидного артрита Clinical Disease Activity Index (CDAI)	28 (18-37)
Упрощенный индекс активности заболевания Simplified Disease Activity Index (SDAI)	28 (23-36)

Оценка продукции цитокинов

Для оценки продукции цитокинов 500 мкл цельной гепаринизированной венозной крови в течение 4 часов стимулировали липополисахаридом (LPS *E.colli* 0114:B4, 10 мкг/мл). Контролем являлись нестимулированные образцы без добавления LPS. Через 1 час от начала стимуляции добавляли монензин (BD GolgiStop™ Protein Transport Inhibitor (Containing Monensin), США) для блокирования высвобождения цитокинов. По окончании времени стимуляции образцы обрабатывали фиксирующим раствором (BD Cytotfix™ Fixation Buffer, США), лизировали эритроциты раствором BD Pharm Lyse™ в соответствии с инструкцией производителя (BD Biosciences, США) и инкубировали с анти-CD14 (Pacific Blue, BD Biosciences, США), анти-HLA-DR (PerCP, BD Biosciences, США), анти-TIM-3 (APC, BioLegend, США) или анти-PD-1 (APC, BD Biosciences, США) моноклональными антителами согласно стандартной методике для определения поверхностных антигенов. Далее, после проведения методики пермеабиллизации с помощью Transcription Factor Buffer Set (BD Biosciences, США), инкубировали с anti-TNF- и anti-IL-10-моноклональными антителами (Pe, BD Biosciences, США).

Относительное количество М-МС, продуцирующих TNF и IL-10, оценивали среди клеток с фенотипом CD14⁺HLA-DR^{low}/− и с учетом экспрессии TIM-3 или PD-1.

В качестве негативного контроля использовали изотипические антитела, конъюгированные с аналогичными флуорохромами.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Statistica v.6.0 и GraphPad Prism v.8.0 Software. Данные представлены в виде медианы (Me) и значений интерквартильного диапазона (IQR; LQ-UQ). Для выявления значимых различий в независимых выборках использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни, для парных выборок – непараметрический W-критерий. Корреляционный анализ оценивали, используя критерий ранговой корреляции Спирмена (Rs). Различия считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты

Как видно из рисунка 1А, пациенты с РА характеризовались повышенным содержанием циркулирующих М-МС ($p_U = 0,02$) в сравнении с аналогичным показателем в группе доноров. При этом абсолютное содержание М-МС в обеих исследуемых группах было сопоставимо и значимо не различалось (данные не представлены).

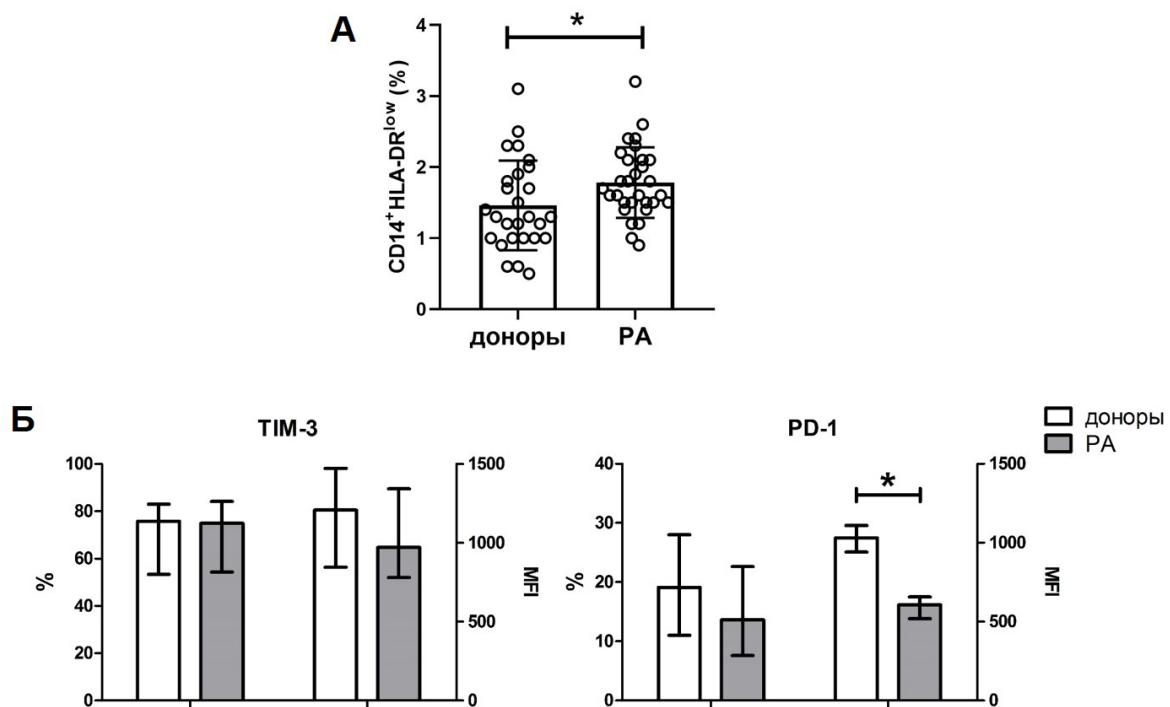


Рисунок 1. Экспрессия TIM-3 и PD-1 на моноцитарных миелоидных супрессорах при ревматоидном артрите

Примечание: А) в виде медианы, диапазона 25-75% значений (Me; IQR), а также индивидуальных значений представлены данные об относительном количестве моноцитарных миелоидных супрессоров (CD14⁺HLA-DR^{low}/-) доноров (n=28) и больных ревматоидным артритом (n=31); Б) в виде медианных и диапазона 25-75% значений (Me; IQR) представлены данные об относительном количестве (левая ось, %) и уровне экспрессии (правая ось, MFI) TIM-3 (левый график) и PD-1 (правый график) на моноцитарных миелоидных супрессорах доноров (n=28) и больных ревматоидным артритом (n=31); * – значимость различий $p_U < 0,05$

Figure 1. Expression of TIM-3 and PD-1 on monocytic MDSCs in rheumatoid arthritis

Note: A) the data are presented as a median, a range of 25-75% values (Me; IQR), and individual values of the relative amount of M-MDSCs (CD14⁺HLA-DR^{low}/-) in donors (n=28) and patients with rheumatoid arthritis (n=31); B) the data are presented as median and a range of 25-75% values (Me; IQR) of the relative amount (left axis, %) and expression level (right axis, MFI) of TIM-3 (left graph) and PD-1 (right graph) on M-MDSCs in donors (n=28) and patients with rheumatoid arthritis (n=31); * – significance of differences $p_U < 0,05$

Согласно полученным нами данным, значительная часть М-МС доноров и больных РА экспрессировала ингибиторный чекпойнт рецептор TIM-3 (Рис. 1Б), при этом для пациентов был характерен сниженный уровень экспрессии (MFI) этого рецептора, вместе с тем, выявленные различия не были

статистически значимыми ($p_U=0,15$). Помимо этого, М-МС экспрессировали рецептор PD-1 (Рис. 1Б). Пациенты с РА демонстрировали значимо сниженный уровень экспрессии PD-1 ($p_U=0,0001$), а также на уровне выраженного тренда – сниженное количество PD-1-позитивных М-МС ($p_U=0,056$) в сравнении с донорами.

Анализ взаимосвязи показателей активности РА и исследуемых маркеров на М-МС выявил, что уровень экспрессии TIM-3 и PD-1 прямо коррелировал с показателями СОЭ ($R_s=0,408$; $p=0,025$ и $R_s=0,371$; $p=0,04$, соответственно). Кроме того, экспрессия TIM-3 на М-МС коррелировала с $DAS28_{CO2}$ ($R_s=0,440$; $p=0,002$), клиническим индексом активности ревматоидного артрита CDAI ($R_s=0,402$; $p=0,034$), а также на уровне тренда – с $DAS28CPB$ ($R_s=0,352$; $p=0,06$).

Для того, чтобы выяснить функциональную значимость TIM-3 и PD-1, мы изучили продукцию про-/противовоспалительных цитокинов в М-МС, оппозитных по экспрессии этим рецепторам. Как видно из рисунков 2-3, спонтанная продукция TNF и IL-10 была выше более чем в 2 раза в TIM-3⁺ и PD-1⁺ М-МС в сравнении с М-МС, негативными по экспрессии TIM-3 и PD-1 ($p_w < 0,05$ для всех показателей). При этом экспрессия TIM-3 и PD-1 не влияла на соотношение продукции TNF/IL-10 (усл. ед.) (Рис. 4).

Стимуляция LPS значимо не влияла на количество CD14+HLA-DR^{low}/ среди МНК ($p_w=0,14$), а также на экспрессию TIM-3 ($p_w=0,92$) и PD-1 ($p_w=0,34$) в М-МС. Продукция TNF и IL-10 в М-МС повышалась в ответ на LPS независимо от экспрессии ингибиторных рецепторов ($p_w < 0,05$ для всех показателей; Рис. 3-4). Однако, стимуляция LPS приводила к почти десятикратному увеличению продукции TNF в TIM-3⁻ М-МС, тогда как в TIM-3⁺ М-МС продукция TNF повышалась в среднем 2 раза (Рис. 2).

Сходные различия в приросте продукции TNF в ответ на стимуляцию LPS регистрировались в М-МС, оппозитных по экспрессии PD-1. Соответственно, доля TNF-продуцирующих М-МС в ответ на LPS была значимо выше в TIM-3⁻ и PD-1⁻ М-МС в сравнении с TIM-3⁺ ($p_w=0,028$) и PD-1⁺ М-МС ($p_w=0,028$). Продукция IL-10 в ответ на LPS повышалась в PD-1⁻ М-МС в среднем в 4 раза ($p_w=0,03$), тогда как в PD-1⁺ М-МС – только в 2 раза ($p_w=0,03$; Рис. 3). Вместе с тем, учитывая исходно более высокую спонтанную продукцию IL-10 в PD-1⁺ М-МС, в LPS-стимулированных М-МС сохранялись аналогичные различия между PD-1⁺ и PD-1⁻ М-МС ($p_w=0,03$). В TIM-3⁻ и TIM-3⁺ М-МС продукция IL-10 повышалась на сопоставимом уровне (в среднем в 3-4 раза) в ответ на стимуляцию LPS. При этом более высокое количество IL-10-продуцирующих М-МС регистрировалось в TIM-3⁺ клетках (vs TIM-3⁻ М-МС $p_w=0,046$).

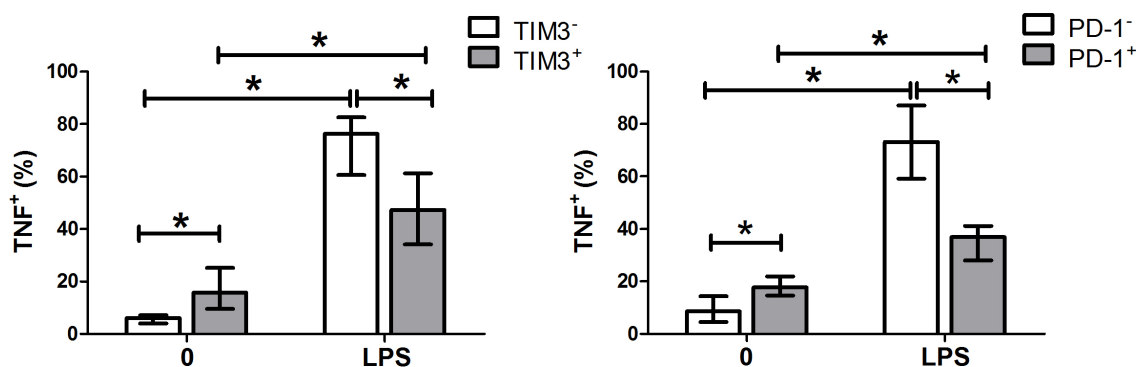


Рисунок 2. Продукция TNF в моноцитарных миелоидных супрессорах в зависимости от экспрессии TIM-3 и PD-1

Примечание: в виде медианных и диапазона 25-75% значений (Me; IQR) представлены данные о внутриклеточной продукции TNF (%) в М-МС здоровых доноров (n=8) с учетом экспрессии TIM-3 (левый график) и PD-1 (правый график); * – значимость различий $p_w < 0,05$

Figure 2. TNF production in monocytic MDSCs depending on the expression of TIM-3 and PD-1

Note: the data are presented as median and 25-75% range values (Me; IQR) of intracellular TNF production (%) in M-MDSCs of healthy donors (n=8) depending on the expression of TIM-3 (left graph) and PD-1 (right graph); * – significance of differences $p_w < 0,05$

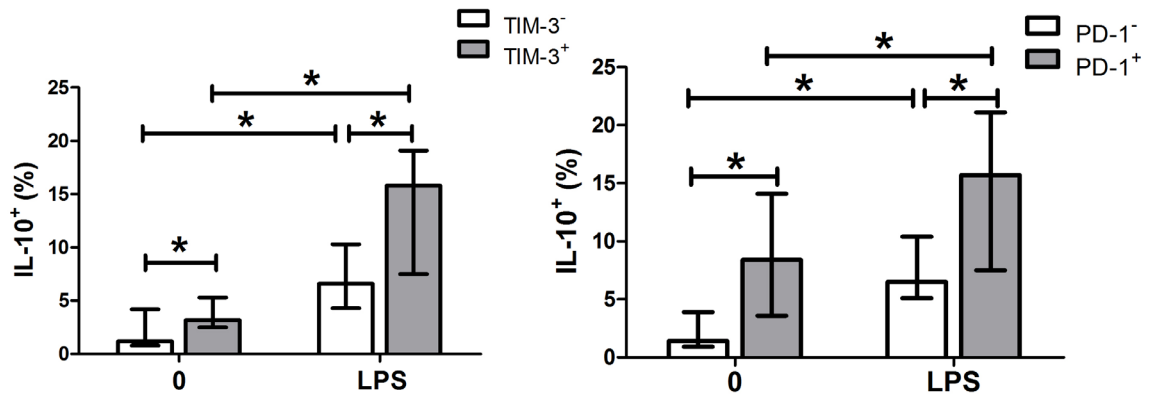


Рисунок 3. Продукция IL-10 в моноцитарных миелоидных супрессорах в зависимости от экспрессии TIM-3 и PD-1

Примечание: в виде медианных и диапазона 25-75% значений (Me; IQR) представлены данные о внутриклеточной продукции IL-10 (%) в М-МС здоровых доноров (n=8) с учетом экспрессии TIM-3 (левый график) и PD-1 (правый график); * – значимость различий $p < 0,05$

Figure 3. IL-10 production in monocytic MDSCs depending on the expression of TIM-3 and PD-1

Note: the data are presented as median and 25-75% range values (Me; IQR) of intracellular IL-10 production (%) in M-MDSCs of healthy donors (n=8) depending on the expression of TIM-3 (left graph) and PD-1 (right graph); * – significance of differences $p < 0,05$

В целом, обнаруженные нами изменения цитокин-продуцирующей активности в ответ на стимуляцию LPS приводили к тому, что индекс соотношения продукции TNF/IL-10 в TIM-3⁺ и PD-1⁺ М-МС был значительно ниже по сравнению с TIM-3⁻ и PD-1⁻ М-МС ($p = 0,03$ и $p = 0,046$, соответственно; Рис. 4).

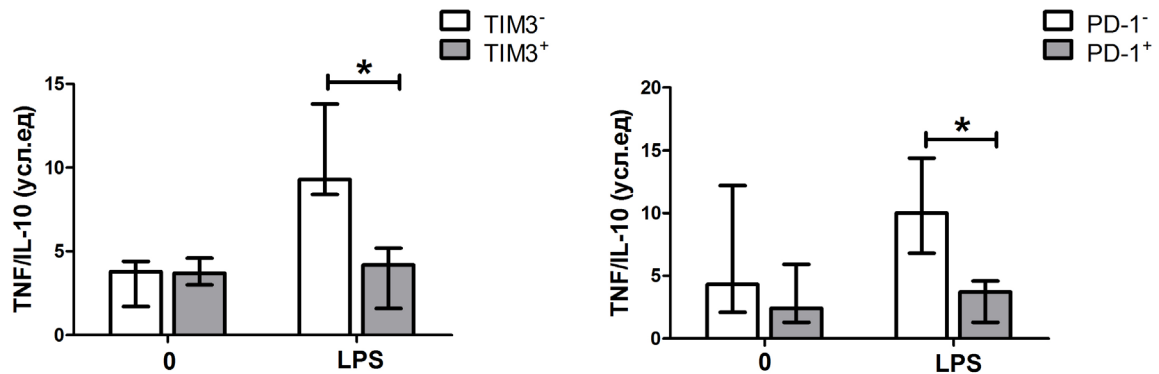


Рисунок 4. Соотношение продукции TNF/IL-10 в моноцитарных миелоидных супрессорах в зависимости от экспрессии TIM-3 и PD-1

Примечание: данные представлены в виде медианных и диапазона 25-75% значений (Me; IQR) соотношения TNF и IL-10 (усл.ед.) в моноцитарных миелоидных супрессорах доноров (n=8) с учетом экспрессии TIM-3 (левый график) и PD-1 (правый график); * – значимость различий $p < 0,05$

Figure 4. TNF/IL-10 production ratio in M-MDSCs depending on TIM-3 and PD-1 expression

Note: data are presented as median and 25-75% range values (Me; IQR) of TNF and IL-10 ratio (conventional units) in M-MDSCs of healthy donors (n=8) depending on TIM-3 (left graph) and PD-1 (right graph) expression; * – significance of differences $p < 0,05$

Обсуждение

Проведенное нами исследование показало, что моноцитарные МС экспрессируют ингибиторные чекпойнт рецепторы TIM-3 и PD-1. У пациентов с РА высокой и умеренной активностью, получающих стандартную терапию базисными противовоспалительными препаратами, на фоне повы-

шенного содержания циркулирующих М-МС снижен уровень экспрессии этих рецепторов. При этом экспрессия TIM-3 и PD-1 на М-МС находится в прямой корреляционной связи с клинико-лабораторными показателями активности РА. О потенциальной роли ингибиторных чекпойнт рецепторов в функциональной активности М-МС свидетельствуют полученные нами данные о более высокой продукции TNF и IL-10 в нестимулированных М-МС, позитивных по экспрессии TIM-3 и PD-1. В ответ на TLR4-стимуляцию эти субпопуляции М-МС характеризуются меньшей способностью к продукции TNF и более выраженной – к продукции IL-10 в сравнении с М-МС, негативными по экспрессии TIM-3 и PD-1.

Как известно, TIM-3 и PD-1 являются важными негативными регуляторами, участвующими в ограничении иммунного ответа и экспрессируются различными типами клеток иммунной системы. Изменения в экспрессии этих молекул ассоциируются с патологическими состояниями, в том числе злокачественными опухолями, аутоиммунными заболеваниями, хроническими вирусными инфекциями, сепсисом. Наиболее подробно биологическая значимость ингибиторных рецепторов описана для Т-клеток, тогда как для других типов клеток остается не до конца ясной.

В нашей работе объектом исследования были моноцитарные МС, которые участвуют в ингибировании Т-клеточного иммунного ответа через различные иммуносупрессорные механизмы. Мы продемонстрировали, что М-МС экспрессируют оба ингибиторных чекпойнт рецептора, а при РА отличаются значимым снижением экспрессии PD-1. Все пациенты, включенные в исследование, характеризовались умеренной или высокой активностью заболевания. Эти изменения могут свидетельствовать о нарушении регуляции экспрессии ингибиторных чекпойнт рецепторов в условиях воспаления. В литературе отсутствуют данные об экспрессии PD-1 на М-МС, основные исследования сфокусированы на изучении лиганда PD-1, PD-L1, участвующего в ингибировании Т-клеток [13, 14]. Однако, похожие данные получены в исследовании моноцитов [12]. Причем уровень экспрессии TIM-3 и PD-1 на CD14⁺ моноцитах был сопоставим с полученными нами данными о М-МС, характеризующимися фенотипом CD14⁺HLA-DR^{low}/-. В условиях сепсиса экспрессия TIM-3 на моноцитах умеренно снижается, а экспрессия PD-1, наоборот, возрастает более чем в 2 раза. При этом нейтрализация TIM-3 и PD-1 совместно с LPS-стимуляцией приводит к усилению продукции TNF и IL-10 у пациентов с сепсисом.

С другой стороны, согласно полученным нами данным, при отсутствии значимых различий в экспрессии TIM-3 между донорами и обследованными больными активность РА прямо коррелировала, в большей степени, именно с уровнем экспрессии TIM-3, что может отражать включение компенсаторных механизмов регуляции воспаления. Кроме того, можно предположить, что при высокой активности РА TIM-3⁺ М-МС характеризуются сниженной супрессорной функцией или даже переключением на проявление провоспалительных свойств. В отличие от PD-1 экспрессия TIM-3 на М-МС описана несколькими авторами [8, 9]. S.Dong и соавт. (2021) показали, что М-МС подавляют пролиферацию Т-клеток через TIM-3-зависимый механизм, поскольку блокирование TIM-3 дозозависимо отменяло супрессорную активность М-МС [8]. Вместе с тем, авторы не раскрыли, каким образом экспрессия TIM-3 на М-МС вовлечена в регуляцию пролиферативного ответа Т-клеток.

Ранее в экспериментальных работах было показано, что в динамике беременности М-МС и Г-МС в матке и региональных лимфатических узлах характеризовались нарастанием экспрессии TIM-3, что может свидетельствовать об участии TIM-3⁺ МС в поддержании толерантности [9]. Однако, при преэклампсии экспрессия TIM-3 на М-МС была повышена и регистрировалось изменение баланса продукции про- и противовоспалительных цитокинов. М-МС в условиях преэклампсии отличались сниженной продукцией TGFβ и повышенной продукцией IFNγ. Прямых подтверждений о роли TIM-3 в регуляции продукции цитокинов авторы не получили, однако можно предполагать, что обнаруженные изменения в М-МС в условиях патологии беременности могут быть взаимосвязаны.

В нашей работе мы изучили цитокин-продуцирующую активность нестимулированных и LPS-стимулированных М-МС в зависимости от экспрессии TIM-3 и PD-1. Полученные данные подтвердили наше предположение том, что экспрессия ингибиторных чекпойнт рецепторов ассоциируется с изменением баланса про- и противовоспалительных цитокинов. Согласно полученным нами данным, в нестимулированных М-МС TIM-3- и PD-1-позитивные клетки отличаются более высокой продукцией как TNF, так и IL-10 по сравнению с аналогичными М-МС, негативными по экспрессии этих рецепторов. Такие особенности продукции провоспалительных и противовоспалительных ци-

токинов могут отражать иммунорегуляторную роль М-МС и их вовлеченность в поддержание гомеостаза в отсутствие активационных стимулов. Липополисахарид стимулирует продукцию TNF и IL-10 в М-МС, однако ответ на TLR4-стимуляцию выше в TIM-3- и PD-1-негативных М-МС. Можно предположить, что присутствие ингибиторных чекпойнт рецепторов подавляет сигнал через TLR4, что ведет, в свою очередь, к более низкой продукции цитокинов и, возможно, меньшей провоспалительной активности. Однако для подтверждения гипотезы необходимы дальнейшие исследования. Кроме того, стоит отметить, что наиболее высокая продукция IL-10 в стимулированных М-МС регистрируется именно в клетках, экспрессирующих TIM-3 и PD-1.

Хорошо известно, что данных о роли PD-1 в регуляции функций миелоидных клеток почти нет, однако для TIM-3 показано возможное его участие в продукции про- и противовоспалительных медиаторов в моноцитах [15], что частично совпадает с полученными нами данными о продукции цитокинов в М-МС. Авторы исследования показали, что выключение TIM-3 восстанавливает продукцию IL-12 и IL-10 в LPS-стимулированных моноцитах и моноцитарной линии THP-1.

Суммируя полученные данные и данные литературы, можно сказать, что ингибиторные чекпойнт рецепторы играют важную роль в регуляции про/противовоспалительной активности МС. Дальнейшие исследования в этой области позволят выяснить, каким образом изменения экспрессии TIM-3 и PD-1 вовлечены в патогенез воспалительных заболеваний, а также возможные нарушения функциональной активности, ассоциированные с дисбалансом экспрессии ингибиторных рецепторов на МС.

Заключение

Проведенное исследование продемонстрировало наличие экспрессии ингибиторных рецепторов TIM-3 и PD-1 на моноцитарных МС, уровень которых при ревматоидном артрите ассоциируется с активностью воспаления. Кроме того, при высокой и умеренной активности РА у пациентов, получающих стандартную терапию, экспрессия TIM-3 на М-МС снижена, что может быть связано с нарушением регуляторной активности МС. В свою очередь, присутствие TIM-3 и PD-1 на М-МС ассоциируется с меньшей продукцией TNF и более высокой продукцией IL-10 при TLR4-стимуляции в сравнении с М-МС, негативными по экспрессии TIM-3 и PD-1. Полученные данные раскрывают возможную роль ингибиторных чекпойнт рецепторов в регуляции про/противовоспалительной активности МС, что может иметь важное значение в поддержании периферической толерантности, а также быть одним из механизмов патогенеза различных заболеваний, ассоциированных с воспалением.

Благодарности

Работа выполнена в рамках государственного задания FGMN 0415-2024-0011 и FGMN 0415-2021-0014.

ЛИТЕРАТУРА

1. Veglia F., Sanseviero E., Gabrilovich D.I. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nat. Rev. Immunol.* 2021; 21:485-498. doi:10.1038/s41577-020-00490-y.
2. Zea A.H., Rodriguez P.C., Atkins M.B., Hernandez C., Signoretti S., Zabaleta J., McDermott D., Quiceno D., Youmans A., O'Neill A., Mier J., Ochoa A.C. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res.* 2005; 65(8):3044-8. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-4505.
3. Xue Q., Yan Y., Zhang R., Xiong H. Regulation of iNOS on immune cells and its role in diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(12):3805. doi:10.3390/IJMS19123805.
4. Kusmartsev S., Nefedova Y., Yoder D., Gabrilovich D.I. Antigen-specific inhibition of CD8+ T Cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J. Immunol.* 2004; 172:989-999. doi:10.4049/JIMMUNOL.172.2.989.
5. Wu Y., Yi M., Niu M., Mei Q., Wu K. Myeloid-derived suppressor cells: an emerging target for anticancer immunotherapy. *Mol. Cancer.* 2022; 21:1-19. doi:10.1186/S12943-022-01657-Y.
6. Rajabinejad M., Salari F., Gorgin Karaji A., Rezaeiemanesh A. The role of myeloid-derived suppressor cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis; anti- or pro-inflammatory cells? *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2019; 47(1):4149-4158. doi:10.1080/21691401.2019.1687504.
7. Chen S., Guo C., Wang R., Feng Z., Liu Z., Wu L., Zhao D., Zheng S., Chen F., Zhang D., Xu J.,

Zhu J., Chen X., Li Z., Wise C.M., Li J., Wang X.Y. Monocytic MDSCs skew Th17 cells toward a pro-osteoclastogenic phenotype and potentiate bone erosion in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2021; 60(5):2409-2420. doi:10.1093/rheumatology/keaa625.

8. Dong S., Shah N.K., He J., Han S., Xie M., Wang Y., Cheng T., Liu Z., Shu C. The abnormal expression of Tim-3 is involved in the regulation of myeloid-derived suppressor cells and its correlation with preeclampsia. *Placenta*. 2021; 114:108-114. doi:10.1016/J.PLACENTA.2021.08.060.

9. Chabtini L., Mfarrej B., Mounayar M., Zhu B., Batal I., Dakle P.J., Smith B.D., Boenisch O., Najafian N., Akiba H., Yagita H., Guleria I. TIM-3 regulates innate immune cells to induce fetomaternal tolerance. *J. Immunol.* 2013; 190(1):88–96. doi:10.4049/JIMMUNOL.1202176.

10. Liu Z., McMichael E.L., Shayan G., Li J., Chen K., Srivastava R., Kane L.P., Lu B., Ferris R.L. Novel effector phenotype of TIM-3⁺ Regulatory T cells leads to enhanced suppressive function in head and neck cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 2018; 24:4529–4538. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-1350/116666/AM/NOVEL-EFFECTOR-PHENOTYPE-OF-TIM-3-REGULATORY-T.

11. Francisco L.M., Salinas V.H., Brown K.E., Vanguri V.K., Freeman G.J., Kuchroo V.K., Sharpe A.H. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 2009; 206:3015. doi:10.1084/JEM.20090847.

12. Azzaoui I., Uhel F., Rossille D., Pangault C., Dulong J., Le Priol J., Lamy T., Houot R., Le Gouill S., Cartron G., Godmer P., Bouabdallah K., Milpied N., Damaj G., Tarte K., Fest T., Roussel M. T-cell defect in diffuse large B-cell lymphomas involves expansion of myeloid-derived suppressor cells. *Blood*. 2016; 128(8):1081-92. doi:10.1182/blood-2015-08-662783.

13. Chikamatsu K., Sakakura K., Toyoda M., Takahashi K., Yamamoto T., Masuyama K. Immunosuppressive activity of CD14⁺ HLA-DR⁻ cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Sci.* 2012; 103:976. doi:10.1111/J.1349-7006.2012.02248.X.

14. Zhang Y., Ma C.J., Wang J.M., Ji X.J., Wu X.Y., Moorman J.P., Yao Z.Q. Tim-3 regulates pro- and anti-inflammatory cytokine expression in human CD14⁺ monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 2012; 91:189. doi:10.1189/JLB.1010591.

Авторы

Тыринова Тамара Викторовна

Д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии
tyriova@bk.ru

Сахно Людмила Васильевна

К.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии
Lsahno53@mail.ru

Моренкова Анастасия Юрьевна

Лаборант-исследователь лаборатории клеточно-молекулярных механизмов иммунопатологии
morenkovasp@yandex.ru

Тихонова Марина Александровна

К.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии
matrix-59@mail.ru

Ильина Надежда Александровна

Врач-ревматолог клиники иммунопатологии
nadya5481@mail.ru

Чумасова Оксана Александровна

К.м.н., врач-ревматолог клиники иммунопатологии
chumoks@mail.ru

Шкаруба Надежда Сергеевна
К.м.н., врач-ревматолог клиники иммунопатологии
sen-nadezhda@yandex.ru

Сизиков Алексей Эдуардович
К.м.н., заведующий отделением ревматологии клиники иммунопатологии
sizikovaе@niikim.ru

Черных Елена Рэмовна
Д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией клеточной иммуноterapiи
ct_lab@mail.ru

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ)
Новосибирск, Российская Федерация

*T.V. Tyrinova, L.V. Sakhno, A.Yu. Morenkova, M.A. Tikhonova,
N.A. Ilina, O.A. Chumasova, N.S. Shkaruba, A.E. Sizikov, E.R. Chernykh*

CYTOKINE PRODUCTION BY MYELOID SUPPRESSOR CELLS DEPENDING ON THE EXPRESSION OF PD-1 AND TIM-3 RECEPTORS

FSBSI «Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology»,
Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. The inhibitory checkpoint receptors TIM-3 and PD-1 are important negative regulators involved in limiting the immune response. The biological significance of inhibitory receptors has been most thoroughly described for T-cells, while it remains poorly understood for other cell types.

The aim of the study was to investigate the expression of PD-1 and TIM-3 receptors on monocytic myeloid suppressor cells (M-MDSCs) in normal conditions and in rheumatoid arthritis (RA) and to evaluate the cytokine-producing activity of M-MDSCs that have opposing expressions of PD-1 and TIM-3. **Material and methods.** The study included 30 healthy donors and 31 patients with rheumatoid arthritis of high or moderate activity ($DAS28_{ESR} \geq 3.2$), receiving standard basic anti-inflammatory therapy. The expression of PD-1 and TIM-3 in M-MDSCs, as well as intracellular cytokine production, were assessed by flow cytometry. **Results.** M-MDSCs expressed TIM-3 and PD-1 receptors. In RA, the content of M-MDSCs was significantly increased ($p_U=0.02$); however, the expression of the PD-1 receptor on M-MDSCs was reduced ($p_U=0.0001$) compared to the control group. The expression of PD-1 correlated directly with the ESR ($p=0.04$), while the expression of TIM-3 correlated with ESR ($p=0.025$), $DAS28_{ESR}$ ($p=0.002$), and the CDAI activity index ($p=0.034$). In TIM-3⁺ and PD-1⁺ M-MDSCs, the spontaneous production of TNF and IL-10 was more than twice higher compared to M-MDSCs that were negative for TIM-3 and PD-1 expression ($p_w < 0.05$). In response to TLR4 stimulation, TIM-3⁺ and PD-1⁺ M-MDSCs were characterized by a lower capacity for TNF production and a more pronounced for IL-10 production compared to M-MDSCs negative for TIM-3 and PD-1 expression ($p_w < 0.05$). **Conclusions.** Further studies will help to clarify how changes in TIM-3 and PD-1 expression are involved in the pathogenesis of inflammatory diseases, as well as to identify possible impairments of functional activity associated with an imbalance of inhibitory receptor expression on M-MDSCs.

Keywords: rheumatoid arthritis, monocytic myeloid suppressor cells, tumor necrosis factor, interleukin 10, checkpoint receptors

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Tamara V. Tyrinova

tyrinova@bk.ru

Received: 01.09.2024

For citation: Tyrinova T.A., Sakhno L.V., Morenkova A.Yu., Tikhonova M.A., Ilina N.A., Chumasova O.A., Shkaruba N.S., Sizikov A.E., Chernykh E.R. Cytokine production by myeloid suppressor cells depending on the expression of PD-1 and TIM-3 receptors. [Online] *Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki.* = *Journal of Ural Medical Academic Science.* 2024, Vol. 21, no. 3, pp. 296–307. DOI: 10.22138/2500-0918-2024-21-3-296-307 (In Russ)

REFERENCES

1. Veglia F., Sanseviero E., Gabrilovich D.I. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nat. Rev. Immunol.* 2021; 21:485-498. doi:10.1038/s41577-020-00490-y.
2. Zea A.H., Rodriguez P.C., Atkins M.B., Hernandez C., Signoretti S., Zabaleta J., McDermott D., Quiceno D., Youmans A., O'Neill A., Mier J., Ochoa A.C. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res.* 2005; 65(8):3044-8. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-4505.
3. Xue Q., Yan Y., Zhang R., Xiong H. Regulation of iNOS on immune cells and its role in diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(12):3805. doi:10.3390/IJMS19123805.
4. Kusmartsev S., Nefedova Y., Yoder D., Gabrilovich D.I. Antigen-specific inhibition of CD8+ T Cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J. Immunol.* 2004; 172:989-999. doi:10.4049/JIMMUNOL.172.2.989.
5. Wu Y., Yi M., Niu M., Mei Q., Wu K. Myeloid-derived suppressor cells: an emerging target for anticancer immunotherapy. *Mol. Cancer.* 2022; 21:1-19. doi:10.1186/S12943-022-01657-Y.
6. Rajabinejad M., Salari F., Gorgin Karaji A., Rezaeiemanesh A. The role of myeloid-derived suppressor cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis; anti- or pro-inflammatory cells? *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2019; 47(1):4149-4158. doi:10.1080/21691401.2019.1687504.
7. Chen S., Guo C., Wang R., Feng Z., Liu Z., Wu L., Zhao D., Zheng S., Chen F., Zhang D., Xu J., Zhu J., Chen X., Li Z., Wise C.M., Li J., Wang X.Y. Monocytic MDSCs skew Th17 cells toward a pro-osteoclastogenic phenotype and potentiate bone erosion in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2021; 60(5):2409-2420. doi:10.1093/rheumatology/keaa625.
8. Dong S., Shah N.K., He J., Han S., Xie M., Wang Y., Cheng T., Liu Z., Shu C. The abnormal expression of Tim-3 is involved in the regulation of myeloid-derived suppressor cells and its correlation with preeclampsia. *Placenta.* 2021; 114:108-114. doi:10.1016/J.PLACENTA.2021.08.060.
9. Chabtini L., Mfarrej B., Mounayar M., Zhu B., Batal I., Dakle P.J., Smith B.D., Boenisch O., Najafian N., Akiba H., Yagita H., Guleria I. TIM-3 regulates innate immune cells to induce fetomaternal tolerance. *J. Immunol.* 2013; 190(1):88–96. doi:10.4049/JIMMUNOL.1202176.
10. Liu Z., McMichael E.L., Shayan G., Li J., Chen K., Srivastava R., Kane L.P., Lu B., Ferris R.L. Novel effector phenotype of TIM-3⁺ Regulatory T cells leads to enhanced suppressive function in head and neck cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 2018; 24:4529–4538. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-1350/116666/AM/NOVEL-EFFECTOR-PHENOTYPE-OF-TIM-3-REGULATORY-T.
11. Francisco L.M., Salinas V.H., Brown K.E., Vanguri V.K., Freeman G.J., Kuchroo V.K., Sharpe A.H. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 2009; 206:3015. doi:10.1084/JEM.20090847.
12. Azzaoui I., Uhel F., Rossille D., Pangault C., Dulong J., Le Priol J., Lamy T., Houot R., Le Gouill S., Cartron G., Godmer P., Bouabdallah K., Milpied N., Damaj G., Tarte K., Fest T., Roussel M. T-cell defect in diffuse large B-cell lymphomas involves expansion of myeloid-derived suppressor cells. *Blood.* 2016; 128(8):1081-92. doi:10.1182/blood-2015-08-662783.
13. Chikamatsu K., Sakakura K., Toyoda M., Takahashi K., Yamamoto T., Masuyama K. Immunosuppressive activity of CD14+ HLA-DR- cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Sci.* 2012; 103:976. doi:10.1111/J.1349-7006.2012.02248.X.
14. Zhang Y., Ma C.J., Wang J.M., Ji X.J., Wu X.Y., Moorman J.P., Yao Z.Q. Tim-3 regulates pro-

and anti-inflammatory cytokine expression in human CD14⁺ monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 2012; 91:189. doi:10.1189/JLB.1010591.

Authors

Tamara V. Tyrinova

DB, leader researcher of the Laboratory of cellular immunotherapy
tyrionova@bk.ru

Ludmila V. Sakhno

PhD, senior researcher (Laboratory of cellular immunotherapy)
Lsakhno53@mail.ru

Anastasiia Yu. Morenkova

laboratory research assistant (Laboratory of cellular and molecular mechanisms of immunopathology)
morenkovasp@yandex.ru

Marina A. Tikhonova

PhD, senior researcher of the Laboratory of cellular immunotherapy
matrix-59@mail.ru

Nadezhda A. Ilina

Rheumatologist
nadya5481@mail.ru

Oksana A. Chumasova

PhD, Rheumatologist
chumoks@mail.ru

Nadezhda S. Schkaruba

PhD, Rheumatologist
sen-nadezhda@yandex.ru

Alexey E. Sizikov

PhD, head of rheumatology department
sizikovae@niikim.ru

Elena R. Chernykh

DM, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, head of laboratory of cellular immunotherapy
ct_lab@mail.ru

Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology» (RIFCI)
Novosibirsk, Russian Federation