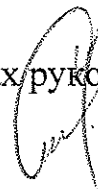


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ»

На правах рукописи



СМЕТАНЕНКО ЕКАТЕРИНА АЛЕКСАНДРОВНА

3.2.7 – «Аллергология и иммунология»

ПЛАЦЕНТАРНЫЙ ФАКТОР РОСТА В РЕГУЛЯЦИИ
Т-КЛЕТОЧНЫХ ФУНКЦИЙ И ЭКСПРЕССИИ ИНГИБИТОРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор,
член-корреспондент РАН
Е.Р. Черных

Новосибирск
2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Иммунная система при неосложненной беременности и преэклампсии	14
1.1.1 Иммунологическая толерантность при беременности.....	14
1.1.2 Адаптивный Т-клеточный ответ при беременности.....	18
1.1.3 Механизмы модуляции Т-клеточных функций при беременности.....	21
1.2 Чек-поинт молекулы и их роль в адаптации иммунной системы при гестации.....	26
1.3 Иммуномодулирующая активность ангиогенных факторов семейства VEGF.....	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	38
2.1. Характеристика рекрутированных в исследование доноров и пациенток.....	38
2.2. Исследования эффектов PlGF на Т-клетки <i>in vitro</i>	39
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	43
3.1 Влияние PlGF на пролиферацию Т-клеток	43
3.1.1 Эффект PlGF на пролиферацию активированных Т-клеток в культурах МНК.....	43
3.1.2 Роль моноцитов в опосредовании супрессорного эффекта PlGF на пролиферацию Т-клеток.....	48
3.2. Экспрессия VEGFR-1 на Т-лимфоцитах и его роль в опосредовании ингибирующего эффекта PlGF.....	50
3.3 Влияние PlGF на продукцию IL-10, апоптоз Т-клеток и экспрессию ингибиторных рецепторов.....	56
3.3.1. Эффект PlGF на продукцию Т-клетками IL-10.....	56
3.3.2 Влияние PlGF на апоптоз активированных CD4+ и CD8+Т- лимфоцитов.....	59

3.3.3 Влияние PlGF на экспрессию ингибиторных рецепторов Т-клетками.....	61
3.4 Экспрессия ингибиторных молекул (PD-1-, CTLA-4- и Tim-3) субпопуляциями CD4+ и CD8+ Т-клеток в периферической крови фертильных небеременных и беременных с неосложненным течением гестации.....	67
3.5 Экспрессия ингибиторных рецепторов Т-клетками периферической крови у беременных с преэклампсией	82
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	94
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	106
ВЫВОДЫ.....	109
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	111

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

С точки зрения иммунологии беременность остается лучшей моделью для исследования естественных механизмов иммунной толерантности, поскольку вынашивание полуаллогенного плода требует толерантности иммунной системы матери к фетальным антигенам при сохранении способности распознавать и элиминировать инфекционные патогены. [6]. Начало этим исследованиям было положено Р. В. Medawar еще в 1950-м годах. Тем не менее, клеточные и молекулярные механизмы, посредством которых фетальный аллотрансплантат уклоняется от разрушительного действия иммунной системы матери, остаются еще далеки от полного понимания.

Формирование толерантности к фетальным антигенам требует существенной перестройки иммунной системы матери, которая получила название иммунной адаптации и осуществляется с вовлечением различных механизмов - изменения баланса Т-хелперных клеток к (Th1, Th2, Th17), генерации Трег, индукции анергии и апоптоза цитотоксических CD8⁺ Т-клеток [1]. Важную роль в реализации этих механизмов играют ингибиторные чек-поинт молекулы, которые объединяют рецепторы и лиганды, проводящие сигналы негативной регуляции [149, 95]. Роль ингибиторных рецепторов и механизмы их регуляции при беременности остаются во многом неисследованными. Тем не менее, предполагается, что указанные молекулы являются ключевыми регуляторами, детерминирующими баланс про- и противовоспалительных сигналов. Соответственно, изменения их экспрессии могут являться биомаркерами иммунной адаптации и предикторами гестационных осложнений [101].

Наиболее изученными ингибиторными рецепторами на Т-лимфоцитах являются PD-1, CTLA-4 и Tim-3. Сигналинг через эти рецепторы на эффекторных Т-клетках приводит к снижению пролиферации, продукции Th1 и Th17 цитокинов, цитотоксической активности и выживаемости лимфоцитов, а на Трег

клетках – к экспансии и усилению супрессорной активности [99;207]. Повышенная экспрессия ингибиторных рецепторов и особенно их коэкспрессия отражает также дисфункциональное состояние Т-лимфоцитов (Т-клеточное истощение), которое характеризуется прогрессирующим снижением функций Т-клеток и представляет еще один механизм ограничения активности эффекторных клеток на этапе их перехода в клетки памяти [158, 187].

Гестационная перестройка иммунной системы наиболее ярко проявляется на границе мать-плод. Децидуальные Т-клетки при беременности характеризуются повышенной экспрессией и коэкспрессией молекул CTLA-4, PD-1 и Tim-3 [99], которая индуцируется HLA-C и HLA-G молекулами, локализованными на поверхности трофобласта [203, 121]. Действительно, низкая экспрессия HLA-C и HLA-G на клетках трофобласта в силу наследственных или приобретенных факторов рассматривается в настоящее время в качестве важной причины нарушений иммунной перестройки [69]. Включение механизмов иммунной адаптации, включая усиление экспрессии ингибиторных рецепторов, на системном уровне может индуцироваться гормонами [11] и иммуносупрессивными цитокинами [35]. Кроме того, недавно было показано, что важную роль в иммуномодуляции играют ангиогенные факторы.

Способность факторов семейства VEGF подавлять иммунный ответ впервые была выявлена при опухолевом росте. Выяснилось, что противоопухолевый эффект препаратов на основе ингибиторов VEGF обусловлен не только угнетением ангиогенеза, но и выраженным иммуностимулирующим эффектом [74]. Впоследствии было показано, что VEGF обладает широким спектром иммуносупрессивной активности, в том числе способностью усиливать экспрессию ингибиторных рецепторов на Т-лимфоцитах [189, 17].

Другим ангиогенным фактором семейства VEGF, концентрация которого возрастает при беременности, является фактор роста плаценты (PlGF). Значение PlGF при беременности обусловлено участием этого фактора в ангио- и васкулогенезе, инвазии трофобласта и ремоделировании спиральных артерий [28, 135]. Концентрация PlGF в периферической крови женщин с неосложненной

беременностью резко возрастает, начиная с 11-ой недели, достигая пика к 30-32 неделям гестации [179]. В то же время беременные с преэклампсией (ПЭ) характеризуются сниженным уровнем PlGF [20]. При этом PlGF (в отличие от VEGF) характеризуется высокой прогностической значимостью, и индекс соотношения этого фактора и растворимой формы его рецептора является высокоинформативным предиктором развития ПЭ [76, 117].

ПЭ является серьезным осложнением, которое возникает во второй половине беременности, манифестирует в виде впервые возникшей гипертензии и протеинурии, является основной причиной материнской и детской смертности, что [34] связано со срывом иммунологической толерантности [181]. Учитывая сопряженность между низким уровнем PlGF и нарушением толерантности, можно предположить, что PlGF, подобно VEGF, обладает иммуномодулирующей активностью, участвуя в адаптации иммунной системы при беременности.

Способность PlGF оказывать иммуномодулирующие свойства, особенно в отношении Т-клеток, остается практически не исследованной [30, 3]. Это отчасти связано с тем, что в отличие от VEGF-A, ингибирующий эффект которого на Т-клетки опосредуется через VEGFR-2 [42, 206], PlGF взаимодействует исключительно с VEGFR-1, который длительное время рассматривался как рецептор ловушка [28]. Кроме того, открытым оставался вопрос об экспрессии VEGFR-1 на Т-клетках. Появившиеся сведения об экспрессии и функциональности VEGFR-1 на клетках моноцитарно/макрофагального ряда [31, 57], а также выявленная экспрессия VEGFR-1 на отдельных субпопуляциях Т-клеток [155] позволяют предполагать, что PlGF может участвовать в модуляции Т-клеточных функций.

Учитывая вышесказанное, была сформулирована **цель работы:** изучить иммуномодулирующую активность PlGF на основе исследования влияния фактора на функции Т-клеток и экспрессию ингибиторных рецепторов *in vitro* и оценки экспрессии чек-поинт молекул на Т-клетках беременных с высоким (неосложненная беременность) и низким (преэклампсия) уровнем сывороточного PlGF

Задачи

1. Изучить влияние рекомбинантного PlGF на пролиферацию активированных Т-клеток *in vitro*.
2. Оценить экспрессию рецептора к PlGF (VEGFR-1) на Т-лимфоцитах и его роль в опосредовании ингибирующего эффекта PlGF
3. Исследовать влияние PlGF на продукцию IL-10, апоптоз Т-клеток и экспрессию ингибиторных рецепторов (PD-1-, CTLA-4- и Tim-3) на CD4 и CD8 Т-клетках периферической крови.
4. Исследовать экспрессию ингибиторных молекул (PD-1-, CTLA-4- и Tim-3) на CD4+ и CD8+ Т-клетках периферической крови фертильных небеременных и беременных с неосложненным течением гестации.
5. Охарактеризовать экспрессию ингибиторных рецепторов на CD4+ и CD8+ Т-клетках беременных с ПЭ, в том числе в зависимости от тяжести и сроков манифестации данного осложнения.

Научная новизна

В работе впервые продемонстрированы и охарактеризованы иммуномодулирующие эффекты PlGF на активированные Т-клетки *in vitro*. Показано, что PlGF в широком диапазоне доз подавляет пролиферацию aCD3-стимулированных МНК, ингибируя как CD4, так CD8 лимфоциты. Эффект фактора на Т-клетки является прямым и реализуется через VEGFR-1, экспрессия которых индуцируется при активации CD4 и CD8 Т-клеток. Также продемонстрирована способность PlGF стимулировать CD4 и CD8 Т-лимфоциты к продукции IL-10, усиливать апоптоз CD8 Т-лимфоцитов и повышать экспрессию Т-клетками ингибиторных рецепторов (PD-1, CTLA-4- и Tim-3) с наиболее выраженным эффектом в отношении Tim-3. В исследованиях *ex vivo* впервые продемонстрирована зависимость между концентрацией PlGF в сыворотке крови и экспрессией ингибиторных молекул на периферических Т-клетках. Выявлено, что концентрация PlGF во второй половине гестации прямо

коррелирует с содержанием CD4+Tim-3+ и CD8+PD-1+ клеток. Установлено, что у беременных с неосложненной гестацией, характеризующихся повышенным уровнем PlGF, в сравнении с фертильными небеременными выявляется повышенное содержание CD4+Tim-3+, CD8+PD-1+ и Т-клеток, коэкспрессирующих PD-1 и Tim-3. Усиление экспрессии PD-1 и Tim-3 не связано с сопутствующей экстрагенитальной патологией, однако наличие коморбидного фона ассоциировано с рядом особенностей - меньшим содержанием CD4+Tim-3+ клеток и более высоким - CD8+PD-1+ клеток. В сравнении с неосложненной гестацией у беременных с ПЭ, характеризующихся низким уровнем PlGF, отмечается достоверное снижение экспрессии Т-клетками PD-1 и Tim-3 (уменьшение доли CD4+Tim-3+ и CD8+PD-1+ клеток и отсутствие возрастания PD-1+Tim-3+ Т-клеток), в совокупности с увеличением экспрессии CTLA-4 (в популяции CD4+лимфоцитов). При этом выявлены особенности экспрессии ингибиторных рецепторов, которые ассоциированы с тяжестью и сроками манифестации ПЭ.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость работы заключается в установлении и характеристике иммуномодулирующей активности PlGF в отношении активированных Т-клеток, раскрытии закономерностей экспрессии VEGFR-1 Т-клетками и выяснении роли PlGF/VEGFR-1 сигналинга в модуляции функций активированных Т-лимфоцитов. Полученные данные о влиянии PlGF на экспрессию Т-клетками ингибиторных рецепторов также расширяет представления о молекулярных механизмах иммуносупрессии, опосредованной ангиогенными факторами. Изменения в экспрессии ингибиторных рецепторов на периферических Т-клетках у беременных с сопутствующей экстрагенитальной патологией свидетельствуют о влиянии коморбидного статуса на перестройку иммунной системы при гестации и иммунопатогенетической значимости сопутствующей патологии. Выявленные различия в экспрессии ингибиторных рецепторов в зависимости от тяжести и сроков манифестации ПЭ являются еще

одним аргументом в пользу вовлечения указанных молекул в патогенез ПЭ и иммунопатогенетической разнородности ранней и поздней ПЭ.

Практическая значимость работы заключается в установлении факторов (коморбидный статус, срок гестации), ассоциированных с особенностями экспрессии ингибиторных рецепторов на периферических Т-клетках беременных во второй половине гестации. Кроме того, выявление различий в экспрессии и коэкспрессии молекул PD-1, CTLA-4- и Tim-3 Т-клетками у беременных с неосложненной гестацией и ПЭ являются основанием для исследования прогностической значимости указанных параметров в качестве новых биомаркеров иммунной адаптации и предикторов развития гестационных осложнений.

Положения, выносимые на защиту

1. Иммуномодулирующий эффект PlGF на Т-клетки *in vitro* проявляется подавлением пролиферации CD4 и CD8 Т-лимфоцитов, усилением продукции IL-10 в популяциях CD4 и CD8 Т-клеток, индукцией апоптоза CD8 Т-клеток и усилением экспрессии Т-клетками PD-1-, CTLA-4- и Tim-3 (с наибольшим эффектом в отношении Tim-3).
2. Относительное содержание периферических CD8+PD-1+ и CD4+Tim-3+ клеток у беременных во второй половине гестации прямо коррелирует с концентрацией PlGF в сыворотке крови и достоверно выше в группе с высоким уровнем PlGF (неосложненная беременность), чем у беременных с низким уровнем фактора (беременные с преэклампсией).

Степень достоверности, апробация результатов и личное участие автора

Достоверность полученных результатов подтверждается продуманным алгоритмом работы (сочетающим исследования иммуномодулирующих эффектов в культурах активированных Т-клеток *in vitro* и изучение свойств Т-клеток *ex vivo*); достаточной выборкой исследования, применением современных

иммунологических методов и адекватных методов статистической обработки. Основные положения работы представлены и обсуждены на российских и международных конгрессах. Автор участвовал в разработке дизайна исследования, формировании критериев включения и исключения, создании и заполнении регистрационных карт, анализе медицинской документации. Результаты иммунологических исследований, представленные в работе, получены при непосредственном участии автора на базе лаборатории клеточной иммунотерапии НИИФКИ. Автором лично проведена статистическая обработка результатов и интерпретация экспериментальных данных.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 5 научных работ, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов диссертационных работ, в том числе одна статья в журнале, индексируемом в базе WoS (Q1).

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», результатов собственных исследований, отраженных в пяти главах, обсуждении, заключении, выводов и списка литературы. Материал изложен на 128 страницах машинописного текста, включающего 22 таблицы и 9 рисунков. Работа выполнена на базе лаборатории клеточной иммунотерапии и иммунологической лаборатории клиники иммунопатологии НИИФКИ, а также родильного отделения ГБУЗ НСО «ГКБ №1» при поддержке гранта РФФИ 18-44-540005.

Апробация работы

Основные положения работы представлены и обсуждены на отчетных конференциях аспирантов и ординаторов НИИФКИ в 2019, 2020, 2021 и 2022 гг.; IV объединенном иммунологическом форуме в 2019 г; IV и V международных

конгрессах «Новые технологии в акушерстве, гинекологии, перинатологии и репродуктивной медицине в 2019 и 2021 гг, IX Всероссийской конференции «Иммунология репродукции» в рамках XXII Всероссийского научно-образовательного форума "Мать и Дитя» в 2021 г.

Апробация диссертации состоялась в июне 2022 г. на семинаре клинического отдела ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии».

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Беременность и воспроизведение потомства имеют фундаментальное значение для жизни и являются основой нашего существования. Поскольку аллоантигены плода воспринимаются как чужеродные, успешная беременность требует толерантности иммунной системы матери к антигенам плода, и с точки зрения иммунологии беременность остается лучшей моделью для исследования естественных механизмов иммунной толерантности. Начало этим исследованиям было положено Р. В. Medawar еще в 1950-м годах. Тем не менее, клеточные и молекулярные механизмы, посредством которых фетальный аллотрансплантат уклоняется от разрушительного действия иммунной системы матери, до настоящего времени остаются недостаточно исследованными [1]. Это существенно тормозит разработку новых прогностических и терапевтических стратегий, направленных на улучшения исходов беременности и лечения таких грозных осложнений как преэклампсия (ПЭ), которая по-прежнему остается самой главной причиной материнской и младенческой смертности [40]. С другой стороны, осмысление механизмов иммунной перестройки при беременности открывает принципиально новые возможности для расширения наших представлений в области аутоиммунного ответа, трансплантационных реакций, избегания иммунного ответа при раке, толерантности к комменсальной микрофлоре, вакцинального ответа и противомикробной защиты [29]. Формирование толерантности к отцовским аллоантигенам требует существенной перестройки иммунной системы матери и осуществляется с вовлечением различных механизмами, включая изменение баланса Т-хелперных клеток к (Th1, Th2, Th17), генерацию Трег и анергию/деплецию цитотоксических CD8⁺ Т-клеток [1]. Важную роль в реализации этих механизмов играют так называемые чек-поинт молекулы (ингибиторные сигнальные молекулы), которые функционируют как рецепторы, проводящие сигналы негативной регуляции [94]. Повышенная экспрессия ингибиторных рецепторов и особенно их ко-экспрессия отражает также состояние Т-клеточного истощения, которое характеризуется

прогрессирующим снижением функций Т-клеток и представляет еще один механизм ограничения активности цитотоксических Т-клеток [158,187].

Перестройка иммунной системы при гестации (в том числе изменение экспрессии ингибиторных рецепторов) индуцируется различными эндогенными медиаторами, включая молекулы HLA-G и HLA-C [203, 121], гормоны [111], иммуносупрессивные цитокины [35]. Недавно было показано, что важную роль в иммуномодуляции играют также проангиогенные факторы. Способность факторов семейства VEGF подавлять иммунный ответ впервые была продемонстрирована у пациентов со злокачественными новообразованиями. Выяснилось, что противоопухолевый эффект при использовании ингибиторов VEGF обусловлен не только угнетением ангиогенеза, но и выраженным иммуностимулирующим эффектом [74], который объяснялся наличием у VEGF широкого спектра иммуносупрессивной активности, в том числе способности усиливать экспрессию ингибиторных чек-поинт молекул на Т-клетках [17].

Следует отметить, что наряду с VEGF, гестация сопровождается увеличением еще одного фактора из семейства VEGF – фактора роста плаценты (PlGF). Концентрация PlGF в периферической крови беременных существенно возрастает при неосложненной беременности и снижается при развитии ПЭ. При этом PlGF (в отличие от VEGF) характеризуется высокой прогностической значимостью, и снижение этого фактора в совокупности с возрастанием его растворимого рецептора является предиктором развития ПЭ [76, 117].

Как известно, PlGF является селективным лигандом для рецептора к VEGF 1-го типа (VEGFR-1), который долгое время рассматривался исключительно как рецептор ловушка [28]. Впоследствии было показано, что PlGF/ VEGFR-1 сигналинг модулирует функциональную активность антигенпрезентирующих клеток [31, 57]. В частности, исследования иммуномодулирующей активности PlGF выявили способность фактора подавлять созревание дендритных клеток и индуцировать M2 поляризацию макрофагов [30, 3], однако влияние PlGF на функции Т-клеток, остаются практически неизученными.

1.1. Иммунная система при неосложненной беременности и преэклампсии

1.1.1. Иммунологическая толерантность при беременности

С иммунологической точки зрения беременность представляет для иммунной системы матери сложнейшую задачу - поддержание тонкого баланса между защитным иммунитетом и толерантностью. Поскольку плод экспрессирует отцовские антигены, которые воспринимаются как чужие, для успешного развития гестации необходимо, чтобы иммунная система матери была толерантной по отношению к плоду, сохраняя при этом способность распознавать и элиминировать инфекционные патогены. [6]. Перестройка иммунной системы, нацеленная на выполнение этих функций, получила название иммунной адаптации [1]. Это многокомпонентный и тонко регулируемый процесс, который осуществляется с участием клеток врожденного и приобретенного иммунитета [106, 136] на локальном (границе мать-плод) и системном уровнях [115]. Причем по мере накопления знаний в этой области становится все очевиднее, что реорганизация иммунной системы матери при беременности намного сложнее, чем это считалось ранее. Более того, выясняется, что с точки зрения иммуномодуляции беременность представляет высоко динамичный процесс, поскольку каждая стадия беременности (имплантация эмбриона, плацентация, развитие плода и роды) характеризуется уникальным иммунным статусом и требует определенного иммунного микроокружения [170].

Иммунологическая толерантность не является (как это первоначально предполагалось) следствием строгого анатомического разделения кровоснабжения матери и плода. Гемохориальная плацентация человека с тесным соседством между плацентарными ворсинками и маточно-плацентарным кровообращением обеспечивает клеточный контакт между тканями матери и плода [177]. Учитывая этот факт, большинство исследователей сходятся во мнении, что индукция иммунологической толерантности представляет активный процесс, требующий распознавания фетальных антигенов [169, 80].

Формирование толерантности к плоду связано с селективной репрессией плацентарных генов, которые могут активировать материнские иммунные клетки,

вместе с активацией генов, подавляющих иммунные клетки [124]. К первой группе относятся гены, кодирующие высоко полиморфные антигены главного комплекса гистосовместимости класса I (HLA-A и HLA-B) вместе с антигенами HLA класса II. Отсутствие этих антигенов на поверхности клеток трофобласта отчасти согласуется с ранними представлениями о том, что материнская иммунная система остается в неведении о чужеродности плода. Вторая группа представлена молекулами главного комплекса гистосовместимости I класса HLA-C и минорными антигенами гистосовместимости. И сегодня, не осталось никаких сомнений в том, что материнские Т-клетки распознают антигены плода, активно реагируют на присутствие плода и в нормальных условиях характеризуются толерантностью к этим антигенам. Наличие Т-лимфоцитов, реактивных к фетальным антигенам продемонстрировано у беременных и рожавших женщин [84].

Центральную роль в установлении специфической иммунной толерантности к фетальным аллоантигенам играют клетки экстраворсинчатого трофобласта, которые не экспрессируют молекулы HLA-A и HLA-B, но несут на своей поверхности высоко полиморфные молекулы HLA-C. Несовпадения между матерью и отцом по HLA-C индуцирует ответ CD8⁺Т-клеток с цитотоксической активностью против клеток трофобласта, экспрессирующих отцовские HLA-C антигены [173]. Наряду с HLA-C антигенами к фетальным антигенам, которые могут распознаваться Т-клетками матери, относятся минорные антигены гистосовместимости (mHAgS), представляющие полиморфные пептиды, которые образуются в результате несинонимических однонуклеотидных замен (нсОНП), инсерций, делеций или присутствия антигена на Y-хромосоме и презентруются на поверхности клеток молекулами главного комплекса гистосовместимости (HLA) I или II классов [83, 162]. Аллельные различия этих антигенов у матери и плода могут индуцировать генерацию цитотоксических Т-клеток и Трег [183]. Предполагается, что плацентарный дебрис, содержащий mHAgS, при попадании в материнский кровоток фагоцитируется материнскими дендритными клетками и mHAgS представляются материнским CD8⁺ Т-клеткам, вызывая иммунный ответ

матери против клеток плода. При беременности обнаружены Т-клетки, специфичные как минимум к трем mHAgs - HA1, HA2 и NY [83].

Наряду со способностью HLA-C и mHAgs индуцировать Т-клеточный ответ, экспрессируемые клетками трофобласта неполиморфные молекулы HLA-E и HLA-G подавляют цитотоксическую активность НК-клеток. Аналогичным эффектом обладают молекулы HLA-C, которые при связывании с KIR (киллер-иммуноглобулин-подобными) рецепторами на НК-клетках предотвращает опосредованную ими цитотоксичность [80, 121]. Таким образом, клетки трофобласта ограничивают цитотоксическую активность НК клеток, но при этом инициируют Т-клеточный ответ.

Активация аллоспецифических Т-клеток может происходить как за счет взаимодействия Т-клеточных рецепторов с молекулами HLA-C на клетках трофобласта (прямой путь, для CD8⁺ Т-клеток), так и презентации растворимых пептидов HLA-C и минорных антигенов гистосовместимости дендритными клетками (непрямой путь, для CD4⁺Т-клеток) [104]. Предполагается, что второй путь является доминирующим [36].

Присутствие антиген-специфических CD8⁺ цитотоксических Т-клеток (ЦТЛ) обнаруживаются в первом триместре, и их количество увеличивается во время беременности [85]. Показано, что на границе мать-плод значительная часть наивных CD8⁺ Т-клеток и Т-клеток памяти несут Т-клеточные рецепторы, распознающие отцовские молекулы HLA-C на клетках трофобласта [175]. Предполагается, что существование таких клеток может быть обусловлено не только различиями матери и отца по HLA-C антигенам, но и присутствием вирус-специфических крос-реактивных Т-клеток (например, распознающих антигены вируса Эпштейна–Барра, цитомегаловируса, ветряной оспы и гриппа). Выявление перекрестной реактивности таких клеток к широкому спектру молекул HLA-A, HLA-B и HLA класса II позволяет предполагать наличие у вирусспецифических Т-клеток перекрестной реактивности к HLA-C [26]. Антиген-специфический Т-клеточный ответ к минорным антигенам гистосовместимости подтверждается выявлением после беременности Т-клеток, специфичных к HA1, HA2 и NY.

Причем специфичные к этим антигенам Т-клетки сохраняются в течение продолжительного времени [83].

Активация Т-клеток необходима для запуска механизмов толерантности. Несовпадение по HLA-C и mHAg между матерью и плодом усиливает активацию лимфоцитов. При этом прямое распознавание фетальных аллоантигенов не приводит к невынашиванию беременности, а является непременным условием для запуска толерантности, которая опосредуется с помощью многочисленных толерогенных механизмов. Тонкий баланс между активацией Т-клеток и ограничением их цитотоксической активности обеспечивает успешное течение беременности, а нарушение этого баланса в сторону активации Т-клеток приводит к неудачной имплантации [137], невынашиванию плода с нормальным кариотипом [56] и преэклампсии [145]. Причем патология ассоциирована с активацией Т-клеток, распознающих не только HLA-C антигены, но mHAg, [23].

Несмотря на ведущую роль аллореактивных Т-клеток в опосредовании трансплантационных реакций, роль Т-лимфоцитов при физиологической и патологической беременности долгое время оставалась в тени. Во многом это объяснялось тем фактом, что доминирующей субпопуляцией децидуальных лейкоцитов на начальных сроках гестации являются НК клетки [38, 160], и привычное невынашивание по данным многих авторов связывалось с активацией именно этой субпопуляции клеток [153, 46]. В настоящее время становится очевидным, что дисфункции НК клеток при спонтанных абортах могут быть следствием Т-клеточных нарушений [153, 209]. Также показано, что на поздних сроках беременности Т-клетки составляют значительную часть децидуальных лейкоцитов [175], и нарушения в компартменте Т-клеток имеют отношение к развитию многих осложнений беременности - задержке развития плода, преждевременным родам и преэклампсии [85]

Таким образом, во время беременности функции эффекторных CD8⁺ Т-клеток подвержены тонкой иммунной регуляции, направленной на предотвращение неблагоприятного ответа на аллогенные клетки плода и обеспечение при этом иммунной защиты от инфекций. В организме матери

присутствуют наивные CD8⁺ Т-клетки и Т-клетки памяти, которые могут напрямую связываться с отцовскими молекулами HLA–С. Кроме того, у высокого процента беременных женщин развивается специфический Т-клеточный ответ на малые антигены гистосовместимости плода. При нормальной беременности несоответствие по HLA-С и mHAg плода и матери приводит к активации Т-лимфоцитов, но не вызывает невынашивания беременности. При этом как чрезмерная активация, так и подавление функций Т-клеток (вследствие неэффективной элиминации вирусных инфекций и развития воспалительной реакции) может нарушить толерантность матери к плоду и приводить к осложнениям беременности.

1.1.2. Адаптивный Т-клеточный ответ при беременности

Как известно, ответ цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов включает несколько этапов - (I) стадию активации и экспансии Т-клеток, (II) стадию сокращения или гибели Т-клеточного пула (III) стадию генерации различных субпопуляций Т-клеток памяти [202]. Для активации наивных CD8⁺ Т-клеток необходима костимуляция, которая обеспечивается связыванием молекул CD80 и CD86 на АПК с молекулой CD28 на CD8⁺ Т-клетках, тогда как активация эффекторных CD8⁺ Т-клеток не требуют костимулирующих сигналов. Относительно роли иммунорегуляторных CD4⁺ Т-клеток в модуляции функций CD8⁺ Т-лимфоцитов, эти субпопуляции предположительно не играют критической роли в активации наивных CD8⁺ Т-клеток. Тем не менее, различные субпопуляции CD4⁺ клеток, включая Th1, Th2, Th17 и Трег, участвуют в регуляции цитокин-секреторной и цитотоксической активности эффекторных CD8⁺ Т-клеток за счет секреции цитокинов, таких как IL-2 (Th1), IFN γ . (Th1), IL-4 (Th2), IL-17 (Th17) или IL-10 (Th2, Трег) и клеточного контакта (для некоторых субпопуляций Трег) [48]. Среди субпопуляций CD4⁺ клеток с регуляторной активностью Th1 и Th17 усиливают, а Th2 и Трег - подавляют функцию CD8⁺клеток [88, 73].

На ранних сроках беременности Т-клетки составляют 5-20% от общего количества децидуальных лимфоцитов, и их количество увеличивается с гестационным возрастом до 40-80% при доношенной беременности [171]. По сравнению с периферической кровью, где CD4+ Т-клетки являются доминирующей субпопуляцией, в структуре децидуальных лимфоцитов при доношенной беременности преобладают CD8+ Т-клетки. Причем, если в периферической крови CD8+ Т-клетки памяти составляют половину, среди децидуальных Т-клеток - большинство CD8+ Т-лимфоцитов являются активированными эффекторными Т-клетками памяти, а содержание непримированных наивных CD8+Т-клеток гораздо ниже, чем в циркуляции [174].

Еще одной особенностью является то, что эффекторные Т-клетки памяти в децидуальной ткани обладают более дифференцированным фенотипом, чем в периферической крови. Об этом свидетельствует более высокое содержание среди них CD27- и CD28- клеток, а более высокая экспрессия CD57 (маркер поздней дифференцировки) [129].

Генерация Т-клеток памяти обусловлена тем, что материнская иммунная система подвергается воздействию отцовских/фетальных антигенов, которые попадают в организм матери со спермой еще до беременности, а также экспрессируются на клетках трофобласта, контактируя с децидуальными иммунными клетками в плаценте. Антигены разрушающихся клеток трофобласта обнаруживаются в периферической крови и вторичных лимфоидных органах матери. Кроме того, во время беременности фетальные клетки, экспрессирующие отцовские антигены, попадают в организм матери (микрохимеризм) и могут рециркулировать в материнской крови в течение многих лет после беременности [6, 65].

Распознаваемые как чужие, фетальные антигены индуцируют развитие антигенспецифического иммунного ответа. При этом в силу особенностей микроокружения при гестации, генерация эффекторных Т-клеток и Т-клеток памяти сопровождается индукцией и экспансией Трег, ограничивающих функции цитотоксических Т-лимфоцитов [63, 85]. Так, у беременных с несовпадением

HLA-C между матерью и плодом в децидуальной ткани отмечается более высокое процентное содержание активированных (CD4+CD25dim) и регуляторных (CD4+CD25bright) Т-клеток по сравнению с беременными, у которых несовпадений по HLA-C не отмечается. Таким образом, специфическое распознавание децидуальными Т-клетками HLA-C плода на границе мать-плод не вызывает деструктивного иммунного ответа при неосложненной беременности [171].

Одним из подходов к оценке цитотоксических Т-клеток со специфичностью к фетальным антигенам является выявление CD8 Т-лимфоцитов, распознающих минорные аллоантигены, кодируемые Y хромосомой, у беременных с плодом мужского пола (HУ-специфичные Т-клетки). Антигенспецифические Т-клетки в данном случае можно выявить методом проточной цитофлюориметрии, используя мультимеры МНС-белков, конъюгированных с иммунодоминантными пептидами Y хромосомы. У человека CD8+ Т-клетки со специфичностью к фетальным антигенам обнаруживаются в периферической крови матери как во время [85], так и после беременности [186, 126]. По данным Lissauer D [85] с соавт. CD8+ Т-лимфоциты со специфичностью к минорным антигенам гистосовместимости Y хромосомы выявляются у половины всех беременных, начиная с 8 недели. Популяция этих клеток возрастает по мере увеличения срока беременности и сохраняется в постнатальном периоде. Антигенспецифические CD8+ Т-клетки обладают фенотипом клеток эффекторной памяти с сохранной способностью к пролиферации, секреции IFN-γ и лизису клеток-мишеней после распознавания процессированного пептида [85].

Следует отметить, что HУ-специфические Т-клетки у беременных с плодом мужского пола присутствуют не только в децидуальной ткани, но и периферической крови, хотя в очень низком количестве, составляя 0,06% от общей популяции CD8+ Т-клеток. Количество HУ-специфических CD8+ Т-клеток в децидуальной оболочке в 10 раз превышает долю HУ-специфических CD8+ Т-клеток в циркуляции. HУ-специфические децидуальные CD8 Т-клетки имеют фенотип эффекторных Т-клеток памяти и отличаются высоким уровнем

экспрессии PD-1 и маркера активации CD69 в сравнении с периферическими Т-клетками [129].

Накопление CD8⁺ Т-лимфоцитов, реактивных к минорным антигенам Y-хромосомы у беременных с плодом мужского пола, и сохранение антигенспецифических Т-лимфоцитов в виде пула клеток памяти после родов продемонстрировано также в мышинных моделях. При этом показано, что рестимуляция фетальными антигенами при повторной беременности индуцирует состояние гипореактивности CD8⁺ Т-лимфоцитов [67].

Главной особенностью эффекторных CD8⁺ Т-клеток и эффекторных Т-клеток памяти периферической крови является высокая экспрессия цитолитических молекул, таких как перфорин и гранзим В. В то же время в децидуальной ткани аналогичные субпопуляции экспрессируют значительно меньшие уровни перфорины и гранзима В, что может свидетельствовать о толерантном состоянии децидуальных цитотоксических Т-клеток [175, 47]. Также показано, что децидуальные CD8⁺ Т-лимфоциты содержат субпопуляцию Т-регуляторных клеток, обладающих высокой пролиферативной активностью и способностью продуцировать Th2-цитокины [192].

Антиген-специфические CD8⁺ Т-клетки сохраняются после родов в виде Т-клеток памяти и теоретически могут подвергаться вторичной экспансии при повторной встрече с антигеном. Однако этого не происходит и стимуляция Т-клеток фетальными антигенами во время последующей беременности переводит CD8⁺ Т-клетки в состояние функционального истощения, связанного с повышенной экспрессией PD-1 и LAG-3. Нейтрализация PD-L1/LAG-3 в модели аллогенной беременности у мышей вызывает активацию антигенспецифических клонов CD8⁺ Т-клеток и потерю плода при повторной, но не первичной беременности [68].

1.1.3. Механизмы модуляции Т-клеточных функций при беременности

Если проследить историю развития представлений о механизмах иммунной толерантности, то тридцать лет тому назад состояние толерантности объяснялась исключительно сдвигом баланса Th1/Th2 в сторону доминирования Th2 ответа.

Идея адаптировать концепцию дихотомии Т-хелперных клеток для объяснения материнской толерантности к аллоантигенам плода при беременности принадлежит Wegmann et al. Согласно этой гипотезе преобладание Th2 ответа, подавляющего Th1 во время беременности, является адаптационной реакцией, которая защищает плод от атаки материнских Th1 клеток [198]. Действительно, нарушение такого баланса и сдвиг в сторону Th1 ответа ассоциируется с привычным невынашиванием беременности и преэклампсией (РЕ) [130, 140].

Впоследствии выяснилось, что доминирование Th2 клеток не является характерным для всего периода беременности. В течение 1-го триместра преобладает активность Th1, и эти клетки контролируют воспаление, необходимое для процессов имплантации и раннего развития эмбриона. Во 2-ом триместре доминируют Th2, способствующие развитию толерантности к аллоантигенам. В конце беременности Th1 ответ снова становится доминирующим и играет важную роль в индукции родов [35]. Это чередование преобладания Th1 и Th2 субпопуляций во время беременности считается наиболее выраженным в зоне контакта матери и плода, тогда как представления о динамике баланса Т-хелперных клеток на периферии остаются менее однозначными.

Более поздние исследования показали, что иммунологическая толерантности при беременности не ограничена балансом Th1 и Th2 клеток. С открытием субпопуляции Th17, продуцирующей провоспалительный цитокин IL-17 и играющей важную роль в воспалении, а также субпопуляции CD4 Т регуляторных клеток (Трег) выяснилось, что важную роль в защите плода от иммунной системы матери играет баланс Th17/Трег. Смещение этого баланса в сторону Трег является критическим фактором для успешной беременности [39]. Соответственно, в 2000-х годах тезис о Th1/Th2 балансе был дополнен парадигмой Th1/Th2 / Th17 и Трег клеток [141, 59, 123]. Эта парадигма смогла лучше и более всесторонне описать механизмы толерантности плода во время беременности, учитывая функции Th17 и Treg [141, 112, 128].

Важная роль Трег в индукции иммунологической толерантности при беременности подтверждается экспериментальными данными на мышах, в которых показано, что истощение этих клеток при аллогенной беременности увеличивает риск потери плода, в то время как adoptивный перенос Трег снижает риск выкидыша. Аргументом в пользу важности Трег у человека являются данные о низком содержании этих клеток у женщин с привычным невынашиванием и беременных с преэклампсией [137, 62]. В модели трансгенных мышей продемонстрирована экспансия антигенспецифических Трег у матери при беременности [138]. Сведения о природе Трег, возрастание которых наблюдается при беременности, противоречивы. По данным Samstein RM и соавт возрастание Трег происходит за счет индуцированных, а не естественных (тимических) Трег [143]. Однако, более поздние исследования показали важную роль тимуса и естественных Трег в индукции толерантности. В частности, было продемонстрировано, что прогестерон через активацию RANK стимулирует в тимусе дифференцировку Трег, а деплеция гена rank у мышей приводит к резкому сокращению естественных Трег в плаценте и повышает частоту выкидышей [120]. Индукция Трег при зачатии инициируется взаимодействием Т-клеток с отцовскими антигенами, содержащимися в сперме [45]. При этом фетальный микрохимеризм, обусловленный постоянным попаданием клеток плода к матери, продолжительно поддерживает генерацию Трег [67], и относительное содержание антигенспецифических Трег возрастает по мере наступления последующих беременностей от одного и того же партнера [138]. Предполагается, что Трег во время беременности предотвращают потерю плода путем ингибирования аллореактивных эффекторных Т-клеток и активированных Т-лимфоцитов с провоспалительной активностью, опосредующих системное воспаление [37].

В настоящее время становится очевидным, что адаптация иммунной системы матери при беременности не ограничена изменением баланса Th1/Th2/Th17 клеток и индукцией Трег. Среди новых участников важная роль в компартменте Т-хелперных клеток отводится Th9, Th22 и фолликулярных Th (Tfh) [196], а в компартменте регуляторных клеток - супрессорным клеткам

миелоидного происхождения [64] и лимфоидным клеткам врожденного иммунитета [100, 19].

Действие иммуносупрессорных механизмов в наибольшей степени проявляется в децидуальной ткани, т.е. на границе мать-плод. Это обусловлено экспрессией клетками трофобласта, децидуальными стромальными клетками и антигенпрезентирующими клетками ряда ингибиторных молекул (HLA-G, IDO, B7-H3) и иммуносупрессивных цитокинов (TGF- β , IL-10), которые при взаимодействии с CD8+Т-лимфоцитами способны прямо блокировать или снижать цитотоксическую активность Т-клеток [86, 124]. Высокая экспрессия TGF- β в децидуальной ткани ингибирует активацию Т-лимфоцитов [139]. Кроме того, молекулы HLA-G на поверхности клеток трофобласта индуцируют генерацию и экспансию Трег [172]. Стимулирующий эффект макрофагов и дендритных клеток на генерацию Трег связан с высокой экспрессией молекул IDO и PD-L1 [53, 62].

Помимо активной иммуносупрессии, опосредованной регуляторными клетками и цитокинами, индукция толерантности может быть связана и с другими механизмами. Так, цитотоксические CD8+ лимфоциты могут подвергаться анергии и/или апоптозу при взаимодействии с толерогенными дендритными клетками. Полученные на мышинных моделях данные свидетельствуют, что большое количество клеток трофобласта (и их фрагментов) во время «нормальной» беременности попадает в кровоток матери, создавая условия для презентации фетальных и плацентарных антигенов Т-лимфоцитам дендритными клетками. Децидуальные дендритные клетки обладают толерогенной активностью, которая поддерживается экспрессируемыми трофобластом молекулами HLA-G, а также повышенным содержанием прогестерона, хорионического гонадотропин, опухоль-ассоциированного гликопротеина и ингибирующего макрофаги цитокина-1 [199, 169]. При этом ограниченная способность дендритных клеток к миграции из матки в кровоток создает дополнительные условия для реализации толерогенного потенциала дендритных клеток на границе мать-плод [24].

Ограничение функций эффекторных Т-клеток может быть обусловлено за счет подавлением их миграции в децидуальную ткань за счет сниженной экспрессии децидуальными стромальными клетками хемокинов CXCL9 и CCL5, обеспечивающих рекрутирование Т-клеток [114].

Наконец, ограничение функций цитотоксических Т-клеток при гестации может быть связано с развитием дисфункционального состояния, которое получило название «Т-клеточного истощения» [158, 67]. «Т-клеточное истощение» представляет измененное состояние дифференцировки эффекторных Т-клеток, которое развивается на фоне хронической антигенной стимуляции в условиях воспаления и проявляется прогрессирующей и иерархической потерей эффекторных функций, устойчивым повышением и коэкспрессией множества ингибирующих рецепторов, изменением экспрессии ключевых факторов транскрипции, метаболическими нарушениями, а также неспособностью перейти в состояние покоя и отвечать гомеостатической пролиферацией на антиген-независимые стимулы (IL-7 и IL-15) [32, 13]. Феномен Т-клеточного истощения наиболее хорошо исследован при раке и хронических инфекциях [91], поскольку при этих патологиях Т-клетки подвергаются постоянному воздействию антигена и /или воспалительных сигналов. Данное состояние часто связано с неэффективным контролем иммунной системы при хронических инфекциях и опухолевом росте [33], однако дисфункции Т-клеток являются обратимыми. Например, блокирование коингибиторных рецепторов (PD1 или CTLA4) - может восстанавливать функции Т-клеток и активировать иммунный ответ [9]. Если толерантность формируется на этапе дифференцировки наивных Т-клеток в эффекторные, то клеточное истощение - на этапе перехода эффекторных Т-клеток в Т-клетки памяти [148].

1.2. Чек-поинт молекулы и их роль в адаптации иммунной системы при гестации

Чек-поинт молекулы представляют костимуляторные и коингибирующие рецепторы и лиганды на поверхности иммунных клеток, объединенные в различные семейства на основе их структуры и функций, основной функцией которых является поддержание иммунного гомеостаза. Для эффективной активации Т-клеток требуется 2 сигнала: первый обеспечивается взаимодействием Т-клеточного рецептора с антигеном, второй - костимуляторными молекулами, которые после взаимодействия со своими специфическими лигандами, позитивно и негативно регулируют функцию Т-клеток. Рецепторы, проводящие негативный сигнал получили название ингибиторных рецепторов или ингибиторных чек-поинт молекул [22].

Ингибиторные чек-поинт молекулы выполняют двойственную функцию. Позитивная роль этих молекул заключается в ограничении иммунного ответа, защите от избыточных воспалительных реакций и аутоиммунных реакций. Однако повышенная экспрессия ингибиторных рецепторов может приводить к подавлению иммунного ответа при опухолевом росте, и блокирование этих рецепторов открывает новые перспективы в противоопухолевой терапии рака [149, 200, 78]. Важно отметить, что механизмы иммунной перестройки при гестации во многом схожи с механизмами избегания иммунного ответа при опухолевом росте. Поэтому не удивительно, что в последние годы накапливается все больше данных о важной роли чек-поинт молекул в адаптации иммунной системы на различных этапах гестационного процесса (включая имплантацию эмбриона, плацентацию, формирование иммунологической толерантности и успешное развития беременности [99, 86]).

Наиболее хорошо изученными ингибиторными чек-поинт молекулами в популяции Т-клеток, являются молекулы CTLA-4 (ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами антиген 4, CD 152), PD-1 (молекула

программированной клеточной смерти - 1, CD 279) и TIM-3 (Т-клеточный иммуноглобулин муцин 3, CD366).

Молекула CTLA-4 является первым описанным ингибиторным рецептором, постоянно экспрессируется на Трег, появляется на активированных CD4 и CD8 Т-клетках. Поскольку лигандом CTLA-4 являются костимуляторные молекулы CD80/CD86, CTLA-4 конкурирует с рецептором CD28 за связывание с CD80/CD86 на антигенпрезентирующих клетках (АПК). Механизмы ингибирующего действия CTLA-4 разделяют на внутренние и внешние.

Внутренние - подразумевают прямую ингибицию Т-клеток, экспрессирующих CTLA4, что может быть обусловлено а) подавлением проксимальной передачи сигналов с ТКР или CD28 и б) конкурентным связыванием CTLA4 с CD80/86, что препятствует проведению положительного сигнала от молекулы CD28. Внешние механизмы предполагают подавление Т-клеток опосредовано через АПК или другие Т-клетки. Так молекула CTLA-4 а) способна индуцировать экспрессию IDO в АПК; б) индуцировать TGF- β в CTLA-4-экспрессирующих Т-клетках в) блокировать молекулы CD80/86 на АПК (для растворимой формы CTLA-4); и г) удалять CD80/86 молекулы с поверхности АПК за счет транс-эндоцитоза (фрагоцитоза) [191, 18].

Молекула PD-1 экспрессируется на CD4 и CD8 Т-лимфоцитах, причем активация клеток существенно усиливает экспрессию PD-1. Постоянно высокая экспрессия PD-1 описана на Трег (CD4+Foxp3+), фолликулярных Т-хелперных клетках, Т-клетках памяти и «истощенных» CD8 Т-клетках. Связывание PD1 с PD-L1 на АПК блокирует передачу сигнала с ТКР, ингибируя функции эффекторных Т-клеток, что проявляется подавлением пролиферации и дифференцировки Т-клеток, продукции Th1 цитокинов (IFN- γ , TNF- α , IL-2), цитотоксической активности Т-лимфоцитов и выживаемости Т-клеток [190, 133, 18]. Следует отметить, что наряду с подавлением функций эффекторных Т-клеток PD1 - PD-L1 сигналинг индуцирует генерацию Трег, которая осуществляется путем нескольких механизмов. Так, активация PD1 в присутствии TGF- β может смещать дифференцировку конвенциональных CD4+Т-клеток в сторону Трег.

Конверсия эффекторных Т-клеток в Трег может также индуцироваться при связывании PD1 на эффекторных Т-клетках с PD-L1, экспрессируемым Трег. Кроме того, взаимодействие PD-1 с PD-L1 на Трег способно усиливать экспрессию FoxP3 и супрессорную активность Трег. Существует так же не прямой механизм подавления Т-клеточных функций, связанный с PD1-сигналингом. Связывание PD-L1 на АПК при взаимодействии с Т-лимфоцитами, экспрессирующими PD-1, стимулирует АПК к продукции IL-10, который ингибирует Т-клетки [207].

Молекула TIM-3 - впервые была описана как специфический маркер Т-хелперных и цитотоксических клеток 1-го типа - Th1 и Tc1, соответственно. Позже было показано, что эта молекула экспрессируется также Th17 и Трег [208, 212]. Постоянно высокая экспрессия TIM-3 характерна для Т-клеток памяти и «истощенных» CD8 Т-клеток [12]. Лигандом TIM-3 является галектин-9 (Gal-9) - консервативный белок со сродством к β -галактозидазе. Цитоплазматический фрагмент Tim-3 взаимодействует с различными компонентами сигнального пути от ТКР и блокирует этот путь. Соответственно, активация TIM-3 лигандом Gal-9 приводит к гибели Th1 и Th17 клеток, а также индуцирует состояние Т-клеточного истощения CD8⁺ Т-клеток. С другой стороны, сигналинг через Tim-3 усиливает пролиферацию Трег и их супрессорную активность [8, 207]. В результате происходит смещение баланса между эффекторными и регуляторными Т-клетками в сторону доминирования Трег.

Суммируя представленные выше данные можно заключить, что ингибиторные рецепторы (CTLA-4, PD-1 и TIM-3) экспрессируются различными субпопуляциями Т-клеток. Уровень экспрессии чек-поинт молекул детерминируется функциональным статусом и субпопуляционной принадлежностью Т-лимфоцитов. При этом активация ингибиторных рецепторов при связывании с лигандами приводит к различным по направленности эффектам – подавлению функций эффекторных Т-клеток и активации Трег.

Угнетение эффекторных Т-клеток при активации ингибиторных рецепторов связано с блокированием передачи сигнала от ТКР. При этом мишени

блокирования при активации различных ингибиторных рецепторов различаются [207]. Поскольку взаимодействие ингибиторных рецепторов с лигандом блокирует в Т-клетках сигнал от Т-клеточного рецептора, распознающего антиген, эффект чек-пойнт молекул является антигенспецифическим.

Необходимые для предотвращения чрезмерной активации Т-клеток ингибиторные молекулы могут быть представлены на Т-клетках в гиперэкспрессированном виде. Т-клетки также могут одновременно экспрессировать несколько типов ингибиторных рецепторов. Гиперэкспрессия и одновременная активация различных ингибиторных рецепторов усиливает их ингибирующий эффект на функции эффекторных Т-клеток и приводит к развитию Т-клеточного истощения [118, 201]. Дисфункции Т-клеток, связанные с состоянием Т-клеточного истощения, как правило, развиваются на фоне повторной активации антигеном в периферических тканях. В CD8 Т-клетках истощение характеризуется прогрессирующей потерей эффекторной функции, при которой сначала нарушается секреция IL-2, а затем снижается продукция TNF α и IFN γ . Причем степень усиления экспрессии PD-1 коррелирует с выраженностью снижением секреции IFN γ [12].

В главе 1.1 отмечалось, что ограничение цитотоксической функции CD8⁺ Т-клеток при беременности может обеспечиваться за счет нескольких механизмов – индукции анергии и апоптоза; активной супрессии, опосредованной действием Th2 цитокинов (вследствии Th1-Th2 переключения) и Трег (смещение Th17/Трег баланса в сторону Трег), а также Т-клеточного истощения. Представленные выше данные свидетельствуют, что ко-ингибиторные рецепторы, связывающиеся с лигандами, участвуют в реализации всех этих механизмов и следовательно могут участвовать в реализации всех важнейших механизмов иммунной адаптации. Это предположение нашло подтверждение в ряде экспериментальных и клинических исследований [99, 25, 204, 54].

Действительно, клетки трофобласта, децидуальной оболочки и присутствующих в ней АПК высоко экспрессируют лиганды к чек-пойнт молекулам. Экспрессия CD80/CD86, являющихся лигандом CTLA-4, описана на

моноцитах, макрофагах и дендритных клетках [61], лиганд к PD1 – на стромальных клетках, клетках трофобласта и макрофагах [185, 87] галектина-9 (лиганда к Tim-3) на клетках трофобласта и стромальных клетках [93]. С другой стороны, показано, что децидуальные Т-клетки экспрессируют и коэкспрессируют молекулы CTLA-4, PD-1 и Tim-3, которые взаимодействуя со своими лигандами регулируют функции децидуальных Т-клеток [86, 182, 107, 54]. Причем многие ассоциированные с беременностью медиаторы (эстрогены, молекулы HLA-C, HLA-G, цитокины IL-10, TGF- β , VEGF), усиливают экспрессию чек-поинт молекул на иммунных клетках [127, 188, 201]

В исследованиях на мышах показано, что активированные фетальными антигенами наивные Т-клетки матери дифференцируются в долгоживущие PD-1⁺CD8⁺Т клетки, которые характеризуются дефектной эффекторной функцией [10]. Нарушение PD-1 сигнального пути во время беременности может способствовать пролиферации аллореактивных Т-клеток и возникновению иммунного ответа, который ассоциирован с дисфункциями CD8⁺ Т-клеток, усилением активности Th17 эффекторных Т-клеток и приводит к уменьшению размера помета и гибели плодов [192]. С другой стороны, продемонстрировано, что у мышей, склонных к спонтанным абортам, снижено количество децидуальных CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток, экспрессирующих PD1 и Tim-3 и что CD8⁺Т-клетки, коэкспрессирующие PD1 и Tim-3, характеризуются сниженной продукцией IL-4 и IL-10 и повышенной продукцией IFN- γ . Также показано, что блокирование Tim-3 и/или PD-1 у беременных мышей с нормально протекающей беременностью (CBA/J) вызывает резорбцию плода [195,205].

Более того, сегодня имеются веские аргументы о том, что у человека чек-поинт молекулы также участвуют в адаптации иммунной системы при гестации. Так, CD8⁺ и CD4⁺ Т-клетки, а также CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Т-рег в децидуальной ткани характеризуются повышенной экспрессией и коэкспрессией PD-1⁺ и TIM-3. Увеличение Т-клеток, несущих чек-поинт молекулы, наблюдается уже с самого начала беременности и сохраняется до родов [165]. В другом исследовании активация PD-1/PD-L1 сигнального пути подавляет продукцию

Th1 децидуальными CD4⁺ Т-клетками [165]. На ранних сроках гестации PD-1⁺TIM-3⁺ Т-лимфоциты представляют регуляторные Т-клетки, продуцирующие Th2 цитокины [195, 192]. В более поздние сроки PD-1⁺TIM-3⁺ Т-клетки являются гипореактивными Т-клетками в состоянии истощения со сниженной цитотоксичностью и продукцией IFN- γ и TNF- α [158]. Также в децидуальной оболочке беременных отмечается возрастание Трег (CD4⁺FoxP3⁻) с высокой экспрессией PD-1, супрессорная активность которых связана с продукцией IL-10, и увеличение Трег с высокой экспрессией CTLA-4 (CD4⁺CD25^{hi} FoxP3⁺), способных активировать иммуносупрессивный фермент IDO в дендритных клетках [165,146, 207]

При самопроизвольных абортах продемонстрировано снижение децидуальных CD4 и CD8 Т-клеток, несущих одновременно PD-1⁺TIM-3⁺, что ассоциируется с уменьшением продукции Th2-цитокинов [192; 194]. Также выявляется уменьшение CD8 Т-клеток, коэкспрессирующих TIM-3 и CTLA-4, характеризующихся продукцией противовоспалительных цитокинов [194]. Еще одной особенностью отсутствия характерного для беременности возрастания Трег с поверхностной экспрессией CTLA-4 [60].

Роль чек-поинт молекул в патогенезе ПЭ менее понятна и однозначна. На экспериментальной модели ПЭ крыс показано, что блокирование PD-1/PD-L1 сигнального пути приводит к нарушению баланса Трег и Th17 и активация PD-1 с помощью искусственного лиганда (PD-L1 Fc protein) оказывает протективный эффект [170]. Исследования на человеке показали снижение экспрессии PD-1 на антигенспецифических децидуальных CD8⁺ Т-клетках [107]. Также отмечается, что снижение PD-1 на Th17 сопровождается усилением функциональной активности этих клеток [170].

Учитывая, что взаимодействие иммунных клеток матери с фетальными антигенами происходит в первую очередь на границе мать-плод, основное внимание уделено изучению экспрессии ингибиторных рецепторов на децидуальных Т-клетках. В то же время следует отметить, что антигены трофобласта с током крови и лимфы попадают в лимфоузлы и селезенку, где они

способны активировать периферические Т-клетки [164]. Поэтому состояние толерантности должно поддерживаться не только на локальном, но и системном уровне. При таком рассмотрении изменения в экспрессии чек-поинт молекул на циркулирующих Т-клетках могут с одной стороны являться маркером иммунной адаптации, а с другой - отражать нарушения иммунных взаимоотношений между матерью и плодом.

Изучение экспрессии ингибиторных молекул на Т-клетках периферической крови представляет особый интерес в аспекте изучения патогенеза ПЭ. Это обусловлено тем обстоятельством, что ПЭ развивается во второй половине беременности, чаще в третьем триместре, когда забор образца децидуальной ткани представляет высокий риск для матери и плода. С другой стороны, иммунные нарушения, ведущие к развитию ПЭ, формируются гораздо раньше, что открывает перспективы для поиска предикторов развития этого грозного осложнения. В этом случае анализ периферической крови для скрининга беременных с отягощенным анамнезом представляется вполне реальным.

1.3 Иммуномодулирующая активность ангиогенных факторов семейства VEGF

Ангиогенные факторы семейства VEGF обладают наиболее выраженной проангиогенной активностью и играют ключевую роль в формировании новых сосудов при физиологических и патологических состояниях [97]. Значение этих факторов при беременности обусловлено их участием в инвазии трофобласта, ремоделировании спиральных артерий, формирования плаценты [28, 135]. Семейство VEGF включает 6 гликопротеинов, среди которых VEGF-A и фактор роста плаценты (PlGF) обладают наиболее выраженными проангиогенными свойствами, опосредуя свое действие через активацию двух рецепторов с тирозин-киназной активностью - VEGFR-1 (Flt-1) и VEGFR-2 (KDR/Flk-1). Проангиогенная активность этих факторов обусловлена их способностью стимулировать пролиферацию, миграцию и выживаемость эндотелиальных клеток, а также повышать сосудистую проницаемость и усиливать миграцию эндотелиальных предшественников из костного мозга [163,156].

Недавние исследования показали, что наряду с проангиогенной активностью VEGF-A обладает выраженной иммуносупрессивной активностью [206, 81]. Впервые иммуносупрессивные свойства VEGF-A были выявлены при лечении пациентов со злокачественными новообразованиями. Апробация антиангиогенных препаратов на основе ингибиторов VEGF (в качестве таргетной терапии) показала, что подавление ангиогенеза сопровождалось выраженной активацией иммунной системы [206, 81]. Эти данные позволили предположить, что ангиогенные факторы обладают иммуносупрессорной активностью и повлекли за собой серию работ по изучению иммунотропных эффектов VEGF-A.

В результате выяснилось, что VEGF взаимодействует практически со всеми типами иммунных клеток, являясь ключевым фактором опухоль-индуцированной иммуносупрессии [206, 166]. Исследования эффектов VEGF-A *in vitro* выявило прямой ингибирующий эффект на цитотоксические Т-клетки. Так, Ziogas с соавт показали, что активированные Т-клетки экспрессируют VEGFR-2 и продемонстрировали способность VEGF существенно подавлять цитотоксическую активность Т-клеток при связывании с этим рецептором. Блокирование VEGFR-2 анти- VEGFR2 антителами полностью отменяло супрессорный эффект VEGF - [211]. Схожие данные были получены Gavalas NG с соавт, которые показали ингибирующий эффект VEGF на пролиферацию и цитотоксическую активность Т-клеток, выделенных из асцитической жидкости пациенток с раком яичников. Как и в первом исследовании, эффект VEGF реализовался через связывание с VEGFR-2 [42].

Ингибирующий эффект VEGF-A на цитотоксические Т-клетки может быть также связан с усилением экспрессии на CD8⁺ Т-клетках ингибиторных рецепторов (PD-1, CTLA-4, TIM- 3 и LAG-3)[188], активация которых подавляет функции эффекторных Т-клеток [149].

Наряду с прямым ингибирующим действием на Т-клетки, VEGF может оказывать опосредованные супрессорные эффекты. Например, в опухолевом микроокружении VEGF в комбинации с IL-10 и PGE2 усиливает на

эндотелиальных клетках экспрессию FasL, который индуцирует апоптоз эффекторных CD8⁺ Т клеток при связывании с Fas рецептором. При этом Трег в силу более высокой экспрессии анти-апоптотической молекулы с-FLIP избегают апоптоза [108].

Другим опосредованным механизмом супрессорного влияния VEGF на Т-клетки является ингибирующее действие фактора на функции дендритных клеток (ДК). Факторы семейства VEGF подавляют дифференцировку и созревание дендритных клеток [187,74], которые являясь антигенпрезентирующими клетками, выступают посредниками между врожденным и адаптивным иммунитетом [41]. Поскольку стимуляторная активность ДК свойственна зрелым ДК, а незрелые ДК обладают толерогенными свойствами, блокирование дифференцировки и созревания ДК индуцирует толерогенную активность ДК, которая проявляется в способности ДК индуцировать состояние анергии/апоптоза Т-клеток и генерацию Трег [113]. Так, у пациентов со злокачественными новообразованиями повышенный уровень VEGF-A связан с присутствием в периферической крови незрелых ДК [206].

Способность VEGF вызывать генерации и/или экспансию клеток с иммуносупрессивной активностью является важнейшим механизмом непрямого ингибирующего эффекта VEGF на функции эффекторных Т-клеток. Помимо индукции толерогенных ДК, в литературе имеются данные о стимулирующем действии VEGF на генерацию Трег, экспансию супрессорных клеток миелоидного происхождения и M2-поляризацию макрофагов [206, 17]. При этом прямой стимулирующий эффект VEGF на Трег связан с избирательной экспрессией VEGFR-2 на Трег с высокой экспрессией FOXP3 [17].

PlGF представляет плеiotропный ангиогенный фактор роста, первоначально выделенный из плаценты человека, который наряду с VEGF-A обладает выраженной проангиогенной активностью и играет важную роль в васкулогенезе и ангиогенезе. Данный фактор, кодируемый геном plgf, также принадлежит к семейству VEGF [28]. В норме в большинстве тканей PlGF либо не экспрессируется, либо определяется на низком уровне, однако ангиогенная

активность этого фактора возрастает при патологических состояниях, связанных с воспалением или ишемией [115,180]. PlGF активируется различными стимулами - гипоксией, воспалительными цитокинами, факторами роста и гормонами, которые присутствуют во время имплантации и развития плаценты.

Во время беременности клетки плацентарного трофобласта являются основным источником PlGF, и его экспрессия значительно повышается уже в раннем гестационном периоде после имплантации [43] PlGF также продуцируется эндометрием человека и высвобождается в просвет матки [11]. Дополнительным источником PlGF во время имплантации являются НК-клетки [51].

В экспериментальных исследованиях показано, что генетическая делеция гена PlGF приводит к аномалии плацентарной сосудистой сети, а также дефектности НК-клеток в матке у беременных мышей [131, 167].

Иммуногистохимический анализ плацент у беременных с неосложненной гестацией и ПЭ свидетельствует о снижении уровня PlGF при тяжелой ПЭ в сравнении с неосложненной гестацией и легкой ПЭ [5]. Это согласуется с данными о сниженной концентрации PlGF в сыворотке крови беременных с ПЭ в сравнении с неосложненной беременностью [117]. Причем уровень PlGF (в отличие от VEGF) характеризуется высокой прогностической значимостью. Так, снижение PlGF в совокупности с возрастанием его растворимого рецептора является высоко информативным предиктором развития ПЭ [76, 117].

Помимо проангиогенной активности, которая реализуется при связывании PlGF с VEGFR-1 на эндотелиальных клетках, фактор влияет на поведение иммунных клеток [157, 4]. Иммуномодулирующая активность PlGF охарактеризована в гораздо меньшей степени, чем иммуностропные эффекты VEGF, поскольку VEGFR-1 в силу низкой тирозин-киназной активности [122], долгое время рассматривался в качестве рецептора – ловушки. Однако впоследствии экспрессия VEGFR-1 была обнаружена на достаточно большом количестве неэндотелиальных клеток - гемопоэтических предшественниках и иммунных клетках миелоидного ряда – моноцитах/макрофагах [147] Также было показано, что сигналинг через VEGFR-1 вовлечен в регуляцию мобилизации,

миграции и созревания этих клеток [55, 70, 4]. Adini A с соавт. продемонстрировали, что PlGF усиливает пролиферацию и выживаемость макрофагов [2], а также способен индуцировать их M2-поляризацию [57]. Кроме того, была описана способность PlGF через активацию PI3 kinase/АКТ и ERK-1/2 сигнального пути [150] стимулировать продукцию TNF- α и IL-8 и усиливать экспрессию циклооксигеназы (Cox)-2 в культурах TLR-7/8-активированных моноцитов [115]. С другой стороны, Dikov M. с соавт. выявили ингибирующий эффект PlGF на созревание ДК [31].

Сведения о влиянии PlGF на Т-клетки практически отсутствуют. В единственном исследовании Lin Y-L с соавт. показали, что подавление созревания дендритных клеток человека в культуре *in vitro* под действием PlGF снижает их аллостимуляторную активность и приводит к угнетению продукции Th1- и усилению продукции Th2 цитокинов Т-клетками в аллогенной смешанной культуре лейкоцитов [81]. Еще в одном исследовании на мышах было показано, что активация VEGFR-1 на поверхности активированных Т-клеток при стимуляции VEGF усиливает продукцию IL-10 [154].

Между тем, вопрос об иммуномодулирующей активности PlGF в отношении Т-клеток представляет большой интерес в связи с двумя аспектами. Первый касается выяснения роли сигналинга через VEGFR-1 в регуляции функций Т-клеток. Как выше отмечалось, прямой ингибирующий эффект VEGF на Т-клетки реализуется через связывание с VEGFR-2. Соответственно, роль VEGFR-1 на Т-клетках остается непонятной. Поскольку PlGF является селективным лигандом для VEGFR-1, исследование влияния PlGF на функции Т-клеток представляет собой уникальную возможность изучения роли VEGFR-1–сигналинга в регуляции Т-лимфоцитов.

Второй аспект связан с выяснением роли иммуномодулирующей активности PlGF в перестройке иммунной системы при беременности. Иммуносупрессивные эффекты ангиогенных факторов наиболее хорошо исследованные при онкологических заболеваниях. Однако несмотря на сходство между опухолью и плодом (неоангиогенез, инвазивный рост, иммуносупрессия),

участие ангиогенных факторов в индукции иммунной адаптации изучено недостаточно, а в отношении иммуномодулирующих эффектов PlGF на Т-клетки - практически отсутствуют, хотя снижение именно PlGF, а не VEGF является биомаркером гестационных осложнений. Соответственно, исследование иммуномодулирующих эффектов PlGF может пролить свет на ряд вопросов, касающихся потенциального участия этого фактора в перестройке иммунной системы при гестации.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Характеристика рекрутированных в исследование доноров и пациенток

Для изучения эффектов PlGF на Т-клетки *in vitro* использовали периферическую кровь 64 условно здоровых доноров крови, мужского и женского пола в возрасте от 25 до 45 лет. Для *ex vivo* исследований сопряженности между PlGF и иммунными параметрами исследовали экспрессию ингибиторных рецепторов на периферических Т-клетках в двух группах беременных - с высоким уровнем PlGF (неосложненная гестация) и сниженным уровнем фактола (беременные с преэклампсией).

Критериями отбора в первую группу (с неосложненным течением гестации) являлись наличие беременности со сроком гестации более 20 нед, возраст от 18 до 45 лет, однополая беременность, отсутствие гестационных осложнений (ПЭ), отсутствие признаков активной родовой деятельности во время обследования и забора крови.

Во вторую группу рекрутировались беременные с аналогичными критериями при наличии ПЭ. Диагноз ПЭ базировался на основании выявления критериев преэклампсии - повышенного систолического артериального давления выше 140 мм рт. ст. и/или диастолического артериального давления выше 90 мм рт. ст (при двукратном измерении с разницей в 6 часов) и протеинурии (более 0,3 г/л в суточной моче). Критерием тяжелой ПЭ являлось появление одного из признаков – систолическое артериальное давление выше 160 мм рт. ст. или диастолическое артериальное давление выше 110 мм рт. ст. при двух измерениях, произведенных в течение 6 часов; протеинурия более 5г/сут; олигурия менее 500мл/сут; отеки III—IV степени; неврологические или зрительные нарушения; отек легких, цианоз; боли в эпигастрии или правом подреберье; нарушение работы печени (повышение активности АСТ, АЛТ более 70 МЕ/л); выраженная гипопротеинемия менее 50г/л; тромбоцитопения менее $100 \times 10^9/\text{л}$; ухудшение состояния плода по данным кардиотокограммы.

В контрольную группу отбирали сопоставимых по возрасту фертильных небеременных, у которых в анамнезе были беременности и роды.

Рекрутирование беременных проводилось из числа женщин, проходивших обследование в родильном доме ГБУЗ ГKB №1. Иммунологическое исследование было одобрено этическим комитетом НИИФКИ и проводилось после получения письменного информированного добровольного согласия.

2.2 Исследования эффектов PlGF на Т-клетки *in vitro*

Выделение и культивирование клеток.

Мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови выделяли центрифугированием цельной, гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколла ($p=1,078$) (Ficoll®400 ; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). МНК культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах для иммунологических исследований в среде RPMI-1640, дополненной 10% инактивированной сыворотки доноров АВ (IV) группы, 2мМ HEPES-буфера, 0,3 мг/мл глутамина (все реактивы фирмы Sigma) и гентамицином (100 мкг/мл; Genepharma Ltd) при температуре 37°C и 5 % CO₂ в течение 3-5 сут. Для стимуляции клеток использовали растворимые моноклональные анти-CD3 антитела (α-CD3, ICO-90, ТОО «Медбиоспектр», Москва) в концентрации 1 мкг/мл, конканавалин А (ConA) в дозе 10 мкг/мл (Sigma). Рекомбинантный PlGF (R&D System) вносили в концентрации 0,01-100 нг/мл. В части экспериментов использовали сепарированные CD4⁺ Т-лимфоциты. Обогащенную популяцию CD4⁺ Т-клеток получали путем негативной селекции с помощью иммуномагнитной сепарации с использованием CD4 - Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec). Процентное содержание CD4⁺ клеток в обогащенной популяции превышало 95%. Клетки культивировали в 96-луночных планшетах, предварительно покрытых αCD3 антителами (ТОО «Медбиоспектр», Москва) в присутствии растворимых анти-CD28 антител (5 µg/ml; Thermo Fisher Scientific). В часть лунок добавляли PlGF в концентрации 5 нг/мл. Интенсивность

пролиферации оценивали через 3 (ConA-стимулированные культуры) и 5 суток (α-CD3-стимулированные культуры) по включению в нуклеопротейные фракции ³H-тимидина, вносимого за 18 часов до окончания культивирования в дозе 1 мкг/мл. Подсчет радиоактивности производили с использованием жидкостного сцинтилляционного счетчика SL-30 (Intertech, Франция). Результаты (имп/мин) представляли в виде среднего значения триплета (трех идентичных культур).

Оценка пролиферации с помощью CFSE

Пролиферацию в субпопуляциях CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов оценивали цитофлуориметрически по разведению флуоресцентной метки CFSE [5(6)-carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester]. Для этого МНК перед культивированием метили флуорохромом (витальным красителем) CFSE (Molecular probes, USA) в конечной концентрации 2 μМ в RPMI-1640 в течение 15 минут, затем 3-кратно отмывали в RPMI с 10% FCS (БиоЛТ, Санкт-Петербург). МНК, меченные CFSE, культивировали в концентрации 1×10⁵/мл в 96-луночных планшетах в отсутствие или присутствии α-CD3 (1 мкг/мл) и PlGF 5 нг/мл (R&D System) в течении 5 суток, и по завершению культивирования клетки окрашивали APC-меченными анти-CD4 и PerCP-меченными анти-CD8 антителами (BD, США). Анализ количества делений проводили на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson, США) в гейтах CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов, определяя процент клеток, содержащих, как минимум, в 2 раза меньше флуорохрома, чем исходно меченые клетки. Результат выражали в виде процентного содержания делящихся клеток к общему количеству клеток в исследуемой области.

В отдельной серии экспериментов исследовали влияние нейтрализующих анти-VEGFR-1 антител (α-VEGFR-1) и анти-VEGFR-2 антител (α-VEGFR-2) на супрессорный эффект PlGF. Для этого в культуры МНК, стимулированные α-CD3, добавляли PlGF (5 нг/мл) и культивировали в отсутствие и присутствии нейтрализующих α-VEGFR-1 или α-VEGFR-2 антител (Human VEGFR1/Flt-1;

VEGFR2/KDR/Flk-1 антитела 2.5 мкг/мл; R&D System), вносимых совместно с PlGF, либо через 24 часа после начала культивирования.

Фенотипическая характеристика Т-клеток

Экспрессию VEGFR-1 и VEGFR-2 на CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках оценивали в культурах свежевыделенных, спонтанно-культивируемых (нестимулированных), α-CD3 –или Con-A активированных МНК методом проточной цитофлуориметрии с использованием FITC-(CD8), PE-(CD4) и APC-(VEGFR-1 и VEGFR-2) меченных моноклональных антител (BD, США).

Продукцию IL-10 оценивали по относительному содержанию IL10⁺ секретирующих клеток в гейтах CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии с использованием anti-CD3 (Pe), anti-CD8+(FITC); anti-CD4 (PerCP), anti-IL-10 (PE) антител (BD Biosciences) в 48-часовых культурах МНК, активированных α-CD3 в отсутствие и присутствии PlGF. Фиксацию и пермеабиллизацию МНК для оценки внутриклеточной экспрессии IL-10 проводили после инкубации клеток с моноклональными антителами против поверхностных антигенов с помощью набора растворов для фиксации/пермеабиллизации Transcription Factor Buffer Set в соответствии с инструкцией («BD Biosciences»). Исследование проводили по общепринятой методике с использованием параметров прямого и бокового светорассеяния и флуоресценции по каналам FL-1 (FITC), FL-2 (PE), FL-3 (PerCP), («BD FACSCalibur», «CellQuest Software», США). Анализ проводили в пробах после накопления не менее 30000 событий в регионе Т-клеток.

Экспрессию ингибиторных рецепторов (PD-1, CTLA-4, Tim-3) на Т-клетках исследовали цитофлуориметрически путем окрашивания клеток анти-CD4(Рe), анти-CD8 (FITC), анти-CTLA-4 (PE-Cy5), анти-PD-1 (APC), анти-TIM-3 (PerCP/Cy5.5) и соответствующими контрольными изотип-специфическими моноклональными антителами (все антитела BD PharMingen). Относительное содержание и среднюю интенсивность флуоресценции (MIF) PD-1, CTLA-4, Tim-

3 оценивали в гейтах CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, используя программное обеспечение CellQuest (BD Biosciences, США).

Оценка апоптоза Т-клеток

Апоптоз активированных Т-клеток оценивали цитофлюориметрически. МНК, стимулированные α -CD3 (1 мкг/мл) культивировали в отсутствие или присутствии PlGF (5 ng/ml). Через 48 ч культивирования МНК метили анти-CD4 (FITC) или анти-CD8 (FITC) антителами (BD Biosciences, USA) и затем Annexin V/7-ADD kit (PE-conjugated Annexin V and 7-ADD) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Десять тысяч событий исследовалось в каждом образце. Процентное содержание CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, позитивных по аннексину V и/или 7-ADD- измеряли, используя программное обеспечение CellQuest (BD, США).

Оценка концентрации PlGF

Концентрацию PlGF в сыворотке крови оценивали методом иммуноферментного анализа с использованием (R&D System, USA) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Статистическая обработка

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0 (Stat Soft) и Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Software, Inc.). Для оценки значимости различий между двумя независимыми группами использовали *U*-критерий Манна-Уитни. Для выявления значимых различий в парных выборках использовали *W*-критерий Вилкоксона. Для оценки корреляционных взаимосвязей использовали коэффициент корреляции Спирмана. Данные в тексте и таблицах представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Влияние PlGF на пролиферацию Т-клеток

3.1.1. Эффект PlGF на пролиферацию активированных Т-клеток

в культурах МНК

Отправной точкой исследования явилось изучение влияния PlGF на пролиферацию Т-лимфоцитов здоровых доноров. Для этого исследовали эффекты различных доз фактора на пролиферативный ответ Т-клеток, стимулированных через Т-клеточный рецептор в культурах МНК 10 здоровых доноров (Табл.1). Растворимые aCD3 эффективно индуцировали пролиферацию МНК с медианным индексом стимуляции 24,5 (18,5 - 31,1).

Таблица 1 - Влияние различных доз PlGF на aCD3-стимулированную пролиферацию Т-лимфоцитов в культурах МНК доноров

Тест-культуры МНК	Пролиферативный ответ; имп/мин; Ме (L-UQ)	ИБ PlGF	P _w
0	570 (502-781)		
aCD3	13531 (11825-15960)		
aCD3+ PlGF (0,01 нг/мл)	7350 (6757-7715)	0,62 (0,6-0,66)	0,002
aCD3+ PlGF (0,1 нг/мл)	7131 (5755-8030)	0,62 (0,48-0,73)	0,005
aCD3+ PlGF (1 нг/мл)	6360 (5048-6816)	0,54 (0,42-0,62)	0,002
aCD3+ PlGF (5 нг/мл)	6544 (5206-8284)	0,54 (0,41-0,60)	0,008
aCD3+ PlGF (10 нг/мл)	8045 (3799-9512)	0,55 (0,28-0,79)	0,005
aCD3+ PlGF (50 нг/мл)	8389 (6267-10408)	0,62(0,4-0,75)	0,007
aCD3+ PlGF (100 нг/мл)	8110 (5131-8750)	0,71 (0,32-0,73)	0,01

Примечание: * P_w -достоверность различий в культурах клеток aCD3+ PlGF по отношению к культурам клеток с aCD3; W-критерий Вилкоксона. ИБ – индекс влияния – соотношение пролиферации в культурах aCD3+PlGF по отношению к культурам с aCD3; n=10.

Добавление PlGF в широком диапазоне доз (от 0,01 нг/мл до 100 нг/мл), приводило к подавлению пролиферативной активности МНК. Наибольший супрессорный эффект наблюдался при использовании PlGF в диапазоне доз от 1 до 10 нг/мл. Анализ индивидуальных значений показал, что концентрация PlGF, вызывающая наибольшее подавления пролиферативного ответа в культурах МНК разных доноров варьировала. Так, наибольшая супрессия в культурах МНК одного донора наблюдалась при добавлении фактора в дозе 100 нг/мл, у другого донора - в присутствии 0,01 -5 нг/мл, а при более высоких дозах супрессорный эффект ослабевал. В культурах МНК 2-х доноров максимальная супрессия достигалась при дозе фактора 1 нг/мл. Тем не менее, часто (в культурах МНК 6-ти из 10 доноров) наиболее выраженное подавление пролиферативного ответа регистрировалось при внесении PlGF в концентрации 5 нг/мл. Учитывая результаты анализа дозозависимости и индивидуальных различий, оптимальная концентрация PlGF для дальнейших исследований ингибирующего действия фактора была определена, как 5 нг/мл.

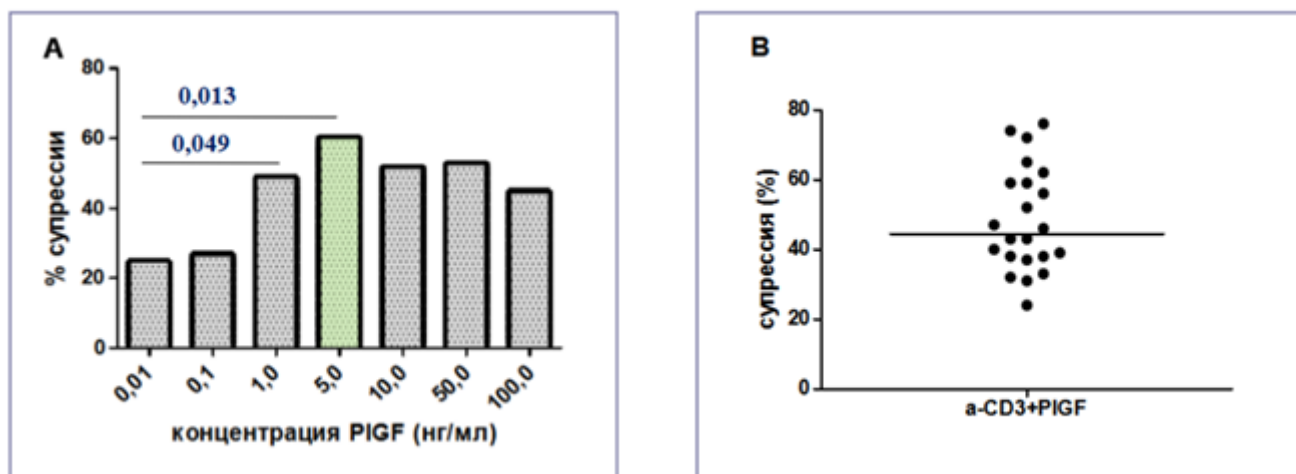


Рисунок 1 - Супрессорный эффект PlGF (5 нг/мл) на пролиферацию Т-клеток в аCD3-стимулированных культурах МНК. А – представлены медианные значения супрессорной активности различных концентраций PlGF в культурах МНК 8 доноров. В – индивидуальные значения и медиана супрессорного эффекта PlGF в дозе 5 нг/мл на пролиферацию аCD3-стимулированных МНК доноров (n=22)..

Оценка влияния фактора в указанной дозе на большей выборке (Рис 1). доноров показала, что супрессорная активность PlGF в этой концентрации варьировала в диапазоне от 25% до 76 % и медианное значение составляло 45%.

Наряду с классической активацией aCD3 через Т-клеточный рецептор, Т-клетки могут активироваться через альтернативные пути, например митогеном ConA, который взаимодействует с гликозилированными белками и α -D-маннозными остатками гликолипидов и запускает другой сигнальный путь [119]. Чтобы более полно охарактеризовать супрессорный эффект PlGF на Т-клетки, было также исследовано действие PlGF в культурах ConA-стимулированных МНК (Табл. 2). Видно, что PlGF, в диапазоне от 0,1 до 100 нг/мл) оказывал достоверный ингибирующий эффект на ConA-индуцированную пролиферацию МНК.

Таблица 2 - Влияние различных доз PlGF на ConA-стимулированную пролиферацию Т-лимфоцитов в культурах МНК доноров

Тест-культуры МНК	Пролиферативный ответ; имп/мин; Me (L-UQ)	ИБ PlGF	p _w
0	825 (321-960)		
ConA	16825 (14100-17520)		
ConA + PlGF (0,1 нг/мл)	12525 (11570-13375)	0,73 (0,71-0,79)	0,013
ConA + PlGF (5 нг/мл)	12435 (11723-13200)	0,79 (0,73-0,88)	0,027
ConA + PlGF (50 нг/мл)	12924 (11500-13958)	0,79 (0,71-0,85)	0,027
ConA + PlGF (100 нг/мл)	12780 (10500-14975)	0,74 (0,67-0,86)	0,012

Примечание: представлены данные, полученные в ConA-стимулированных культурах МНК доноров (n=10); p - достоверность различий по сравнению с ответом в - ConA стимулированных культурах МНК (в отсутствие PlGF); W-критерий Вилкоксона. ИБ (индекс влияния) - соотношение ответа в aCD3-стимулированных культурах в присутствии и отсутствии PlGF.

При сравнении супрессорного эффекта PlGF на aCD3- и ConA – стимулированный ответ, ингибирующий эффект был более выраженным при активации Т-клеток через Т-клеточный рецептор. Так, супрессорный эффект PlGF

в дозе 5 нг/мл в аCD3-активированных культурах МНК (Me 46%) достоверно превышал ингибирующий эффект в культурах МНК, стимулированных ConA (Me 21%; $p=0,01$).

Чтобы выяснить, какие из субпопуляций Т-клеток (CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетки) являются мишенями PlGF, в следующей серии экспериментов оценили влияние PlGF на пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов (Рис.2). Для этого МНК метили витальным красителем CFSE и оценивали пролиферацию методом проточной цитофлуориметрии в гейтах CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов в отсутствие и присутствии PlGF (Рис 2а).

В нестимулированных культурах МНК доля пролиферирующих CD4⁺ клеток составляла 0,35 (0,19-0,62)% и возрастала до 71 (62-79)% при стимуляции аCD3. Медианный уровень пролиферирующих CD8⁺Т-лимфоцитов в нестимулированных культурах МНК составлял 0,66 (0,28-1,2)%, и в присутствии аCD3 увеличивался до 60 (56-68)%. Добавление PlGF в культурах МНК приводило к достоверному снижению относительного содержания пролиферирующих CD4⁺ (Рис. 3В) и CD8⁺ (Рис. 3С) клеток. Супрессорный эффект в отношении CD4⁺ и CD8⁺ клеток составлял, соответственно 20% (IQR 5-40%; $pW=0,027$) и 27% (IQR 18-40%; $pW=0,028$) и значимо не различался ($pW=0,22$).

Таким образом, обе субпопуляции Т-лимфоцитов были подвержены ингибирующему влиянию фактора и не различались по чувствительности к супрессорному действию PlGF.

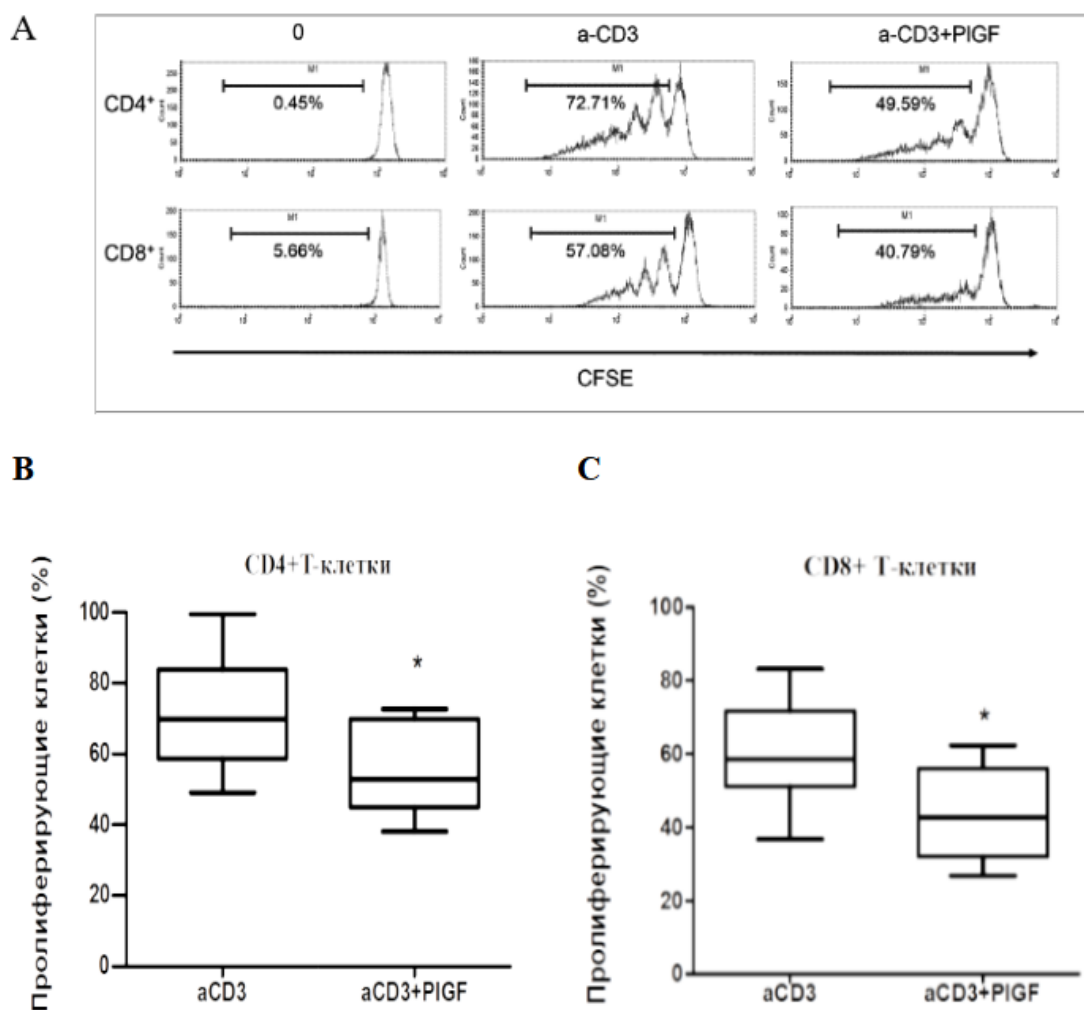


Рисунок 2. Супрессорный эффект PIGF на пролиферацию CD4 и CD8 Т-клеток в культурах а-CD3-стимулированных МНК. Пролиферацию оценивали по разведению флюоресцентного красителя CFSE методом проточной цитометрии. Долю пролиферирующих клеток (%) оценивали в гейтах CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов. Данные представлены в виде репрезентативных гистограмм (верхняя панель) и медианы, интерквартильного диапазона и минимальных–максимальных значений (n=6, нижняя панель) . * - $p < 0,05$ (W-критерий Вилкоксона).

3.1.2. Роль моноцитов в опосредовании супрессорного эффекта PlGF на пролиферацию Т-клеток

Как известно, для стимуляции Т-клеток растворимыми aCD3 антителами необходима костимуляция антиген-презентирующими клетками, в качестве которых могут выступать моноциты, присутствующие в культурах МНК. Поскольку по данным литературы моноциты экспрессируют VEGFR-I [168], эти клетки могут опосредовать ингибирующий эффект PlGF на пролиферацию Т-клеток. Чтобы выяснить, является ли эффект PlGF на Т-клетки прямым, или опосредуется моноцитами, в отдельной серии экспериментов (n=9) оценили супрессорный эффект PlGF при истощении моноцитов (Табл. 3), в частности после однократного удаления фракции адгезивных к пластику клеток.

Таблица 3 - Влияние деплеции адгезивных к пластику клеток на супрессорную активность PlGF в культурах МНК

Тест-культуры МНК	Пролиферативный ответ; имп/мин; Ме (L-UQ)	
	МНК	МНК с деплецией адгезивных к пластику клеток
0	516 (335-650)	587 (505-837)
aCD	7250 (6220-11524)	7631 (5210-11000)
aCD3+PlGF	3883 (3431-4883)	5421 (4620-7900)
P _{W 2-3}	0,008	0,008
ИБ PlGF	0,67 (0,48-0,76)	0,73 (0,64-0,79)

Примечание: данные получены в культурах МНК доноров (n=9); pW -достоверность различий в культурах несепарированных МНК и МНК с деплецией адгезивных к пластику клеток; ИБ - соотношение ответа в aCD3-стимулированных культурах в присутствии и отсутствии PlGF. W-критерий Вилкоксона.

Как видно из данных таблицы 3, PlGF ингибировал пролиферативный ответ как в культурах несепарированных МНК, так и МНК после удаления адгезивных к пластику клеток. При этом выраженность супрессорного эффекта (ИБ) в популяциях несепарированных и деплецированных по моноцитам МНК достоверно не различалась (p_W=0,14).

Чтобы подтвердить прямую способность PlGF ингибировать пролиферацию Т-клеток, также исследовали влияние фактора в культуре обогащенных Т-лимфоцитов, которые получали методом негативной селекции с помощью иммуномагнитной сепарации (Табл 4).

Таблица 4 - Влияние PlGF на aCD3/aCD28-стимулированную пролиферацию CD4+ клеток доноров

Донор № (CD4+Т-клетки)	0	aCD3/aCD28	aCD3/aCD28 + PlGF	Супрессия (%)
1	739	36093	25964	29
2	446	28742	23521	19
3	596	37529	24100	36
4	564	38425	24321	37
5	894	33116	25641	23
6	616	36824	21456	42
7	620	34256	20425	41
8	418	29814	21356	29
n=8				
Me	606	35174	23810*	32,5
IQR	505 -679	34465-37176	21406-24981	26-39

Примечание: CD4+ Т-клетки выделаны посредством негативной селекции методом иммуномагнитной сепарации (CD4- Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec).

* – $p < 0,05$; различия между значениями в aCD3/aCD28– стимулированных культурах в присутствии и отсутствие PlGF, W-критерий Вилкоксона.

Относительное содержание CD4+ Т-клеток в обогащенных культурах превышало 95%. Стимуляция сепарированных CD4+ Т-клеток иммобилизованными анти-CD3 антителами в комбинации с растворимыми анти-CD28 антителами индуцировала выраженную пролиферацию Т-лимфоцитов. PlGF во всех восьми тест-культурах ингибировал пролиферативный ответ сепарированных CD4+ Т-клеток. Супрессорная активность варьировала от 19 до 42%, составляя на уровне медианы 32%.

Полученные данные свидетельствуют о том, что PlGF в широком диапазоне доз ингибирует пролиферацию Т-клеток, активированных через Т-клеточный рецептор aCD3 или альтернативно - ConA. Эффект PlGF является прямым, поскольку сохраняется при истощении моноцитов, а также воспроизводится в культурах сепарированных Т-клеток. При этом PlGF подавляет пролиферацию как CD4, так и CD8 Т-клеток, которые в равной степени чувствительны к ингибирующему эффекту PlGF.

3.2. Экспрессия VEGFR-1 на Т-лимфоцитах и его роль в опосредовании ингибирующего эффекта PlGF

Одним из неизменных условий для реализации прямого эффекта PlGF на Т-клетки является экспрессия Т-лимфоцитами рецептора к PlGF - VEGFR-1. Данные литературы об экспрессии этого рецептора на Т-клетках не однозначны и получены преимущественно на экспериментальных животных или Т-клеточных линиях человека [154] [211]. Поэтому следующая серия экспериментов была посвящена оценке экспрессии VEGFR-1 на Т-лимфоцитах периферической крови человека в популяциях свежевыделенных МНК, а также культурах нестимулированных МНК и МНК, активированных aCD3 и ConA (рис. 3).

В свежевыделенных МНК относительное содержание CD4+VEGFR-1+ и CD8+VEGFR-1+ клеток было низким и составляло 1,29% (0,2-4,4) и 0,51% (0,24-2,17), соответственно. При культивировании МНК в отсутствии каких-либо стимулов относительное количество экспрессирующих VEGFR-1 Т-клеток достоверно возрастало, достигая максимума через 48 часов.

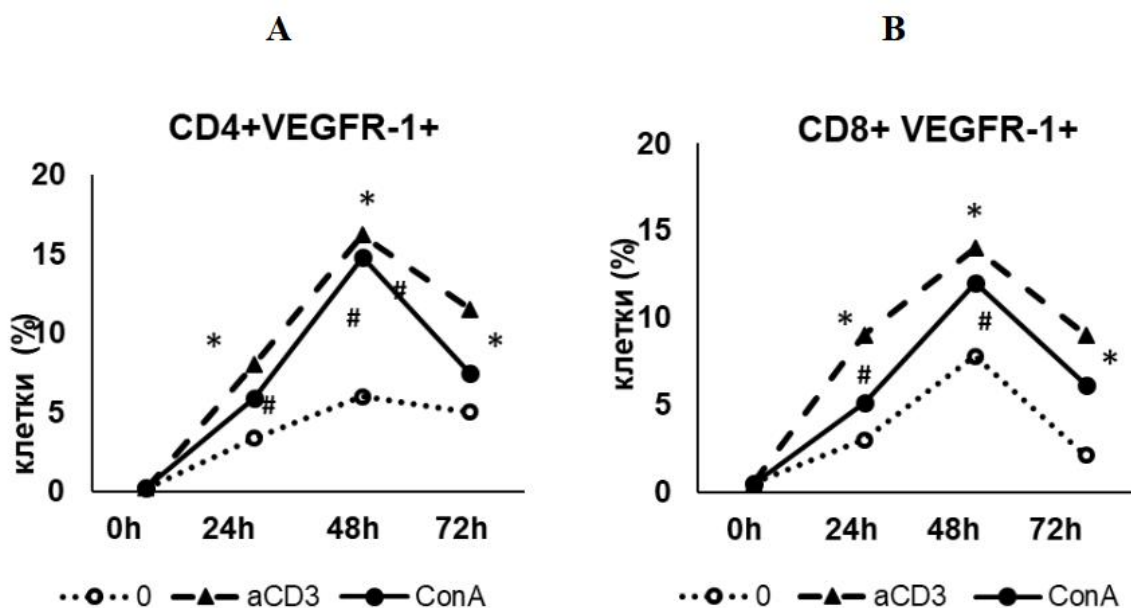


Рисунок 3 - Экспрессия VEGFR-1 на CD4+ (A) и CD8+ (B) Т-клетках в нестимулированных- (0), aCD3-стимулированных (aCD3) и ConA-стимулированных культурах МНК (n=8). *- $p < 0,05$ - достоверность различий по сравнению с нестимулированными МНК; # $p < 0,05$ - достоверность различий по сравнению со свежевыделенными МНК (W-критерий Вилкоксона).

Так доля CD4+VEGFR-1+ клеток через 24 часа увеличивалась до 2,7% (IQR 1,0-7,5%; $pU = 0,017$), через 48 часов возрастала до 6,15% (IQR 2,0-11,0%; $pU = 0,017$) и к 72 часам снижалась до показателей в свежевыделенных МНК (рис. 3A). Относительное содержание CD8+VEGFR1+ клеток через 24 часа повышалось до 3% (IQR 0,54 - 8,5%; $pU = 0,027$), через 48 часов достигало 7,8% (IQR 2,5-11,5%; $pU = 0,027$) и к 72 час снижалось до 2,1% (2,5-11,5%; $pU = 0,058$) (рис. 3B). Стимуляция МНК aCD3 приводила к возрастанию доли CD4 и CD8 Т-клеток, несущих VEGFR-1. Относительное содержание CD4+VEGFR-1+ и CD8+VEGFR-1+ клеток возрастало через 24 часа, достигало максимальных значений через 48 часов культивирования и к 72 часам умеренно снижалось. При этом доля CD4+VEGFR-1+ и CD8+VEGFR-1+ Т-клеток на всех исследуемых временных точках была достоверно выше, чем в нестимулированных культурах МНК. Схожая динамика экспрессии VEGFR-1 на CD4 и CD8-лимфоцитах прослеживалась в культурах ConA – стимулированных клеток.

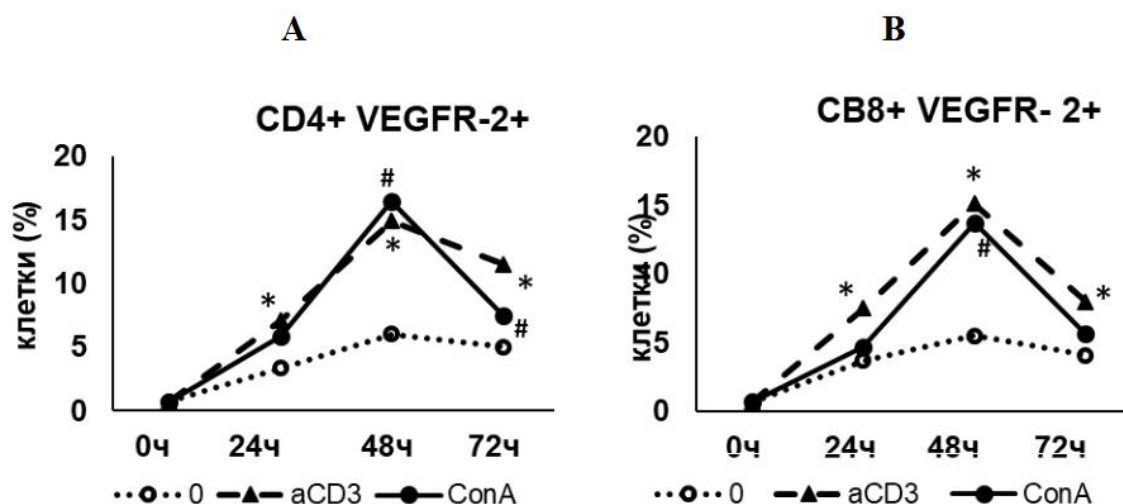


Рисунок 4 - Экспрессия VEGFR-2 на CD4+ (А) и CD8+ (В) Т-клетках в нестимулированных (0), aCD3-стимулированных (aCD3) и ConA-стимулированных (ConA) культурах МНК (n=8). *- $p < 0,05$ - достоверность различий по сравнению с нестимулированными МНК; # $p < 0,05$ - достоверность различий по сравнению со свежевыделенными МНК (U-критерий Вилкоксона).

Для сравнения была исследована экспрессия на Т-клетках VEGFR-2 - не связывающего PlGF, но реагирующего с другим ангиогенным фактором – VEGF - (Рис.4). В свежевыделенных МНК популяции CD4+ и CD8+ Т- лимфоцитов содержали очень низкое количество клеток, несущих данный рецептор - 0,7 (0,35-1,33)% и 0,7 (0,36-1,1)%, соответственно. При культивировании МНК в отсутствие активирующих стимулов доля CD4+VEGFR-2+ Т-клеток возрастала через 24 час, сохранялась на данном уровне в 48- часовых культурах и к 72 час снижалась (Рис. 4А). Относительное содержание CD8+VEGFR-1+ клеток также достоверно повышалось через 24 час (3%), через 48 час достигало 7,8%, а к 72 час снижалось до 2,1% (Рис 4В). Таким образом, особенности экспрессии и динамика изменений экспрессии VEGFR-2 при активации Т-клеток была очень схожа с таковыми для VEGFR-1.

Чтобы убедиться, что иммуномодулирующий эффект PlGF является специфичным и опосредуется через VEGFR-1 сигнальный путь, исследовали как

блокирование VEGFR-1 сигнального пути будет сказываться на способности фактора ингибировать пролиферацию активированных Т-клеток (Рис 5).

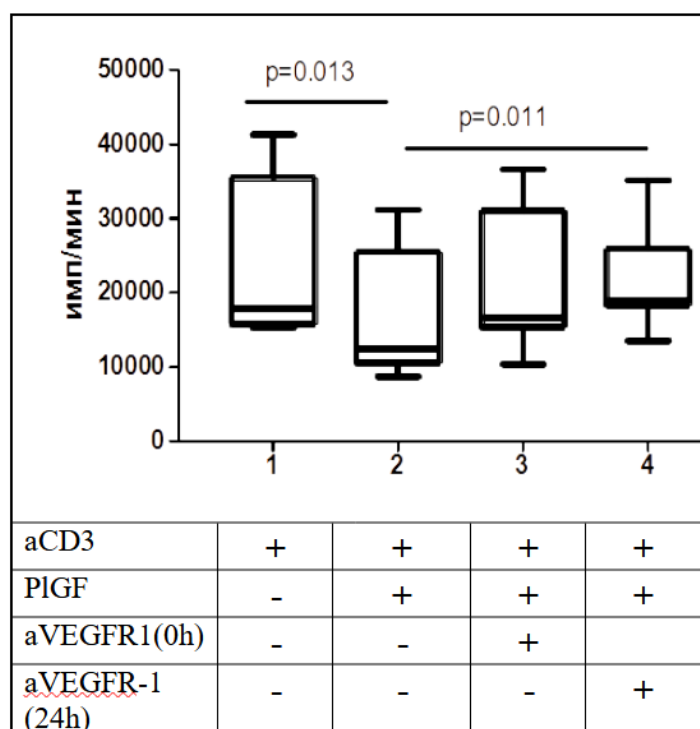


Рисунок 5 - Супрессорный эффект нейтрализующих a-VEGFR-1 антител на пролиферативный ответ МНК в a-CD3-стимулированных культурах клеток. Примечание. Данные представлены в виде медианы, IQR и диапазона минимальных и максимальных значений (n=8). МНК стимулировали a-CD3-антителами в отсутствии (1) и присутствии (2-4) PlGF (5 нг/мл). Нейтрализующие a-VEGFR-1 (2,5 мкг/мл) антитела добавляли либо совместно с PlGF (3), либо через 24 ч культивирования (4). Р – достоверность различий, W - критерий Вилкоксона.

Для этого влияние PlGF на пролиферацию aCD3-стимулированных МНК исследовали в присутствии и отсутствие нейтрализующих антител против VEGFR-1 (aVEGFR-1). Видно, что PlGF достоверно подавлял пролиферативный ответ в aCD3-стимулированных культурах МНК, а добавление aVEGFR-1 практически отменяло ингибирующий эффект. Так, в отсутствие блокирующих антител медиана супрессорного эффекта PlGF составляла 31% (IQR 26-38, pU = 0,013), а при одновременном добавлении с фактором aVEGFR-1 (с момента

инициации культуры) снижалась до 9% (IQR 3,0-25). Интересно, что отсроченное добавление aVEGFR-1 через 24 часа от начала культивирования еще в большей мере отменяло супрессорный эффект PlGF, который в этом случае снижался до 3%, т.е. практически отсутствовал. Выявленное более выраженное подавление супрессорной активности PlGF при добавлении aVEGFR-1 через 24 часов, возможно, связано с низкой экспрессией VEGFR-1 на свежеизолированных Т-клетках и существенном возрастании VEGFR-1+ Т-клеток через 24 часа после активации. Таким образом, отмена супрессорного эффекта PlGF в результате блокирования VEGFR-1 свидетельствует о том, что ингибирующий эффект PlGF на Т-клетки опосредуется через VEGFR-1-сигнальный путь.

Важно отметить, что PlGF способен активировать МНК к продукции VEGF [16], который также может ингибировать пролиферацию Т-клеток, опосредуя свой эффект через VEGFR-2 [211, 188]. Чтобы исключить возможное участие VEGF в реализации супрессорного эффекта PlGF, а также неспецифическое действие антител, в отдельной серии экспериментов исследовали влияние нейтрализующих антител против VEGFR-2 (в сравнении с эффектом антител против VEGFR-1) на супрессорную активность PlGF.

Как видно из данных рисунка 6, в отличие от aVEGFR-1, которые эффективно подавляли супрессорную активность PlGF (особенно при добавлении в культуры МНК через 24 часа), блокирование VEGFR-2 (как при добавлении в культуру одновременно с PlGF, так и через 24 часа с момента культивирования МНК) не ослабляло супрессорного эффекта фактора.

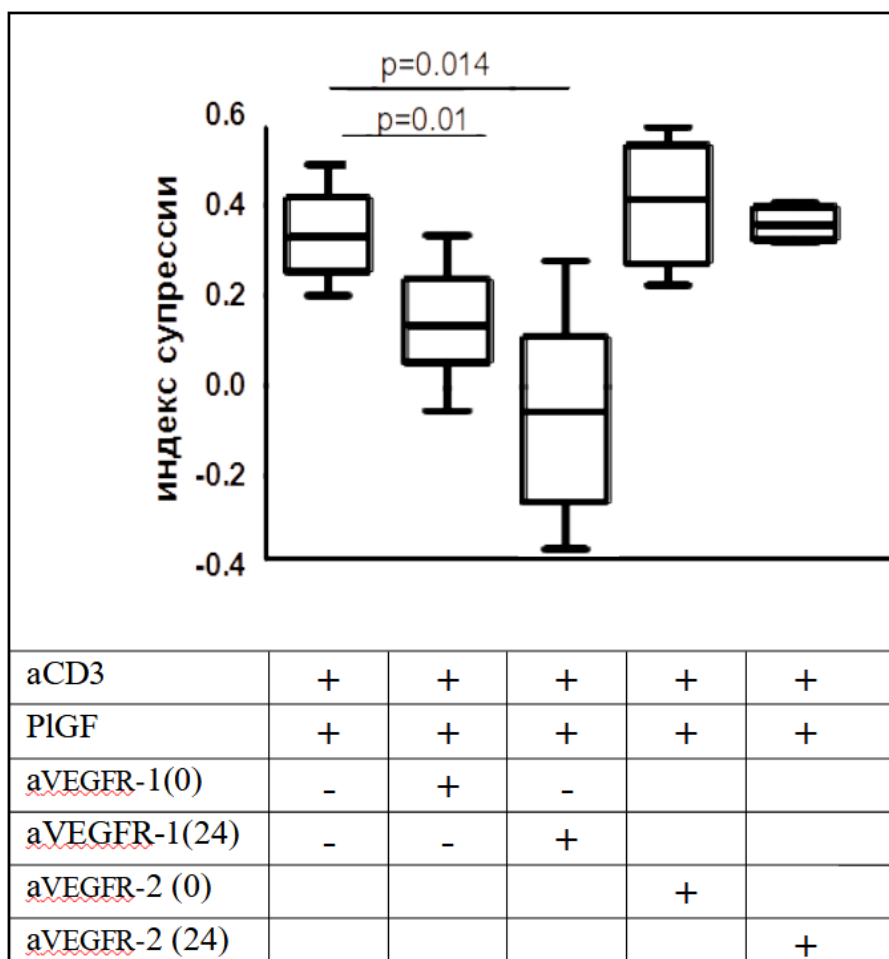


Рисунок 6 - Влияние нейтрализующих a-VEGFR-1 и a-VEGFR-2 антител на супрессорную активность PlGF. Примечание. Данные представлены в виде медианы, IQR и диапазона минимальных и максимальных значений (n=8). МНК стимулировали a-CD3-антителами в присутствии PlGF (5 нг/мл). Нейтрализующие a-VEGFR-1 (2, 3) и a-VEGFR-2 антитела (3, 5) добавляли в дозе 2,5 мкг/мл либо совместно с PlGF (0h), либо через 24 ч культивирования (24h). P – достоверность различий, W - критерий Вилкоксона. Индекс супрессии рассчитывали по формуле 1- (ответ в присутствии PlGF/ответ в отсутствие PlGF).

Полученные в целом данные свидетельствуют о том, что Т-клетки в популяции свежевыведенных МНК, т.е. находящиеся «в покое», практически не экспрессируют VEGFR-1, однако активация клеток при спонтанном культивировании (активация Т-клеток, распознающих собственные антигены гистосовместимости), и особенно, при стимуляции через Т-клеточный рецептор (aCD3) или альтернативно (ConA) приводит к экспрессии VEGFR-1 с пиком на 48 часов. Аналогичная закономерность выявлена в отношении экспрессии Т-

клетками VEGFR-2, являющегося лигандом для наиболее хорошо изученного ангиогенного фактора VEGF. Ингибирующий эффект PlGF на активированные Т-клетки, реализуется через связывание с VEGF-R1 и не связан с активацией VEGF-R2, поскольку блокада нейтрализующими антителами именно VEGFR-1, но не VEGFR-2, отменяла супрессорный эффект PlGF на пролиферацию Т-клеток.

3.3 Влияние PlGF на продукцию IL-10, апоптоз Т-клеток и экспрессию ингибиторных рецепторов

Снижение пролиферации может быть обусловлено различными механизмами, включая блокаду клеточного цикла, а также усиление продукции иммуносупрессивных цитокинов и/или активационно-индуцированной гибели Т-клеток. Поэтому на следующем этапе исследовали влияние PlGF на продукцию иммуносупрессивного цитокина IL-10 и апоптоз активированных Т-клеток. Важная роль в подавлении функций Т-клеток отводится также ингибиторным рецепторам (чек-поинт молекулам), которые участвуют в опосредовании механизмов периферической толерантности и клеточного истощения [102, 187]. Поскольку способность усиливать экспрессию ингибиторных рецепторов была ранее продемонстрирована для VEGF [17], представлялось важным выяснить, оказывает ли PlGF какой-либо эффект на экспрессию ингибиторных чек-поинт молекул активированными Т-клетками.

3.3.1. Эффект PlGF на продукцию Т-клетками IL-10

Для оценки влияние PlGF на продукцию Т-клетками IL-10 (**Рис. 7**), исследовали относительное количество CD4⁺ и CD8⁺ Т клеток, продуцирующих IL-10 в культурах αCD3-стимулированных МНК доноров в присутствии и отсутствие PlGF. Доля IL-10⁺ клеток в субпопуляции CD4⁺ лимфоцитов в культурах нестимулированных МНК составляла 0,8 (0,43-1,5)% и при стимуляции αCD3 возрастала более чем в 2 раза - до 2,0 (1,5-2,0)%, хотя выявленные различия не достигали статистической достоверности (pW = 0,16),

что объяснялось возрастание доли CD4+IL-10+ в культурах МНК 5 из 9 тестируемых доноров, тогда как в культурах МНК 3-х доноров содержание CD4+IL-10+ клеток не менялось, а у одного донора (с высокой долей CD4+IL-10+ клеток в нестимулированных культурах) – снижалось. Уровень IL-10+ клеток в субпопуляции CD8+ лимфоцитов в нестимулированных МНК составлял 2,3 (1,3-6,4)% и достоверно возрастал в культурах aCD3-стимулированных МНК до 5,0 (3,0-7,0)% ($p_W = 0,16$). При анализе индивидуальных данных прирост IL-10-продуцирующих клеток среди CD8+Т-лимфоцитов на фоне стимуляции aCD3 отмечался у 8 из 11 обследованных доноров (у трех доноров изменений не было).

Добавление в культуры aCD3-стимулированных МНК PlGF приводило к увеличению относительного содержания IL-10-продуцирующих клеток. Доля CD4+IL-10+Т-клеток возрастала до 3,0 (2,0-4,0)%. Это увеличение было статистически достоверным ($p_W = 0,012$) и проявлялось в культурах МНК 8 из 9 тестируемых доноров. Стимулирующий эффект PlGF составлял 87% (30-100%). Доля CD8+IL-10+Т-клеток в присутствии PlGF возрастала до 8,2 (4,2-17)% ($p_W = 0,004$). Стимулирующий эффект PlGF наблюдался в культурах МНК 10 из 11 тестируемых доноров, составлял 35 (25-110)% и на уровне медианы был ниже, чем в эффект в отношении CD4+ клеток, однако различия были недостоверны ($p_U = 0,59$). Учитывая более высокое содержание IL-10-продуцирующих клеток в субпопуляции Т-лимфоцитов, доля CD8+IL-10+Т-клеток в культурах с PlGF в 2,7 раза превышала содержание CD4+IL-10+Т-клеток ($p_U = 0,011$).

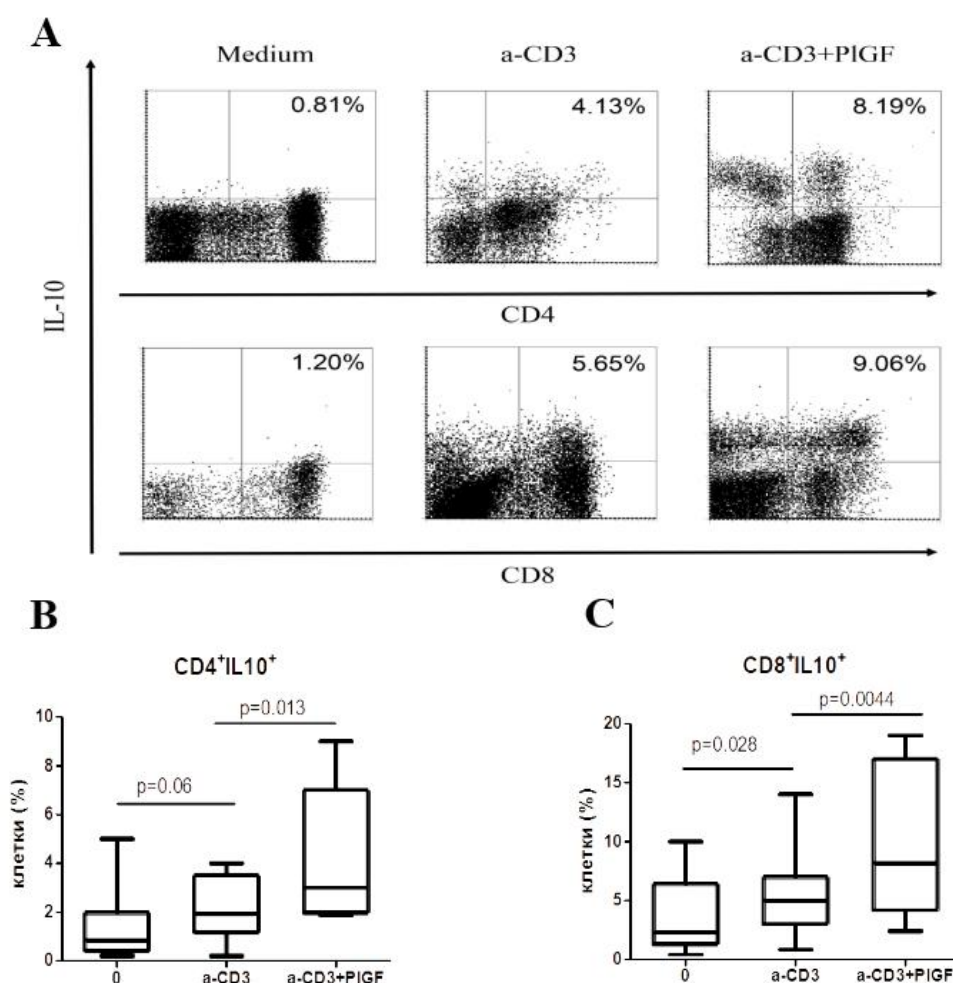


Рисунок 7 - Влияние PlGF на способность CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток к продукции IL-10 культурах aCD3-стимулированных МНК. Свежевыделенные МНК от 10 здоровых доноров культивировали в среде (0) или aCD3 в отсутствие (a-CD3) и присутствии (a-CD3+PlGF) PlGF (5 нг/мл). После 3 суток культивирования клетки отмывали и оценивали в них относительное содержание IL-10⁺ клеток в гейтах CD4⁺ (B) и CD8⁺ (C) лимфоцитов. Данные представлены в виде репрезентативных дот-плотов (A) и боксов, отражающих интерквартильные диапазоны со значениями медианы и минимума - максимума (B,C). Р-достоверность различий, W – критерий Виококсона.

3.3.2 Влияние PlGF на апоптоз активированных CD4+ и CD8+Т-лимфоцитов

На следующем этапе исследовали участие PlGF в регуляции активационно-индуцированного апоптоза CD4+ и CD8+Т-лимфоцитов. Чтобы дифференцировать апоптотические и некротические клетки использовали трехцветную проточную цитофлуориметрию. Клетки с фенотипом Ann+/7ADD–, которые были позитивны по аннексину V (Ann+) и не включают ядерный краситель (7-ADD) расценивались, как клетки в состоянии раннего апоптоза. Фенотип Ann+/7-ADD+, выявляющий клетки, позитивные по аннексину и включающие ядерный краситель, идентифицировал клетки в состоянии позднего апоптоза или некроза. Фенотип Ann–/7-ADD– соответствовал жизнеспособным клеткам.

Преобладающее большинство клеток в популяции нестимулированных МНК были жизнеспособными (Ann–/7-ADD–) и содержали низкое количество апоптотических клеток. Так, доля Ann+/7-ADD– клеток в субпопуляции CD4+ Т-клеток составляла 4,0 (3,2-5,2)%, а в субпопуляции CD8+ Т-клеток – 3,3 (2,4-5,8)%. Активация МНК aCD3 (48 часов) приводила к статистически достоверному возрастанию относительного содержания Ann+/7-ADD– клеток как в субпопуляции CD4+, так и CD8+ Т лимфоцитов (рис. 8). Относительное содержание Ann+/7-ADD– клеток в субпопуляции CD4+Т-лимфоцитов возрастало до 7,5 (5,8-8,0)%, в субпопуляции CD8+Т-лимфоцитов до 5,0 (1,6-9,3)%. В присутствии PlGF процентное содержание Ann+/7-ADD– CD4+ Т-лимфоцитов не отличалось от такового в культурах МНК, стимулированных aCD3 в отсутствие фактора и составляло 7,0 (5,0-10)%. В то же время доля Ann+/7-ADD–CD8+ Т-клеток в присутствии PlGF была достоверно выше (7%; IQR 5,0-10), чем в отсутствие фактора (5,0%; IQR 1,6-9,3).

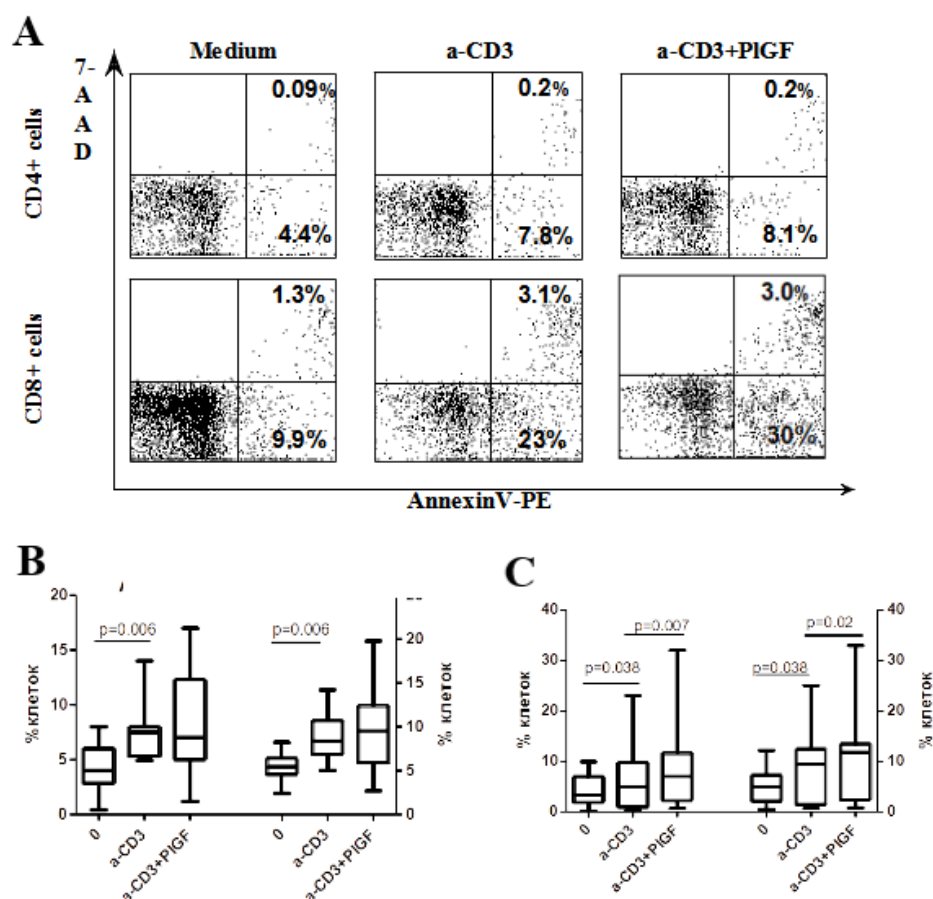


Рисунок 8 - Влияние PlGF на апоптоз Т клеток в а-CD3 стимулированных культурах МНК. Представлены репрезентативные данные содержания клеток в стадии раннего апоптоза (annV⁺ 7-ADD⁻) и общего количества апоптотических клеток (Ann V⁺) в гейтах CD4⁺ и CD8⁺ клеток (A) и суммированные данные 4-х независимых экспериментов (n=9-12), проанализированные с помощью критерия Вилкоксона (B,C).

Аналогичные закономерности выявлялись при анализе суммарной популяции Ann⁺ клеток, включающей клетки на стадии раннего апоптоза и позднего апоптоза/некроза. Активация аCD3 в культурах МНК приводила к достоверному увеличению Ann⁺CD4⁺ клеток с 5,4 (4,7-6,4)% до 8,4 (7,2-10,7)%, и добавление PlGF не сопровождалось значимым изменением процентного содержания этих клеток. Доля Ann⁺CD8⁺ клеток при стимуляции МНК аCD3 достоверно возрастала с 5,0 (2,8-6,3)% до 9,3(1,6-11) %. Причем присутствие PlGF повышало содержание Ann⁺CD8⁺ клеток до 12 (9,4-13)%. Следует отметить, что возрастание Ann⁺/7-ADD⁻CD8⁺ и общего количества Ann⁺CD8⁺

клеток регистрировалось в культурах МНК всех 9 тестируемых доноров. При этом стимулирующий эффект PlGF более ярко проявлялся в отношении раннего апоптоза CD8 клеток. Так, ИВ PlGF на содержание Ann+/7-ADD-CD8 клеток составлял 1,4 (1,3-2,1) и достоверно превышал ИВ PlGF на относительное количество Ann+ CD8 клеток - 1,24 (1,1-1,3); $pU=0,015$.

Полученные данные свидетельствуют, что PlGF в культурах aCD3-стимулированных МНК индуцирует в Т-клетках продукцию IL-10, что проявляется возрастанием относительного содержания Т-клеток, с внутриклеточной экспрессией IL-10 в присутствии PlGF. Стимулирующий эффект PlGF на продукцию IL-10 регистрируется как в субпопуляции CD4+, так и субпопуляции CD8+ Т-лимфоцитов, однако обратная корреляция между содержанием IL-10-продуцирующих клеток и уровнем пролиферации прослеживается на уровне тренда только для субпопуляции CD4+ Т-лимфоцитов. Другим проявлением иммуномодулирующей активности PlGF является способность фактора усиливать активационно-индуцированную гибель Т-клеток. Данный эффект проявляется возрастанием клеток в состоянии раннего апоптоза (AnnV+7-ADD-) и общего количества апоптотических клеток (AnnV+) клеток в культурах aCD3-стимулированных МНК в присутствии PlGF. Однако в отличие от стимулирующего эффекта PlGF на продукцию IL-10, который проявлялся в обеих субпопуляциях Т-клеток (CD4+ и CD8+), усиления апоптоза в присутствии PlGF наблюдается только в субпопуляции CD8+ Т-клеток.

3.3.3 Влияние PlGF на экспрессию ингибиторных рецепторов Т-клетками

Активация Т-клеток, инициированная антиген-зависимыми сигналами через Т-клеточные рецепторы, находится под строгим контролем сигналов через стимулирующие и ингибирующие корецепторы, способные усиливать или подавлять иммунный ответ. При этом коингибиторные рецепторы, которые получили название ингибиторных чек-пойнт молекул, играют важную роль в ограничении Т-клеточного ответа, участвуя в опосредовании механизмов периферической толерантности [189] и клеточного истощения. Соответственно,

усиление экспрессии чек-поинт молекул на Т-клетках может являться важным фактором, обуславливающим подавление Т-клеточных функций. Поскольку способность усиливать экспрессию коингибиторных рецепторов была ранее продемонстрирована для VEGF [189, 17], представлялось важным выяснить, оказывает ли PlGF какой-либо эффект на экспрессию коингибиторных молекул активированными Т-клетками. Для этого исследовали влияние PlGF на относительное содержание CD4⁺ и CD8⁺Т клеток, несущих молекулы PD-1, CTLA-4 и Tim-3, и среднюю флуоресценцию указанных молекул в культурах aCD3-стимулированных МНК доноров (Рис. 9).

Медианный уровень CD4⁺ клеток, экспрессирующих PD-1 (Рис 9А), среди выделенных МНК не превышал 1% (0,81; 0,63-1,26), возрастал до 3,7(2,2-4,3)% ($p=0,025$) после 48-часового спонтанного культивирования МНК (в отсутствие стимулов) и достигал 6,1 (3,0-7,2) % при стимуляции aCD3, достоверно превышая аналогичный показатель в популяции изолированных МНК. В присутствии PlGF доля CD4⁺PD-1⁺ клеток не менялась и составляла 5,8 (4,5-8,2)%. Анализ экспрессии PD-1 на CD8⁺ Т-клетках показал, что уровень CD8⁺ клеток, несущих PD-1, среди свежеизолированных МНК составлял 0,61 (0,3-1,2)%, в популяции спонтанно культивируемых МНК увеличивался до 2,4 (1,6-2,8)% ($p=0,025$) и при стимуляции aCD3 - до 3,2 (2,4-4,2) %, что было достоверно выше, чем в популяции свежеизолированных ($p=0,017$) и нестимулированных ($p=0,017$) МНК. В присутствии PlGF доля CD8⁺PD-1⁺ незначительно возрастала до 3,8 (2,9-4,5)%, однако эти изменения не были статистически достоверны. При анализе индивидуальных данных увеличение относительного содержания CD8⁺PD-1⁺ клеток отмечалось в культурах МНК 6 из 8 тестируемых доноров.

При оценке экспрессии CTLA-4 (Рис. 9В) - доля CTLA-4- экспрессирующих клеток в субпопуляции CD4⁺ лимфоцитов возрастала с 1,7 (0,9-3,5)% в свежеизолированных МНК до 4,7 (2,1-7,1)% в спонтанно культивируемых МНК ($p=0,049$) и 7,0 (2,4-10)% при стимуляции aCD3 ($p=0,049$). При этом добавление фактора не влияло на содержание этих клеток. Относительное количество CD8⁺CTLA-4 клеток в популяции изолированных МНК было также низким (0,27;

0,1-0,5 %) и не менялось значимо при спонтанном культивировании МНК (0,25; 0,1-0,54%) или их активации аCD3 (0,29; 0,11 - 0,67%). В присутствии фактора доля CD8+CTLA-4+ клеток была несколько выше (0,55; 0,26-0,74%), однако эти изменения не были статистически значимы.

Анализ экспрессии молекулы Tim-3 (рис. 9 С) показал, что доля этих клеток среди CD4+ лимфоцитов, составляющая в популяции изолированных МНК 1,4 (1,1-2,6)%, возрастала в культурах нестимулированных МНК до 2,9 (2,0-3,6)% ($p=0,049$) и достигала 3,7% (2,7-5,3)% в аCD3- стимулированных МНК ($p=0,017$). При этом добавление PlGF сопровождалось достоверным увеличением CD4+Tim-3+ клеток до 5,0 (3,3-6,6)%. Увеличение доли CD4+Tim-3+ клеток в присутствии фактора выявлялось в культурах МНК 7 из 8 тестируемых доноров. Аналогичные закономерности выявлялись при оценке экспрессии Tim-3+ на CD8+ клетках. Относительное содержание CD8+Tim-3+ в изолированных МНК составляло 0,42 (0,1-0,8)%, незначительно увеличивалось в культурах нестимулированных МНК до 0,7 (0,14-1,6)% и достоверно возрастало в аCD3- стимулированных МНК до 2,4 (1,6-3,3)%. В присутствии PlGF доля CD8+Tim-3+ клеток (5,1; 3,4-6,1%) 2-кратно превышала аналогичный показатель в культурах МНК, стимулированных аCD3 в отсутствие фактора. Стимулирующий эффект PlGF регистрировался в культурах МНК всех 8 тестируемых доноров.

Анализ средней интенсивности флуоресценции (MFI) исследуемых коингибиторных молекул (табл. 5) показал, что наряду с увеличением относительного содержания Т-клеток, несущих коингибиторные рецепторы, PlGF также усиливал среднюю интенсивность экспрессии чек-поинт молекул на Т-клетках.

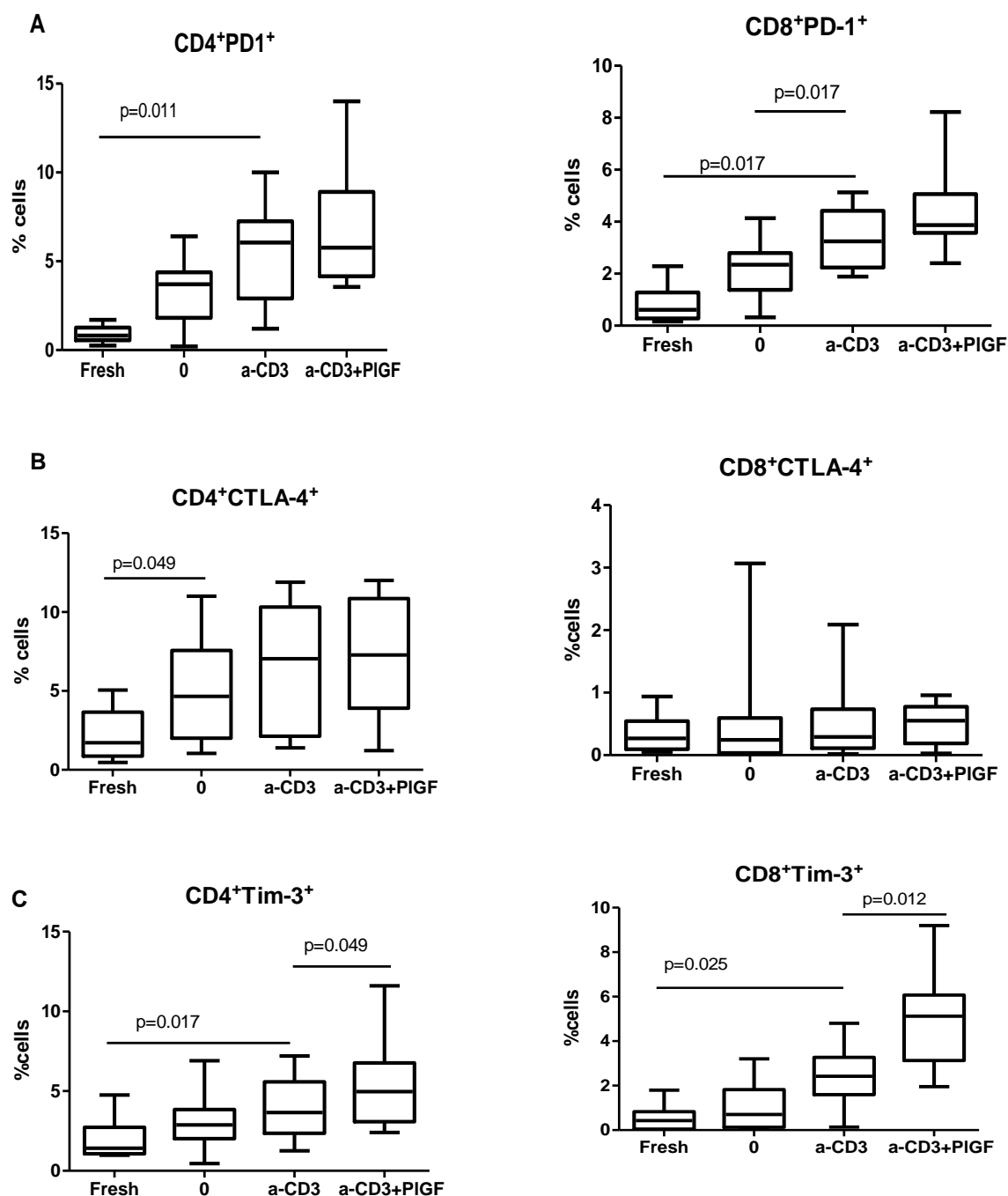


Рисунок 9 - Влияние PlGF на экспрессию PD-1, CTLA-4 и Tim-3 Т-клетками в а-CD3-стимулированных МНК. Представлено относительное содержание PD-1+ (A), CTLA-4+ (B) и Tim-3+ (C) клеток в области CD4+ и CD8+ Т-клеток. Fresh – изолированные МНК; 0 – культуры нестимулированных МНК; а-CD3 и а-CD3+PlGF –культуры аCD3-активированных МНК в отсутствие и присутствии PlGF (5 нг/мл), соответственно. P- достоверность различий, W -парный критерий Вилкоксона.

Так, стимуляция aCD3 достоверно усиливала экспрессию молекулы PD-1 на CD4+ клетках по сравнению с уровнем в изолированных ($p=0,025$) и спонтанно культивируемых МНК ($p=0,028$), а в присутствии PlGF показатель MFI возрастал еще в большей степени, превышая уровень в культурах МНК, активированных aCD3 в отсутствие фактора ($p=0,017$). Усиление MFI в последнем случае регистрировалось в культурах МНК 7 из 8 тестируемых доноров. Изменений в средней интенсивности флюорисценции молекулы CTLA-4 на CD4+ клетках при активации МНК, в том числе в присутствии фактора, не выявлялось. В то же время анализ экспрессии Tim-3 показал усиление средней интенсивности флюорисценции Tim-3 на CD4+ клетках в aCD3-стимулированных МНК по сравнению с таковыми в изолированных ($p=0,03$) и нестимулированных ($p=0,08$) МНК. Уровень MFI в присутствии PlGF достоверно возрастал ($p=0,029$). При этом стимулирующий эффект PlGF наблюдался в культурах МНК 7 из 8 доноров-тестеров.

При оценке средней интенсивности флюорисценции ингибиторных рецепторов на CD8+ клетках, активация МНК aCD3 приводила к усилению средней интенсивности флюорисценции молекулы PD-1 по сравнению со изолированными ($p=0,06$) и спонтанно культивируемыми МНК ($p=0,018$). Аналогичным образом, уровень MFI молекулы Tim-3 в aCD3- стимулированных культурах был достоверно выше, чем в популяции изолированных МНК ($p=0,017$) и нестимулированных культурах МНК ($p=0,017$). При этом добавление PlGF к aCD3-стимулированным МНК приводило к достоверному возрастанию уровней MFI всех трех исследуемых молекул - PD-1 ($p=0,018$), CTLA-4 ($p=0,04$) и Tim-3 ($p=0,049$).

Полученные данные свидетельствуют о том, что активация Т-клеток при связывании Т клеточных рецепторов (TCR) с aCD3 приводит к усилению экспрессии ингибиторных чек-поинт молекул. В субпопуляции CD4+ лимфоцитов это проявляется возрастанием относительного количества PD-1+, CTLA-4+ и Tim-3+ клеток, а также средней интенсивности флюоресценции молекул PD-1 и Tim-3;

Таблица 5 Влияние PlGF на плотность экспрессии чек-поинт молекул активированными CD4+ и CD8+ Т-клетками

MFI (усл. Ед)	PD-1	CTLA-4	Tim-3
CD4+Т-клетки			
Свежеизолированные МНК	31 (26-32)	25 (20-30)	28 (19-32)
МНК +0	37 (28-41)	34 (19-44)	36 (23-42)
МНК+ aCD3	41 (33-46)*,**	36 (22-44)	40 (33-47)*
МНК + aCD3+PlGF	51 (39-59)#	38 (27-49)	47 (36-55)#
CD8+Т-клетки			
Свежеизолированные МНК	30 (29-32)	30 (19-40)	24 (20-31)
МНК +0	36 (26-39)	36 (26-40)	30 (19-48)
МНК+ aCD3	40 (32-43)**	39 (20-44)	44 (38-55)*,**
МНК + aCD3+PlGF	48 (36-56)#	45 (22-60)#	46 (41-57)#

Примечание: данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (в скобках), n=8 *- p<0.05; достоверность различий со изолированными МНК: ** - p<0.05; достоверность различий в культурах нестимулированных и aCD3-стимулированных МНК: #- p<0,05; достоверность различий по сравнению с aCD3-стимулированными культурами МНК; p- парный критерий Вилкоксона.

в субпопуляции CD8+ лимфоцитов - возрастанием процентного содержания и средней интенсивности флуорисценции молекул PD-1 и Tim-3. Присутствие PlGF в культурах aCD3-стимулированных МНК приводит к дальнейшему повышению средней интенсивности флюоресценции всех трех коингибиторных молекул (PD-1, CTLA-4, Tim-3), а также возрастанию относительного количества Tim-3+ клеток в субпопуляциях CD4+ и CD8+ лимфоцитов. Из представленных данных также следует, что стимулирующий эффект PlGF на экспрессию коингибиторных рецепторов наиболее выражен в отношении молекулы Tim-3, что подтверждается увеличением как доли Tim-3+ клеток, так и плотности экспрессии данной молекулы, и наименьшим – в отношении молекулы CTLA-4, достоверное усиление интенсивности

флюоресценции которой регистрируется только в популяции CD8⁺ Т-клеток (а в популяции CD4⁺ клеток наблюдается в виде тренда) и не сопровождается увеличением процентного содержания CTLA-4⁺ клеток.

3.4 Экспрессия ингибиторных молекул (PD-1-, CTLA-4- и Tim-3) субпопуляциями CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в периферической крови фертильных небеременных и беременных с неосложненным течением гестации

Формирование толерантности к отцовским аллоантигенам, как неперенное условие успешной беременности, требует адаптации иммунной системы матери [1]. Молекулярные механизмы такой перестройки остаются недостаточно исследованными. Тем не менее, предполагается, что существенную роль в реализации иммунной адаптации играют ингибиторные молекулы (чек-поинт молекулы). Активация этих рецепторов подавляет функции эффекторных Т-клеток, влияет на Th1/Th2 баланс и функционирование Трег [94]. Стойкая повышенная экспрессия ингибиторных рецепторов и особенно их ко-экспрессия также ассоциирована с состоянием Т-клеточного истощения — которое характеризуется прогрессирующим снижением функциональной активности Т-клеток и наряду с периферической толерантностью представляет еще один механизм подавления функций антигенспецифических Т-клеток [158, 187].

Исследования экспрессии ингибиторных молекул, сосредоточенные при беременности в основном на оценке децидуальных Т-лимфоцитов, выявили повышенную экспрессию ряда чек-поинт молекул. В то же время данные об экспрессии этих молекул на периферических Т-клетках и их роли при беременности, практически отсутствуют. Между тем фетальные антигены экспрессируются не только на границе мать-плод, но также попадают в общий кровоток матери и обнаруживаются во вторичных лимфоидных органах. Поэтому, чтобы избежать иммунологического конфликта, состояние толерантности должно поддерживаться не только на локальном, но и системном уровне. Полученные в предыдущей главе данные о способности PlGF

индуцировать экспрессию чек-поинт молекул на Т-клетках периферической крови *in vitro* в совокупности с данными о выраженном повышении концентрации PlGF при беременности позволяет предполагать, что физиологическое течение беременности сопряжено с активацией супрессорных механизмов, опосредованных чек-поинт молекулами, а патология беременности, в частности, развитие ПЭ - с ослаблением этих механизмов.

Чтобы исследовать возможное участие ингибиторных чек-поинт молекул в иммунной адаптации при беременности, было исследовано содержание в периферической крови CD4 и CD8 Т-клеток, экспрессирующих молекулы PD-1, CTLA-4 и Tim-3, при неосложненной гестации в сравнении с фертильными небеременными женщинами.

Группу пациенток с неосложненным течением беременности составили 36 женщины во второй половине беременности в возрасте от 18 до 45 лет (Табл.6). Срок гестации варьировал от 26 до 40 недель с медианой 34 недели. Преобладающее большинство беременных (30 из 36) находились в 3-ем триместре беременности, возраст большинства из них (31 из 36) был менее 40 лет. Как видно, у 20 (55,6%) женщин беременность была первой, у 16-ти (44,4%) - повторной. Первые роды имели место у 26 (72,2%) беременных, повторные – у 10 (27,8%) женщин. Контрольную группу составили 28 фертильных небеременных женщин, медианный возраст которых (Me - 31 год; IQR 25-34 лет) достоверно не отличался от возраста беременных ($P=0,11$).

Основное внимание было уделено оценке PD-1-экспрессирующих Т-клеток, содержание которых в субпопуляциях CD4+ и CD8+ клеток исследовали у всех 36 беременных и 28 небеременных контрольной группы. Кроме того, у значительной части обследуемых была проанализирована экспрессия молекул CTLA-4 (18 беременных и 20 небеременных) и Tim-3 (19 беременных и 26 небеременных), а также ко-экспрессия молекул PD-1 и Tim-3 (14 беременных и 16 небеременных).

Таблица 6 - Характеристика беременных с неосложненным течением гестации

Параметры	
Количество	36
Возраст (лет), Me (IQR), мин—макс	27 (18-45)
< 40 лет (n)	34
≥ 40 лет (n)	2
Срок беременности (недель) Me (IQR); мин—макс	36 (31-37) 26-40
<28 нед (n)	3
≥ 28 нед (n)	33
Беременность по счету	
- первая	20
- вторая	7
- более 2-х	9
Паритет родов	
- 1	26
- >1	10

Анализ относительного содержания Т-клеток, экспрессирующих PD-1 молекулы (Табл. 7), показал, что доля PD-1+ клеток в субпопуляции CD4+ лимфоцитов беременных значимо не отличалась от таковой в контрольной группе небеременных. В то же время процентное содержание PD-1+ клеток в субпопуляции цитотоксических CD8+ лимфоцитов беременных в 2,4 раза превышало аналогичный показатель в контрольной группе небеременных.

При сравнении экспрессии PD-1 в субпопуляциях CD4+ и CD8+ лимфоцитов, относительное содержание CD4+PD-1+ клеток было выше, чем CD8+PD-1+ Т-лимфоцитов. Это проявлялось в виде тренда в группе небеременных ($P_w=0,09$) и достоверных различий в группе пациенток с неосложненной беременностью ($P_w=0,004$).

Исследование экспрессии CTLA-4 не выявило различий в содержании CD4+CTLA-4+ и CD8+ CTLA-4+ лимфоцитов в группах сравнения. Относительное содержание CD4+CTLA-4+ и CD8+CTLA-4+ лимфоцитов в группах небеременных и беременных также значимо не различалось ($P_w=0,16$ и $P_w=0,19$; соответственно).

Таблица 7 - Содержание Т-клеток, экспрессирующих ингибиторные рецепторы, у беременных с неосложненной гестацией и фертильных небеременных

Маркер (% клеток)	Фертильные небере- менные, n=16-28	Неосложненная беременность, n=14-36	Pu
CD4+PD-1+	4,1 (3,0-5,9); n=28	5,0 (2,8-8,4) n=36	0,24
CD8+PD1-+	2,9 (1,1-5,9); n=28	6,9 (4,8- 12) n=36	0,00004
CD4+CTLA-4+	2,6 (1,3-4,0) n=20	2,6 (2, 1-3,9) n=18	0,73
CD8+CTLA-4+	2,0 (0,93-3,4) n=20	2,4 (0,58-4,1) n=19	0,7
CD4+Tim-3+	1,4 (1,0-2,9) n=26	7,0 (4,0-10) n=16	0,00006
CD8+Tim-3+	5,2 (2,5-9,2) n=26	5,3 (1,5-8,2) n=19	0,4
CD4+ PD-1+Tim-1+	0,35 (0,19-0,5) n=16	1,8 (1,1-2,6) n=14	0,0009
CD8+ PD-1+Tim-3+	1,5 (0,66-2,3) n=16	3,5 (1,5-4,5) n=14	0,031

Примечание: данные представлены в виде медиан и интерквартильных диапазонов (в скобках) относительного содержания клеток, несущих чек-поинт молекулы, среди CD4 и CD8+ лимфоцитов. Pu – достоверность различий, U- критерий Манна-Уитни.

Оценка Т-клеток, экспрессирующих Tim-3, выявила 5-кратное возрастание доли Tim-3+ клеток в популяции CD4+ лимфоцитов беременных по сравнению с небеременными. В то же время содержание Tim-3+ клеток среди CD8+ лимфоцитов у беременных и женщин контрольной группы не различалось. В контрольной группе небеременных доля Tim-3+ клеток в субпопуляции CD8+ лимфоцитов была достоверно выше, чем среди CD4+ лимфоцитов ($P_w=0,00006$). В то же время содержание Tim-3+ клеток в субпопуляциях CD4+ и CD8+ лимфоцитов беременных не различалось ($P_w=0,8$).

Учитывая возрастание PD-1+ и Tim-3+ клеток, представлялось также важным выяснить, насколько это связано с увеличением Т-клеток, одновременно экспрессирующих данные молекулы. Видно, что доля PD-1+Tim-3+ клеток в субпопуляции CD4+ лимфоцитов беременных в 5 раз превышала аналогичный

показатель в контрольной группе. Процентное содержание CD8+ клеток, ко-экспрессирующих PD-1 и Tim-3, у беременных было также повышено и превышало аналогичный показатель у небеременных в 2,3 раза. Характерно, что как у небеременных, так и беременных доля PD-1+Tim-3+ клеток в субпопуляции CD8+ лимфоцитов была достоверно выше, чем среди CD4+ лимфоцитов ($P_w=0,004$ и $P_w=0,005$, соответственно).

Поскольку группа беременных включала женщин в возрастном диапазоне от 18 до 45 лет, а сроки гестации варьировали от 26 до 40 нед, далее была проанализирована возможная сопряженность между экспрессией чек-поинт молекул и указанными факторами (Таблица 8).

Как видно, достоверных корреляционных связей между относительным содержанием Т-клеток, экспрессирующих молекулы PD-1, CTLA-4 и Tim-3, и возрастом не выявлялось. Тем не менее, отмечалась выраженная тенденция к обратной зависимости между возрастом и экспрессией Tim3 на цитотоксических CD8+ клетках (долей CD8+Tim-3+ и CD8+Tim-3+ PD-1+). В то же время относительное содержание CD8+Tim-3+ клеток, а также CD4+ и CD8+ клеток, ко-экспрессирующих PD-1 и Tim-3, прямо коррелировало со сроком гестации.

Таблица 8 - Корреляционные зависимости экспрессии чек-поинт молекул с возрастом и сроком гестации.

Субпопуляция (%)	Возраст	Срок гестации
CD4+PD-1+, n=36	- 0,08 (0,64)	0,19 (0,26)
CD4+CTLA-4+, n=18	0,04 (0,86)	0,06 (0,81)
CD4+Tim-3+, n=19	- 0,23 (0,33)	- 0,34 (0,14)
CD8+PD-1+, n=36	-0,004 (0,86)	- 0,23 (0,18)
CD8+CTLA-4+, n=18	- 0,04 (0,86)	- 0,01 (0,95)
CD8+Tim-3+, n=19	- 0,43 (0,06)	0,5 (0,03)
CD4+ PD-1+Tim-3+, n=14	0,05 (0,87)	0,54 (0,04)
CD8+ PD-1+Tim-3+, n=14	-0,42 (0, 1)	0,61(0,02)

Примечание : данные представлены в виде коэффициент корреляции (Rs), s – критерий Спирмена, в скобках – достоверность корреляционной связи.

Таким образом, из трех анализируемых молекул ассоциация с возрастом и гестационным сроком выявлялась только для молекулы Tim3 и была наиболее выраженной в отношении экспрессии Tim-3+ на CD8+ клетках. Причем, если в отношении гестационного срока эта зависимость была прямой и достоверной, то в отношении возраста — обратной и проявлялась виде выраженного тренда.

Следует отметить, что, несмотря на отсутствие поздних гестационных осложнений и, в первую очередь, ПЭ, исследуемая группа беременных была гетерогенной в плане сопутствующих экстрагенитальных заболеваний. В анализ сопутствующих заболеваний (табл. 9), представляющих коморбидный фон беременных и являющихся факторами риска гестационных осложнений, были включены следующие патологии: артериальная гипертензия, в том числе гестационная; отеки беременных, сахарный диабет, в том числе гестационный; ожирение; патология гемостаза; заболевания щитовидной железы (гипотиреоз, тиреотоксикоз); хронические заболевания почек и печени. Наличие одной или нескольких перечисленных выше патологий выявлялось у 12 из 36 (33,3%) беременных.

Как показал анализ индивидуальных данных, наиболее частой патологией являлся сахарный диабет, который в группе с сопутствующей патологией выявлялся в 7 из 12 (58,3%) случаев. Артериальная гипертензия отмечалась в 4-х случаях, ожирение — также у 4-х беременных. Патология гемостаза отмечалась у 3-х беременных, патология щитовидной железы в виде гипотиреоза - у двух беременных. Отеки беременных наблюдались у четырех и хронический пиелонефрит — у одной беременной. Патологии печени не было выявлено ни в одном случае. Наличие одновременно четырех патологий регистрировалось у одной (8,3%) беременной, трех патологий — у четырех пациенток (33,3%) и двух патологий (16,7%) - еще у двух беременных. В остальных 5 случаях отмечалось наличие только одной экстрагенитальной патологии.

Таблица 9 - Сопутствующая патология у беременных с неосложненной гестацией

№ п/п	Артер. гипертензия	Сахарный диабет	Ожирение	Патология гемостаза	Патол. щитов. железы	Патология почек	Патология печени	Отеки
1 (За)		+	+	+				
2 (Уф)	+	+			+			+
3 (Ме)								
4 (За)								
5 (Од)								
6 (Аб)								
7 (Ко)	+	+						+
8 (Ре)								
9 (Ар)								
10 (Зи)					+			
11 (Ми)		+						
12 (Ру)	+							
13 (Фо)						+		
14 (Се)								
15 (Ол)		+		+				
16 (Бо)								
17 (Же)								
18 (Ге)								
19 (По)								
20 (Гр)								
21 (Ив)								
22 (Ша)								
23 (Ак)								
24 (Ма)				+				
25 (Ак)								
26 (Ми)								
27 (Чи)								
27 (Ма)								
27 (Чи)								
28 (Яр)								
29 (Сп)								
30 (Жд)								
31 (Мо)								
32 (Ту)								
33 (Сл)	+		+					
34 (Тар)		+	+					+
35 (Чер)		+	+					+
36 (Ха)								

Поскольку анализируемые сопутствующие заболевания сопряжены с изменениями в иммунной системе, представлялось важным выяснить, с чем связано возрастание экспрессии чек-поинт молекул - гестацией или же коморбидным статусом. Для этого было проведено сравнительное исследование содержания CD4 и CD8 Т-клеток, экспрессирующих ингибиторные рецепторы, в группах с наличием и отсутствием сопутствующей патологии.

Предварительный анализ (табл.10), показал, что беременные в группах с наличием и отсутствием экстрагенитальной патологии не различались по срокам гестации, gravidности и паритету родов. Возраст беременных в группе с сопутствующей патологией был несколько выше, чем в группе сравнения, однако различия проявлялись в виде тренда. Сравнение показателей лейкоцитоза, нейтрофильно - лимфоцитарного индекса и СРБ, как индикаторов воспалительного процесса, также не выявило достоверных различий между группами.

Таблица 10 - Характеристика беременных с наличием и отсутствием экстрагенитальной патологии

Параметры	Отсутствие экстрагенитальной патологии	Наличие экстрагенитальной патологии	P
Количество (n)	24	12	
Возраст (лет), Me (IQR), ≥40 лет n,(%)	26 (20-32) 2	29 (26-33) 0	0,1
Срок беременности (недель) Me (IQR);	34 (32-37)	35 (32-37)	0,96
Беременность по счету n,(%) 1 >1	14 (58,3%) 10 (41,7%)	6 (50%) 6 (50%)	0,76*
Паритет родов n,(%) 1 >1	18 (75%) 6 (25%)	8 (66,7%) 4 (33,3%)	0,85*
Абсолютное количество лейкоцитов $\times 10^9/L$	10 (5,5-12)	8,9 (8,4-9,8)	0,73
СРБ мг/л	4,5 (2,9-4,9)	2,7 (1,9-5,7)	0,81
Нейтрофильно-лимфоцитарный индекс	3,0 (2,4-3,1)	3,1 (2,3-4,4)	0,85

Примечание: p - достоверность различий (критерий Манна-Уитни), * - точный критерий Фишера.

Анализ экспрессии ингибиторных молекул на Т-клетках в сравниваемых группах показал (табл.11), что выявленные в общей группе беременных особенности сохранялись в группе беременных с отсутствием экстрагенитальной патологии. Так, в этой группе отмечалось более чем 4-кратное возрастание в циркуляции относительного количества CD4+Tim3+ клеток и двукратное увеличение доли CD8+PD-1+ клеток в сравнении с небеременными. Кроме того, регистрировалось достоверное увеличение относительного количества CD4+ и CD8+ Т-клеток, ко-экспрессирующих молекулы PD-1 и Tim-3 (в 6 и 2,6 раза, соответственно).

Таблица 11 - Т-клетки, экспрессирующие ингибиторные рецепторы, у беременных с неосложненной гестацией в группах с наличием и отсутствием экстрагенитальной патологии

Субпопуляция (%)	Фертильные небеременные женщины (n=28) (1)	Отсутствие экстрагенитальной патологии (n=24) (2)	Наличие экстрагенитальной патологии (n=12) (3)	p
CD4+PD-1+	4,1 (3,0-5,9)	4,8 (3,0-7,4) n=24	6,6 (2,5-9,6) n=12	P ₁₋₂ = 0,5 P ₁₋₃ = 0,14 P ₂₋₃ = 0,4
CD4+CTLA-4+	2,6 (1,3-4,0)	3,8 (2,0-4,0) n=10	2,4 (2,1-2,8) n=8	P ₁₋₂ = 0,51 P ₁₋₃ = 0,87 P ₂₋₃ = 0,37
CD4+Tim-3+	1,4 (1,0-2,9)	6,5 (1,6-8,6) n=14	9,7 (6,9-13) n=5	P ₁₋₂ = 0,001 P ₁₋₃ = 0,0013 P ₂₋₃ = 0,14
CD8+PD-1+	2,9 (1,1-5,9)	5,8 (4,7-8,3) n=24	10 (6,9-15) n=12	P ₁₋₂ = 0,0014 P ₁₋₃ = 0,0001 P ₂₋₃ = 0,03
CD8+CTLA4+	2,0 (0,93-3,4)	1,2 (0,52-4,0) n=10	3,4 (1,3-5,5) n=8	P ₁₋₂ = 0,69 P ₁₋₃ = 0,26 P ₂₋₃ = 0,21
CD8+Tim-3+	5,3 (2,5-9,2)	5,8 (2,3- 19) n=14	1,1 (0,62-1,9) n=5	P ₁₋₂ = 0,82 P ₁₋₃ = 0,013 P ₂₋₃ = 0,026
CD4+PD-1+Tim1+	0,35 (0,19-0,5)	2,1 (1,6-2,8) n=10	0,27 (0,18-1,5) n=4	P ₁₋₂ = 0,00003 P ₁₋₃ = 0,92 P ₂₋₃ = 0,06
CD8+PD-1+Tim3+	1,5 (0,66-2,3)	3,9 (2,2-4,5) n=10	0,77 (0,57-3,5) n=4	P ₁₋₂ = 0,0028 P ₁₋₃ = 0,67 P ₂₋₃ = 0,11

Примечание: данные представлены в виде медиан и интерквартильных диапазонов. P_и – достоверность различий между группами, U- критерий Манна-Уитни

В группе с экстрагенитальными заболеваниями ряд характерных для беременности особенностей также сохранялся. Женщины этой группы (аналогично беременным без сопутствующей патологии) характеризовались повышенным содержанием в циркуляции CD4+Tim-3+ и CD8+PD-1+ клеток. При этом отмечался ряд особенностей. Например, доля CD8+PD-1+ клеток в группе с экстрагенитальной патологией была достоверно выше, чем у беременных без сопутствующей патологии. В то же время относительное содержание CD8+Tim-3+ клеток было ниже, чем у беременных без сопутствующих заболеваний и небеременных.

С другой стороны, у беременных с экстрагенитальной патологией не наблюдалось повышения CD4+ и CD8+ Т-клеток, ко-экспрессирующих молекулы PD-1 и Tim-3. Относительное содержание этих субпопуляций оставалось таким же, как и у фертильных небеременных контрольной группы. Учитывая, что количество экстрагенитальных патологий у различных женщин варьировало от 0 до 4, далее была исследована возможная зависимость между содержанием экспрессирующих чек-поинт молекулы Т-клеток и индексом коморбидности, отражающим количество сопутствующих патологий, приходящихся на одну беременную.

Как видно из данных таблицы 12, относительное содержание PD1-экспрессирующих CD8+ клеток находилось в прямой корреляционной связи с индексом коморбидности, тогда как доля Tim-3 - экспрессирующих CD8+ клеток обратно коррелировала с количеством экстрагенитальных заболеваний. Относительно содержание Т-клеток, ко-экспрессирующих молекулы PD-1 и Tim-3, также находилось в обратной корреляции с количеством экстрагенитальных заболеваний.

Таблица 12 - Сопряженность экспрессии Т-клетками чек-поинт молекул с количеством экстрагенитальных заболеваний

Экспрессия чек-поинт молекул (% клеток)	Индекс коморбидности		
	R	n	p
CD4+ PD-1+	R= 0,25	36	0,14
CD4+CTLA-4+	R= -0,19	18	0,44
CD4+Tim-3	R=0,34	19	0,15
CD8+ PD-1+	R= 0,37	36	0,02
CD8+CTLA-4+	R= 0,2	18	0,42
CD8+Tim-3+	R= - 0,58	19	0,009
CD4+ PD-1+Tim3+	R= - 0,57	14	0,03
CD8+ PD-1+ Tim3	R= - 0,51	14	0,059

Примечание: R– коэффициент корреляции (s – критерий Спирмена), в скобках – достоверность корреляционной связи.

Это проявлялось наличием достоверной корреляции в отношении CD4+PD-1+Tim-3+ клеток и выраженным трендом в отношении CD8+PD-1+Tim-3+ клеток.

Важно отметить, что включенные в исследование беременные различались по количеству беременностей в анамнезе и паритету родов. Так, в 20 случаях беременность была первой, в 7-и второй и в 9-и – третьей или четвертой. Из 36 беременных у 26 женщин предстоящие роды были первыми, и у 10 женщин – повторными. Поэтому представлялось важным выяснить, связано ли возрастание экспрессии чек-поинт молекул с сенсibilизацией фетальными антигенами во время предшествующей беременности. Для этого был проведен сравнительный анализ экспрессии чек-поинт молекул на Т-клетках периферической крови в группах беременных с первой и повторной беременностью (табл.13).

Как видно, женщины с первой беременностью характеризовались повышенным относительным содержанием CD4+Tim-3+, CD8+PD-1 и Т-клеток, ко-экспрессирующих PD-1 и Tim-3, что является характерным для общей группы беременных.

Вместе с тем, в качестве особенности этой группы отмечалась тенденция к повышению доли CD4+PD-1+ и CD8+CTLA-4+ Т-клеток, наиболее выраженная в отношении CD8+CTLA-4+ лимфоцитов ($p=0,067$). В группе повторно

беременных также отмечалось повышенное содержание CD4+Tim-3+ и CD8+PD-1+ клеток. В то же время возрастание Т-клеток, ко-экспрессирующих PD-1 и Tim-3, было менее выраженным и не достигало статистической достоверности. Кроме того, при повторной беременности содержание CD8+CTLA-4+ было достоверно ниже, чем при первой беременности.

Таблица 13 - Содержание Т-клеток, экспрессирующих ингибиторные рецепторы, в группах с первой и повторной беременностью

Маркер (% клеток)	Небеременные (1) n=28	Первая беременность (2), n=20	Повторная- беременность (3), n=16	Pu (1-2)	Pu (1-3)	Pu (2-3)
CD4+PD-1+	4,1 (3,0-5,9) n=28	5,6 (3,0-8,6) n=20	4,4 (2,3-6,7) n=16	0,11	0,8	0,34
CD4+CTLA-4+	2,6 (1,3-4,0) n=20	3,0 (2,2-3,9) n=7	2,6 (1,7-3,9) n=11	0,59	0,93	0,38
CD4+Tim-3+	1,4 (1,0-3,0) n=26	6,9 (4,4-9,9) n=11	10,4 (3,6-14) n=8	0,000 8	0,002 6	0,16
CD8+PD-1+	2,9 (1,1-5,9) n=28	7,3 (5,1- 14) n=20	6,5 (4,7-10) n=16	0,000 2	0,002 1	0,37
CD8+CTLA-4+	2,0 (0,93-3,4) n=20	5,7 (0,82-7,1) n=7	1,8 (0,52-3,8) n=11	0,067	0,41	0,02
CD8+Tim-3+	5,2 (2,5-9,2) n=26	5,5 (1,3-8,2) n=11	2,1 (1,5-13) n=8	0,74	0,25	0,74
CD4+ PD-1+Tim-1+	0,35 (0,19-,5) n=16	1,9 (1,2-2,5) n=9	1,6 (0,2-2,8) n=5	0,000 3	0,19	0,64
CD8+ PD-1+Tim-3+	1,5 (0,66-2,3) n=16	3,9 (2,0-6,0) n=9	3,4 (0,62-4,1) n=5	0,016	0,4	0,38

Примечание: данные представлены в виде медиан и интерквартильных диапазонов;
Pu - достоверность различий между группами; U- критерий Манна-Уитни)

Учитывая, что количество предшествующих беременностей у женщин исследуемой группы варьировало от 0 до 5, а паритет родов от 1 до 4, был также проведен анализ корреляционных связей между экспрессией Т-клетками чек-поинт молекул и гравидностью/паритетом родов (табл. 14).

Таблица 14 - Корреляционные зависимости экспрессии чек-поинт молекул с количеством беременностей и паритетом родов

Маркер (%)	Количество беременностей	Паритет родов
CD4+PD-1+, n=36	- 0,22 (0,19)	- 0,37 (0,028)
CD4+CTLA-4+, n=18	- 0,30 (0,23)	- 0,54 (0,02)
CD4+Tim-3+, n=19	0,25 (0,31)	0,11 (0,66)
CD8+PD-1+, n=36	- 0,18 (0,29)	0,12 (0,5)
CD8+CTLA-4+, n=18	- 0,01 (0,95)	- 0,59 (0,009)
CD8+Tim-3+, n=19	- 0,59 (0,009)	- 0,39 (0,1)
CD4+ PD-1+Tim3+, n=14	- 0,2 (0,48)	- 0,45 (0,06)
CD8+ PD-1+Tim-3+, n=14	- 0,3 (0,29)	- 0,45 (0,1)

Примечание: данные представлены в виде коэффициентов корреляции (Rs; s – критерий Спирмена) и достоверностей корреляционных связей (в скобках).

Видно, что большинство исследуемых субпопуляций Т-клеток, экспрессирующих чек-поинт молекулы, находились в обратной корреляции с количеством беременностей или родов. Наиболее ярко это проявлялось в отношении паритета родов. Достоверная обратная зависимость с количеством родов выявлялась для CD4+PD-1+, CD4+CTLA-4+ и CD8+CTLA4+ клеток, тогда как статистически значимая отрицательная корреляция с числом беременностей регистрировалась только в отношении CD8+Tim-3+ клеток.

Проведенные выше исследования показали, что экспрессия чек-поинт молекул ассоциируется с такими факторами как возраст, сроки гестации и наличие экстрагенитальной патологии. В этой связи следует отметить, что хотя женщины с первой и повторной беременностью достоверно не различались по

частоте сопутствующих экстрагенитальных заболеваний (30% и 37,5 %, $p=0,14$) и срокам беременности (35 и 32 нед, $p=0,15$), пациентки в группе с повторной беременностью характеризовались тенденцией к большей частоте выявления экстрагенитальной патологии и меньшему сроку гестации. Кроме того, женщины с повторной беременностью были достоверно старше (Me 30; IQR 27-35 лет), чем с первой беременностью (Me 25; IQR 20-29 лет; $p=0.004$). Соответственно, эти факторы могли отчасти обуславливать особенности экспрессии PD-1 и Tim-3 CD8+Т-клетками при первой и повторной беременности, а также обратную сопряженность между количеством беременностей и долей CD8+Tim-3+ клеток. Тем не менее, количество беременностей/родов было также сопряжено с содержанием CTLA-4 – экспрессирующих Т-клеток (меньшее содержание CD8+CTLA-4+ клеток при повторной беременности, обратная корреляция с содержанием CTLA-4-экспрессирующих Т-клеток) и долей CD4+PD-1 клеток (обратная зависимость с паритетом родов), - т.е. субпопуляциями, содержание которых не коррелирует с возрастом, сроком гестации и коморбидностью. Эти данные свидетельствуют о том, что перестройка иммунной системы матери во время предшествующей беременности является еще одним фактором, влияющим на особенности экспрессии чек-поинт молекул Т-клетками, и данный фактор ассоциирован с содержанием PD-1-экспрессирующих CD4+ лимфоцитов и CTLA-4+ экспрессирующих Т-клеток. Действительно, при сравнении первородящих и повторнородящих беременных относительное содержание CD4+ PD-1 клеток у первородящих (Me 6,0; IQR 3,3-8,8%; $n=26$) достоверно превышало таковое у повторнородящих (Me 3,7; IQR 2,23-5,0%; $n=10$; $p=0,034$). Аналогичным образом, и доля CD4+CTLA-4+клеток в группе первородящих (Me 3,3; IQR 2,2-3,9%; $n=10$) была достоверно выше, чем в группе повторнородящих беременных (Me 2,0; IQR 1,4-2,6%; $n=8$; $p=0,02$).

Полученные в целом данные свидетельствуют об усилении экспрессии ингибиторных рецепторов на циркулирующих Т-клетках беременных, что подтверждается достоверным увеличением в периферической крови относительного содержания CD4+Т-лимфоцитов, экспрессирующих Tim-3;

CD8+Т-лимфоцитов, экспрессирующих PD-1, а также CD4+ и CD8+ Т-клеток с одновременной экспрессией PD-1 и Tim-3. При этом прямая корреляция между сроком беременности и содержанием CD8+Tim-3+, CD4+PD-1+Tim-3+ и CD8+PD-1+Tim-3+ субпопуляций и выраженный тренд к обратной корреляции между возрастом беременных и долей CD8+Tim-3+ клеток означают, что более высокое содержание Tim-3+ Т-клеток регистрируется у более молодых беременных и содержание этих клеток нарастает по мере увеличения гестационного срока (от 26 до 40 мес).

Возрастание Т-клеток, экспрессирующих чек-поинт молекулы, регистрируется как у беременных с отсутствием, так и наличием экстрагенитальной патологии, являясь таким образом следствием гестации, а не коморбидности. Тем не менее, наличие сопутствующей патологии сопряжено с рядом особенностей в экспрессии чек-поинт молекул - более выраженным увеличением CD8+PD-1+ клеток (в сравнении с оппозитной группой беременных), а с другой стороны – снижением доли CD8+Tim-3+ и отсутствием возрастания Т-клеток, ко-экспрессирующих молекулы PD-1 и Tim-3 (в сравнении с небеременными). Выявленные корреляции между количеством сопутствующих патологий и экспрессией PD-1 и Tim-3 (прямой корреляции с долей CD8+PD-1+ и обратной - с долей CD8+Tim-3+ и CD4+ PD-1+Tim-3+ клеток) является дополнительным подтверждением сопряженности между коморбидностью и экспрессией чек-поинт молекул.

Достоверное возрастание относительного содержания Т-клеток, экспрессирующих и ко-экспрессирующих чек-поинт молекулы (CD4+Tim-3+, CD4+PD1+, CD4+PD-1+Tim-3+ и CD8+PD-1+Tim-3+) в третьем триместре гестации регистрируется уже при первой беременности. Причем при повторной беременности возрастание доли Т-клеток, ко-экспрессирующих PD-1 и Tim-3 выражено в меньшей степени и не достигает статистической значимости. Еще одной особенностью повторной беременности является достоверно меньшее содержание CD8+CTLA-4+ клеток. Характерно, что между количеством беременностей и содержанием CD8+Tim3+ клеток, а также между паритетом

родов и долей CD4+PD1+ и CTLA-4+ экспрессирующих Т-клеток регистрируются обратные корреляционные зависимости. Это означает, что наличие в анамнезе беременности или родов является еще одним фактором, сопряженным с особенностями экспрессии чек-поинт молекул. Причем если такие факторы, как срок гестации и наличие коморбидности ассоциированы в большей степени с экспрессией молекулы Tim-3, причем в субпопуляции CD8 Т-клеток, то паритет родов – с экспрессией PD-1 в субпопуляции CD4+ Т-клеток) и CTLA-4 в субпопуляциях CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов.

3.5 Экспрессия ингибиторных рецепторов Т-клетками периферической крови у беременных с преэклампсией

Представленные в главе 3.4 данные показали, что PlGF обладает иммуносупрессивным действием на активированные Т-клетки, что может быть связано в том числе с усилением экспрессии ингибиторных чекпоинт молекул. Согласно данным литературы также известно, что возрастание индекса соотношения растворимого рецептора к PlGF (sFlt1) и самого PlGF, в том числе за счет снижения PlGF является предиктором ПЭ [50,]. На этом основании было сделано предположение, что снижение уровня PlGF у беременных с ПЭ может проявляться изменением экспрессии чек-поинт молекул. Чтобы проверить эту гипотезу, исследовали содержание CD4+ и CD8+ Т-клеток, экспрессирующих чек-поинт молекулы в периферической крови беременных с преэклампсией (ПЭ).

Группу пациенток с ПЭ составили 29 беременных (табл.16) во второй половине беременности в возрасте от 18 до 45 лет. Срок гестации варьировал от 26 до 38 недель с медианой 33 недели. Как видно, беременность была первой у 11 (38%)- и повторной - у 18 (62%) женщин. Первые роды имели место у 18 (62%) беременных, повторные – у 11 (38%) женщин. При сравнении беременных с ПЭ и женщин с неосложненной беременностью достоверных различий по срокам гестации, частоте выявления сопутствующей экстрагенитальной патологии, гравидарности и паритету родов не выявлялось. Сравнимые группы также не

различались по показателям системного воспаления (СРБ, количеству лейкоцитов и нейтрофильно-лимфоцитарному индексу). Тем не менее, беременные с ПЭ были достоверно старше, хотя большинство из них (25 из 29) так же, как и в группе с неосложненной беременностью не выходили за возрастной порог ≥ 40 лет. В качестве отправной точки у значительной части беременных была исследована концентрация PlGF. Как видно из данных таблицы 15, уровень PlGF в группе с ПЭ был в два раза ниже, чем при неосложненной гестации.

Таблица 15 - Сравнительная характеристика беременных с ПЭ и неосложненной беременностью

Параметры	Группы беременных		p
	ПЭ	Неосложненная беременность	
Количество	29	36	
Возраст (лет), Me (IQR), мин-макс < 40 лет (n)	33 (30-37) (18-45) 25	27 (25-32) (18-45) 34	$P_U = 0,00005$
Срок беременности Me (IQR); мин-макс (недель)	33 (30-36) 26-38	34 (31-37) 26-40	$P_U = 0,62$
Беременность по счету - первая (n/%) - повторная (n/%) - гравидарность M \pm m Me (IQR)	11 (38%) 18 (62%) 2, 24 \pm 0,27 2 (1-3)	20 (55,6%) 16 (44,4%) 1,8 \pm 0,18 1 (1-2,5)	$P_{TMФ} = 0,24$ $P_U = 0,19$
Роды Первые (n/%) Повторные (n/%) Паритет родов M \pm m Me (IQR)	18 (62%) 11 (38%) 1,6 \pm 0,18 1 (1-2,0)	26 (72,2%) 10 (27,8%) 1,36 \pm 0,12 1 (1-1,5)	$P_{TMФ} = 0,54$ $P_U = 0,28$
Наличие экстрагенитальной патологии (n/%)	14 (48,3%)	12 (33,3%)	$P_{TMФ} = 0,33$
Лейкоциты $\times 10^9/л$	9,6 (8,5-9,8)	9,8 (7,9- 11)	$P_U = 0,62$
Нейтрофильно/лимфоцитарный индекс	3,2 (2,4 – 4,7)	3.1 (2.3-3.2)	$P_U = 0,33$
СРБ мг/л	4,6 (3,3 -8,1)	4,5 (2.3-3.5)	$P_U = 0,13$
PlGF пг/мл	253 (158-416) n=24	479 (304-695) n=19	$P_U = 0,014$

Примечание; p – достоверность различий, U - критерий Манна-Уитни; TMФ -точнточный критерий Фишера.

Оценка экспрессии PD-1 в популяциях CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в группе с ПЭ была проведена у всех 29 беременных, содержание Tim-3-экспрессирующих Т-клеток исследовано у 20 пациенток, CTLA-4- позитивных Т-клеток - у 17- и Т-клеток, коэкспрессирующих PD-1 и Tim-3, – у 12 пациенток. Сравнительный анализ экспрессии чек-поинт молекул в исследуемых группах (табл. 16) показал, что, аналогично неосложненной гестации содержание CD4⁺Tim-3⁺ клеток у беременных с ПЭ было повышено по сравнению с небеременными. Тем не менее, доля CD4⁺Tim-3⁺ клеток была достоверно ниже, чем при неосложненной беременности. С другой стороны в отличие от неосложненной беременности у беременных с ПЭ отмечалось возрастание CD4⁺CTLA4⁺ клеток, содержание которых значимо превышало таковое как в сравнении с небеременными, так и пациентками с неосложненной беременностью. Особенностью экспрессии чекпоинт молекул в субпопуляции CD8⁺ клеток при осложненной ПЭ гестации явилось отсутствие значимого возрастания CD8⁺PD1⁺ клеток. Доля CD8⁺PD1⁺ Т-лимфоцитов оставалась на уровне небеременных и была статистически значимо ниже, чем в группе с неосложненной гестацией. Кроме того, в сравнении с неосложненной беременностью у беременных с ПЭ отмечалась тенденция к меньшему содержанию CD8⁺CTLA-4⁺ и CD8⁺Tim-3⁺ клеток. Причем в отношении CD8⁺Tim-3⁺ - отмечалось снижение их количества в сравнении с небеременными. Наконец, еще одним отличием беременных с ПЭ являлось отсутствие (характерного для неосложненной гестации) возрастания CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, ко-экспрессирующих PD-1 и Tim-3.

Таблица 16 - Содержание Т-клеток, экспрессирующих ингибиторные рецепторы, у беременных с неосложненной гестацией и преэклампсией

Маркер (%)	Фертильные небеременные женщины; n=28 (1)	Неосложнен- ная беремен- ность (2)	Преэклампс ия (3)	p
CD4+PD1+	4,1 (3,0-5,9)	5,0 (2,8-8,4) n=36	4,4 (3,6-6,3) n=29	P ₁₋₃ = 0,63 P ₂₋₃ = 0,47
CD4+CTLA4+	2,6 (1,3-4,0)	2,6 (2, 1-3,9) n=18	5,0 (2,8-5,3) n=17	P ₁₋₃ = 0,03 P ₂₋₃ = 0,01
CD4+Tim3+	1,4 (1,0-2,9)	7,0 (4,0-10)* n=16	4,5 (1,4-6,5) n=20	P ₁₋₃ = 0,027 P ₂₋₃ = 0,026
CD8+PD1+	2,9 (1,1-5,9)	6,9 (4,8- 12)* n=36	4,3 (2,0-7,4) n=29	P ₁₋₃ = 0,31 P ₂₋₃ = 0,0006
CD8+CTLA4+	2,0 (0,93-3,4)	2,4 (0,58-4,1) n=19	0,77 (0,26-1,9) n=17	P ₁₋₃ = 0,08 P ₂₋₃ = 0,07
CD8+Tim3+	5,2 (2,5-9,2)	5,3 (1,5-8,2) n=19	2,7 (1,6-8,3) n=20	P ₁₋₃ = 0,13 P ₂₋₃ = 0,64
CD4+PD1+Tim3+	0,35 (0,19-0,5)	1,8 (1,1-2,6)* n=14	0,98 (0,19-2,0) n=12	P ₁₋₃ = 0,19 P ₂₋₃ = 0,13
CD8+PD1+Tim3+	1,5 (0,66-2,3)	3,5 (1,5-4,5)* n=14	1,86 (0,58-4,4) n=12	P ₁₋₃ = 0,46 P ₂₋₃ = 0,29

Примечание: данные представлены в виде медиан и интерквартильных диапазонов (в скобках) относительного содержания клеток, несущих чекпоинт молекулы, среди CD4+ и CD8+ лимфоцитов; * - достоверность различий между неосложненной гестацией и небеременными; P_u –достоверность различий, U- критерий Манна-Уитни.

Поскольку беременные с ПЭ в исследуемой группе различались по тяжести, следующий этап был посвящен исследованию возможной сопряженности между экспрессией чекпоинт молекул и тяжестью ПЭ. В исследуемой выборке умеренная ПЭ диагностировалась у 14- и тяжелая – у 15 беременных. Сравнение беременных в группах с умеренной и тяжелой ПЭ (табл. 17) показало, что беременные сравниваемых групп достоверно не различались по возрасту, сроку гестации, частоте сопутствующей экстрагенитальной патологии, количеству беременностей и паритету родов, а также соотношению ранней и поздней ПЭ.

Таблица 17- Характеристика беременных в группах с умеренной и тяжелой преэклампсией

Показатель	Умеренная ПЭ	Тяжелая ПЭ	P
Количество пациенток	14	15	
Возраст, лет; Me (IQR)	31(30-38)	36 (32-38)	$P_U=0,15$
Гестационный срок (недель)	33 (32-37)	30 (30-36)	$P_U=0,37$
Наличие сопутствующих заболеваний; n/%	8 (42,9%)	8 (53,3%)	$P_{TMФ}=0,85$
Гравидарность Me (IQR)	2,0 (2,0-3,0)	1.50 (1,0-2,0)	$P_U=0,15$
Паритет родов Me (IQR)	1,5 (1,0-2,0)	1,0 (1,0-2,0)	$P_U=0,4$
ПЭ - ранняя, n/% - поздняя, n/%	8 (57,1%) 6 (42,9%)	9 (60%) 6 (40%)	$P_{TMФ}=0,83$

Примечание; p – достоверность различий, U - критерий Манна-Уитни; TMФ -точный критерий Фишера.

Сравнительный анализ экспрессии ингибиторных молекул на Т-клетках беременных с умеренной и тяжелой формами ПЭ (табл. 18) показал, что характерное для ПЭ снижение CD4+Tim-3+ и CD8+PD-1+ клеток, а также возрастание CD4+CTLA-4+ Т-клеток (в сравнении с неосложненной гестацией) регистрировалось в обеих группах, но с разной выраженностью.

Так, уменьшение доли CD4+Tim-3+ и CD8+PD-1+ клеток было более выраженным и достоверным в группе с умеренной ПЭ, а у беременных с тяжелой ПЭ проявлялось в виде выраженной тенденции. Напротив, возрастание CD4+CTLA-4+ Т-клеток было более выраженным и достоверным при тяжелой ПЭ, а при умеренной ПЭ носило характер тренда. Ко-экспрессии чекпоинт молекул у беременных с ПЭ была исследована у 12 пациентов, из которых тяжелая ПЭ регистрировалась у 9 беременных, а умеренная ПЭ – только у 3 пациенток. Уменьшение PD-1+Tim-3+ клеток было характерно для умеренной ПЭ и, несмотря на малочисленность группы, достигало статистической достоверности в отношении популяции CD4+ клеток.

Таблица 18 - Относительное содержание CD4 и CD8 Т-клеток, экспрессирующих ингибиторные рецепторы у беременных с умеренной и тяжелой ПЭ

Маркер (% клеток)	Неберемен- ные; n=28 (0)	Неослож- ненная гестация n=36 (1)	Умеренная ПЭ n=14 (2)	Тяжелая ПЭ n=15 (3)	p
CD4+PD-1+	4,1 (3,0-5,9)	5,0 (2,8-8,4) n=36	4,4 (3,3-4,8) n=14	5,5 (3,6-6,7) n=15	P ₁₋₂ = 0,33 P ₁₋₃ = 0,82 P ₂₋₃ = 0,48
CD4+CTLA-4+	2,6 (1,3-4,0)	2,6 (2,1-3,9) n=18	3,6 (2,4-5,3) n=11	5,3 (3,4-5,9) n=6	P ₁₋₂ = 0,06 P ₁₋₃ = 0,027 P ₂₋₃ = 0,37
CD4+Tim-3+	1,4 (1,0-2,9)	7,0 (4,0-10) n=16	4,2 (1,3-5,7) n=10	4,7 (1,5-7,9) n=10	P ₁₋₂ = 0,04 P ₁₋₃ = 0,12 P ₂₋₃ = 0,49
CD8+PD-1+	2,9 (1,1-5,9)	6,9 (4,8- 12) n=36	3,9 (2,3-5,6) n=14	4,4 (2,0-9,4) n=13	P ₁₋₂ = 0,0005 P ₁₋₃ = 0,06 P ₂₋₃ = 0,38
CD8+CTLA-4+	2,0 (0,93-3,4)	2,4 (0,58-4,1) n=19	0,78 (0,25-3,2) n=11	1,1 (0,26-1,9) n=6	P ₁₋₂ = 0,15 P ₁₋₃ = 0,13 P ₂₋₃ = 0,96
CD8+Tim-3+	5,2 (2,5-9,2)	5,3 (1,5-8,2) n=19	2,5 (1,1-5,8) n=10	4,6 (2,2-9,8) n=10	P ₁₋₂ = 0,46 P ₁₋₃ = 0,96 P ₂₋₃ = 0,44
CD4+ PD-1+Tim-3+	0,35 (0,19- 0,5)	1,8 (1,1-2,6) n=14	0,03 (0-1,3) n=3	1,6 (0,3-2,3) n=9	P ₁₋₂ = 0,04 P ₁₋₃ = 0,38 P ₂₋₃ = 0,08 P ₀₋₂ = 0,37 P ₀₋₃ = 0,04
CD8+ PD-1+Tim-3+	1,5 (0,66-2,3)	3,5 (1,5-4,5) n=14	0,5 0,35-4,3) n=3	2,5 (0,86-4,4) n=9	P ₁₋₂ = 0,21 P ₁₋₃ = 0,49 P ₂₋₃ = 0,31 P ₀₋₂ = 0,61 P ₀₋₃ = 0,24

Примечание: данные представлены в виде медиан и интерквартильных диапазонов (в скобках) относительного содержания клеток, несущих чек-поинт молекулы, среди CD4 и CD8+ лимфоцитов; p – достоверность различий, U - критерий Манна-Уитни

Так, уменьшение доли CD4+Tim-3+ и CD8+PD-1+ клеток было более выраженным и достоверным в группе с умеренной ПЭ, а у беременных с тяжелой ПЭ проявлялось в виде выраженной тенденции. Напротив, возрастание CD4+CTLA-4+ Т-клеток было более выраженным и достоверным при тяжелой ПЭ, а при умеренной ПЭ носило характер тренда. Ко-экспрессии чекпоинт

молекул у беременных с ПЭ была исследована у 12 пациентов, из которых тяжелая ПЭ регистрировалась у 9 беременных, а умеренная ПЭ – только у 3 пациенток. Уменьшение PD-1+Tim-3+ клеток было характерно для умеренной ПЭ и, несмотря на малочисленность группы, достигало статистической достоверности в отношении популяции CD4+ клеток.

Данные, суммирующие особенности изменений в экспрессии ингибиторных рецепторов Т-клетками беременных с умеренной и тяжелой ПЭ, представлены в таблице 19. Видно, что общими признаками в группе с умеренной и тяжелой ПЭ являются а) снижение CD4+Tim-3+ клеток (более выраженное и достоверное при умеренной ПЭ); б) возрастание CD4+CTLA-4+ клеток, которое более выражено и достигает статистической значимости при тяжелой ПЭ и в) снижение CD8+PD-1+ Т-клеток, более выраженное и достигающее статистической значимости при умеренной ПЭ.

Таблица 19 - Особенности экспрессии ингибиторных молекул в подгруппах беременных с ранней и поздней ПЭ.

	ПЭ (общая группа) <i>Изменения по сравнению с неосложненной беременностью и (небеременными)</i>	Умеренная ПЭ	Тяжелая ПЭ
CD4+			
CD4+PD1+	Не изменено	Не изменено	Не изменено
CD4+CTLA-4+	Повышено	Повышено	Повышено
CD4+Tim3+	Снижено	Снижено	Снижено
CD8+			
CD8+PD1+	Снижено	Снижено	Снижено
CD8+CTLA-4+	Снижено	Снижено	Снижено
CD8+Tim3+	Снижено	Снижено	Не изменено
CD4+PD1+Tim3+	Снижено (+ нет возрастания по сравнению с небеременными)	Снижено (мало данных)	Не изменено
CD8+PD1+Tim3+	Снижено (+ нет возрастания по сравнению с небеременными)	Снижено	Не изменено

Примечание: жирным шрифтом выделены достоверные изменения

Выраженное в одинаковой степени в сравниваемых группах снижение доли CD8+CTLA-4+ Т-клеток проявляется в виде тренда. Тенденция к снижению CD8+Tim-3+Т-клеток регистрируется только в группе с умеренной ПЭ. Уменьшение доли Т-клеток, ко-экспрессирующих PD-1 и Tim-3, более выражено при умеренной ПЭ и в отношении CD4+ клеток достигает статистической значимости. Таким образом, снижение экспрессии чек-поинт молекул в большей степени выражено при умеренной ПЭ. Это касается экспрессии Tim-3 на CD4+ Т-клетках, экспрессии PD-1 на CD8+ Т-клетках и коэкспрессии PD-1 и Tim-3 на CD4+ Т-клетках. Соответственно, отличительным признаком умеренной ПЭ является более выраженное снижение CD4+Tim-3+, CD8+PD-1+ и CD4+PD-1+Tim-3+ клеток. В свою очередь, отличительным признаком тяжелой ПЭ является более выраженное возрастание CD4+ клеток, экспрессирующих CTLA-4.

Следует отметить, что беременные с осложненной гестацией различались по срокам развития ПЭ. В настоящее время выделяют две формы ПЭ - раннюю и позднюю ПЭ, которые как предполагается, представляют две патогенетически различные формы [132]. Чтобы оценить возможные различия в экспрессии ингибиторных молекул между указанными формами, был проведен анализ относительного содержания CD4+ и CD8+ Т-клеток, экспрессирующих PD-1, CTLA-4 и Tim-3 в подгруппах беременных с ранним (< 34 недель гестации) и поздним (\geq 34 недель гестации) дебютом ПЭ.

Сравнение беременных в группах с ранней и поздней ПЭ (табл. 20) показало, что ранняя манифестация ПЭ регистрировалась у 17, а поздняя – у 12 беременных. Медианный срок гестации в этих группах составлял, соответственно 30 и 37 недель. Беременные указанных групп не различались по возрасту, частоте сопутствующей экстрагенитальной патологии, количеству беременностей и паритету родов. Учитывая полученные выше данные о сопряженности экспрессии чек-поинт молекул с тяжестью ПЭ, также была оценена частота беременных с умеренной и тяжелой ПЭ. Как видно из данных таблицы, соотношение умеренной и тяжелой ПЭ в сравниваемых группах не различалось.

Таблица 20 - Характеристика беременных в группах с ранней и поздней ПЭ

Показатель	Ранняя ПЭ	Поздняя ПЭ	P
Количество пациенток	17	12	
Возраст, лет; Me (IQR)	34 (30-38)	33(30-37)	$P_U = 0,62$
Гестационный срок (недель)	30 (30-32)	37 (35-38)	$P_U = 0,00004$
Наличие сопутствующих заболеваний; n/%	8 (47%)	6 (50%)	$P_{TMФ} = 0,83$
Гравидарность Me (IQR)	2,0 (1,0-3,0)	1.5 (1,0-2,5)	$P_U = 0,2$
Паритет родов Me (IQR)	1,0 (1,0-2,0)	1,0(1,0-1,5)	$P_U = 0,28$
Тяжесть ПЭ; n/%			
- умеренная	9 (52%)	6 (50%)	$P_{TMФ} = 0,83$
- тяжелая	8 (48%)	6 (50%)	

Примечание; p – достоверность различий, U - критерий Манна-Уитни; TMФ - точный критерий Фишера.

Сравнение беременных с ранней и поздней ПЭ в сопоставлении с неосложненной гестацией показало (Табл.21), что возрастание CD4+CTLA-4+ клеток при ПЭ выявлялось в обеих группах, однако было более выраженным и достоверным при ранней ПЭ, тогда как в группе с поздней ПЭ регистрировалось в виде выраженного тренда. В то же время более выраженное и достоверное снижение CD4+Tim-3+ клеток отмечалось только у беременных с поздней ПЭ. В силу этого содержание CD4+Tim-3+ клеток в группе с поздней ПЭ было достоверно ниже, чем в группе с ранней ПЭ. Кроме того, при поздней ПЭ отмечалось снижение CD4+PD-1 клеток, как в сравнении с неосложненной гестацией, так и поздней ПЭ.

Характерное для ПЭ снижение CD8+PD-1+ клеток наблюдалось в обеих группах, было более выраженным у беременных с поздней ПЭ, однако достоверных различий в содержании этих клеток при ранней и поздней ПЭ не отмечалось. Кроме того при ранней ПЭ отмечалось достоверное уменьшение CD4+CTLA-4+ клеток, а при поздней – выраженная тенденция к уменьшению доли CD4+Tim-3+ по сравнению с неосложненной беременностью.

Таблица 21 - Экспрессия ингибиторных рецепторов CD4+ и CD8+ лимфоцитами беременных с ранней и поздней ПЭ

Маркер (% клеток)	Неберемене- ные; n=28 (0)	Неослож- ненная гестация n=36 (1)	Ранняя ПЭ n=17 (2)	Поздняя ПЭ n=12 (3)	p
CD4+PD-1+	4,1 (3,0- 5,9)	5,0 (2,8-8,4) n=36	5,9 (4,1-7,3) n=17	3,9 (2,0-4,6) n=12	P ₁₋₂ = 0,6 P ₁₋₃ = 0,048 P ₂₋₃ = 0,01
CD4+CTLA-4+	2,6 (1,3- 4,0)	2,6 (2,1-3,9) n=18	5,5 (2,5-8,1) n=8	3,6 (2,9-5,3) n=9	P ₁₋₂ = 0,034 P ₁₋₃ = 0,057 P ₂₋₃ = 0,44
CD4+Tim-3+	1,4 (1,0- 2,9)	7,0 (4,0-10) n=16	5,3 (4,0-8,0) n=15	1,4 (1,3-1,5) n=5	P ₁₋₂ = 0,18 P ₁₋₃ = 0,005 P ₂₋₃ = 0,049
CD8+PD-1+	2,9 (1,1- 5,9)	6,9 (4,8- 12) n=36	4,4 (2,0-7,8) n=17	3,4 (2,0-5,6) n=10	P ₁₋₂ = 0,015 P ₁₋₃ = 0,002 P ₂₋₃ = 0,27
CD8+CTLA-4+	2,0 (0,9- 3,4)	2,4 (0,6-4,1) n=19	0,6 (0,2-1,2) n=8	1,5 (0,6-2,4) n=9	P ₁₋₂ = 0,05 P ₁₋₃ = 0,3 P ₂₋₃ = 0,19
CD8+Tim-3+	5,2 (2,5- 9,2)	5,3 (1,5-8,2) n=19	2,7 (2,2-10) n=15	0,9 (0,9-4,9) n=5	P ₁₋₂ = 0,82 P ₁₋₃ = 0,09 P ₂₋₃ = 0,12
CD4+ PD-1+Tim-3+	0,4 (0,2- 0,5)	1,8 (1,1-2,6) n=14	1,4 (0,2-2,3) n=9	0,6 (0,2-1,6) n=3	P ₁₋₂ = 0,1 P ₁₋₃ = 0,31 P ₂₋₃ = 0,78 P ₀₋₂ = 0,28 P ₀₋₃ = 0,31
CD8+ PD-1+Tim-3+	1,5 (0,7- 2,3)	3,5 (1,5-4,5) n=14	1,2 (0,5-4,3) n=9	2,5 (0,9-5,1) n=3	P ₁₋₂ = 0,23 P ₁₋₃ = 0,8 P ₂₋₃ = 0,51 P ₀₋₂ = 0,76 P ₀₋₃ = 0,64

Примечание: данные представлены в виде медиан и интерквартильных диапазонов (в скобках) относительного содержания клеток, несущих чек-поинт молекулы, среди CD4 и CD8+ лимфоцитов. P_{ij} – достоверность различий, U- критерий Манна-Уитни

При анализе коэкспрессии PD-1 и Tim-3 на Т-клетках, доля CD4+ и CD8+клеток, коэкспрессирующих эти молекулы у беременных с ранней и поздней ПЭ была ниже, чем при неосложненной беременности, однако различия не достигали статистической достоверности. Тем не менее, в отличие от неосложненной беременности, при которой содержание CD4+PD1+Tim3+ и

CD8+PD1+Tim3+ клеток превышало таковое у небеременных, статистически значимого возрастания указанных субпопуляций в группах с ранней и поздней ПЭ не регистрировалось.

Данные, суммирующие изменения в экспрессии ингибиторных рецепторов Т-клетками беременных с ранней и поздней ПЭ, представлены в таблице 22. Как видно, характерные для ПЭ в целом изменения в виде снижения доли Tim-3+ клеток и увеличения доли CTLA-4+ в субпопуляции CD4+ Т-клеток и уменьшения PD-1+ клеток в субпопуляции CD8+ лимфоцитов проявляются как при ранней, так и поздней ПЭ. При этом особенностью ранней ПЭ является снижение дополнительно доли CD8+CTLA-4+ клеток, а поздней ПЭ - уменьшение содержания CD8+Tim3. Еще одной особенностью поздней ПЭ является снижение CD4+PD-1+ клеток и более выраженное уменьшение Tim-3+ лимфоцитов в субпопуляциях CD4+ клеток. Таким образом, наряду с общими закономерностями, беременные с ранней и поздней ПЭ характеризовались рядом особенностей, причем снижение экспрессии чек-поинт молекул на Т-клетках было более выраженным при поздней ПЭ.

Таблица 22 - Экспрессия ингибиторных молекул Т-клетками в подгруппах беременных с ранней и поздней ПЭ.

	ПЭ общая группа (изменения по сравнению с неосложненной беременностью)	Ранняя ПЭ	Поздняя ПЭ
CD4+			
CD4+PD1+	Не изменено	Не изменено	Снижено
CD4+CTLA-4+	Повышено	Повышено	Повышено
CD4+Tim3+	Снижено	Снижено	Снижено
CD8+			
CD8+PD1+	Снижено	Снижено	Снижено
CD8+CTLA-4+	Снижено	Снижено	Не изменено
CD8+Tim3+	Снижено	Не изменено	Снижено
CD4+PD1+Tim3+	Снижено (+ нет возрастания по сравнению с небеременными)	Снижено	(малая выборка)
CD8+PD1+Tim3+	Снижено (+ нет возрастания по сравнению с небеременными)	Снижено	(малая выборка)

Примечание: жирным шрифтом выделены достоверные изменения

Полученные в целом результаты свидетельствуют, что развитие ПЭ сопряжено со снижением экспрессии ингибиторных молекул PD-1 и Tim-3 на Т-клетках, проявлением чего является достоверное уменьшение (по сравнению с неосложненной беременностью) доли Tim-3+ клеток в популяции CD4+ лимфоцитов и PD-1+ клеток в популяции CD8+ лимфоцитов; тенденция к снижению CD8+ клеток, экспрессирующих Tim-3 и CTLA-4, а также отсутствие характерного для неосложненной беременности достоверного возрастания PD-1+Tim-3+ Т-клеток. Наряду с этим развитие ПЭ сопряжено с более высоким содержанием CTLA-4 клеток в популяции CD4+ лимфоцитов.

Изменения в экспрессии ингибиторных молекул в группах беременных с умеренной и тяжелой ПЭ имеют свои особенности и выражены в большей степени при умеренной ПЭ. В частности, именно в группе с умеренной ПЭ снижение экспрессии Tim-3+ в популяции CD4+ Т-клеток, PD-1+ в популяции CD8+ Т-клеток, и коэкспрессии является более выраженным и статистически достоверным. В свою очередь, более выраженное и достоверное возрастание экспрессии CTLA-4 в популяции CD4+ Т-клеток характерно именно для тяжелой ПЭ, тогда как в группе с умеренной ПЭ возрастание этого показателя не достигает статистической значимости.

Изменения в экспрессии ингибиторных рецепторов имеют также свои особенности в зависимости от сроков манифестации ПЭ. Так, снижение CD4+Tim-3+, CD8+PD-1+ клеток наиболее выражено при поздней ПЭ. Особенностью поздней ПЭ является также достоверное уменьшение CD4+PD-1+ клеток и тенденция к снижению CD8+Tim-3+ клеток (в сравнении с неосложненной беременностью). В то же время возрастание CD4+CTLA-4+ клеток наиболее выражено при ранней ПЭ. Отличительной особенностью этой формы ПЭ является также снижение доли CD8+CTLA-4+ клеток. Эти данные, с одной стороны, свидетельствуют о том, что особенности ранней и поздней ПЭ ассоциированы с изменением различных чек-поинт молекул. При ранней ПЭ – это разнонаправленные изменения экспрессии CTLA-4 на CD4+ (возрастание) и CD8+ (снижение) Т-клетках. При поздней ПЭ – это снижение экспрессии PD-1

на CD4+ лимфоцитах и Tim-3 - на CD4+ и CD8+ лимфоцитах. С другой стороны, различия в характере изменений экспрессии чек-поинт молекул при ранней и поздней ПЭ может являться дополнительным аргументом в пользу иммунопатогенетической разнородности указанных форм ПЭ.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на большой интерес к механизмам формирования иммунологической толерантности при беременности, многие вопросы, касающиеся перестройки иммунной системы и иммуномодулирующей активности ассоциированных с гестацией эндогенных медиаторов остаются недостаточно изученными. В настоящей работе в исследованиях *in vitro* впервые охарактеризована иммуномодулирующая активность PlGF в отношении активированных Т-клеток человека. Установлено, что PlGF в широком диапазоне доз подавляет α -CD3- или ConA- стимулированную пролиферацию в культурах МНК, ингибируя как CD4+, так и CD8+ Т-клетки.

Пролиферация Т-клеток при стимуляции растворимыми α CD3 требует ко-стимуляторного сигнала со стороны АПК, которые экспрессируют VEGFR-1 и, соответственно, могут опосредовать эффекты PlGF. Так, Lin Y с соавт показали, что ингибирующий эффект PlGF на пролиферацию Т-клеток в смешанной культуре лейкоцитов обусловлен подавлением созревания ДК. [82]. Однако учитывая низкое содержание ДК в популяции МНК [21] их участие в реализации супрессорного эффекта PlGF представляется маловероятным. При этом тот факт, что супрессорный эффект PlGF проявлялся в культурах МНК после однократной деплеции моноцитов, а также в культурах сепарированных Т-клеток, стимулированных иммобилизованными α CD3 в комбинации с α -CD28 антителами, свидетельствует о прямом действии фактора на Т-клетки.

Прямое действие PlGF на Т-клетки подтверждается полученными нами данными об экспрессии VEGFR-1 активированными CD4+ и CD8+ Т-клетками. При этом отмена ингибирующего эффекта PlGF в результате блокирования

VEGFR-1, но VEGFR-2 означает, что действие фактора реализуется через VEGFR-1 и не связано с возможным усилением продукции VEGF активированными МНК [16].

Сведения об экспрессии VEGFR-1 на Т-клетках противоречивы. По данным Shin JY с соавт. активированные Т-клетки мыши экспрессируют мРНК VEGFR-1 и VEGFR-2, однако на уровне белка - только VEGFR-1 [154]. Позже эти авторы выявили экспрессию VEGFR-1 в субпопуляции регуляторных CD4+Т-клеток человека [154]. Низкая экспрессия VEGFR-1 и VEGFR-2 в нестимулированных клетках и ее усиление после активации через Т-клеточный рецептор описана также в субпопуляции мышинных CD8+Т-клеток в опухолевом микроокружении [188]. В то же время по данным Ziogas AC и соавт. активированные Т-клетки человека экспрессируют VEGFR-2, но не VEGFR-1 [211]. В нашей работе мы впервые показали, что активация CD4+ и CD8+ Т-клеток усиливает экспрессию поверхностного VEGFR-1 с пиком на 48 часов. Различия с результатами Ziogas AC et al. могут быть связаны с особенностями динамики экспрессии VEGFR-1, различиями в субпопуляционной принадлежности Т-клеток и протоколами активации.

Способность ангиогенных факторов оказывать прямой ингибирующий эффект на Т-клетки человека описана для VEGF, который подавляет пролиферацию и цитотоксическую активность Т-клеток при связывании с VEGFR-2 [211, 42]. Что касается PlGF, до настоящего времени имеется только одно сообщение о супрессорной активности этого фактора в отношении Т-клеток, опосредуемой через подавление созревания ДК [82]. Таким образом, полученные данные впервые демонстрируют прямой супрессорный эффект PlGF на Т-клетки, опосредованный через связывание с VEGFR-1. Учитывая низкую тирозинкиназную активность, VEGFR-1 долгое время рассматривался исключительно как рецептор-ловушка [28]. Однако впоследствии выяснилось, что активация VEGFR-1 – опосредованного сигнального пути в гемопоэтических предшественниках, моноцитах/макрофагах и дендритных клетках вовлечена в регуляцию процессов мобилизации, миграции и созревания клеток [70, 55, 31].

Кроме того, передача сигналов с VEGFR-1 может активировать STAT3 [4] вовлеченный в подавление пролиферации Т-лимфоцитов и продукции ими IL-2 [116].

Исследование иммуномодулирующей активности PlGF выявило также способность фактора усиливать продукции IL-10 и индуцировать апоптоз Т-клеток. Shin J.Y. с соавт. описали усиление продукции IL-10 при активации VEGFR-1 на Т-клетках селезенки и линии CD4⁺ Т-лимфоцитов в результате связывания с VEGF [154], что подтверждает способность VEGFR-1 опосредовать прямой эффект на Т-клетки. Однако авторы не выявили подавления пролиферации Т-клеток, что, видимо, объясняется активацией различных транскрипционных факторов при связывании VEGFR-1 с PlGF и VEGF [70]. По данным литературы IL-10 является иммуносупрессорным цитокином, участвующим в ограничении иммунного ответа и индукции толерантности при беременности [103].

Супрессорный эффект IL-10 наиболее четко выражен в отношении CD4⁺ Т-лимфоцитов. Эндогенная продукция этого цитокина подавляет функции CD4⁺Т-лимфоцитов [58]. Влияние IL-10 на CD8⁺Т-клетки может быть разнонаправленным. Например, при опухолевом росте IL-10 способен стимулировать [109], а при хронической инфекции – проявлять функции цитотоксических CD8⁺Т-клеток [159]. Согласно нашим результатам PlGF усиливает продукцию IL-10 как в CD4⁺, так и CD8⁺ Т-клетках. Однако вопрос - является ли вызванное PlGF усиление продукция IL-10 причиной подавления пролиферации Т-клеток и, особенно, CD8⁺ Т клеток в культурах, остается открытым. Относительно проапоптотической активности фактора –показана способность PlGF усиливать апоптоз легочного эпителия через активацию с-JunN-терминальной киназы и протеин киназы в модели эмфиземы легких [52]. В то же время стимулирующий эффект PlGF на апоптоз CD8⁺ Т-клеток описан нами впервые.

Важным результатом являются также выявленный в настоящей работе стимулирующий эффект PlGF на экспрессию ингибиторных рецепторов, который

в отношении Tim-3 проявлялся возрастанием доли Tim-3+ клеток и средней интенсивности флюорисценции Tim-3 в популяциях CD4 и CD8 Т-лимфоцитов, в отношении PD-1 - увеличением плотности рецептора в обеих субпопуляциях Т-клеток и в отношении CTLA4 – повышением средней интенсивности флюорисценции в популяции CD8 лимфоцитов. Ингибиторный рецептор Tim-3 наряду PD-1 играет важную роль в ослаблении иммунного ответа матери на аллоантигены плода при беременности [8]. Стимулирующий эффект ангиогенных факторов на экспрессию ингибиторных чек-поинт молекул описан ранее на мышах для VEGF-A. Voron T с соавт. показали, что VEGF-A через VEGFR-2 сигнальный путь усиливает экспрессию и ко-экспрессию PD-1, CTLA-4, Tim-3 на CD8+ Т-клетках мышей-опухоленосителей [188], что по мнению авторов может индуцировать Т-клеточное истощение. Полученные нами результаты впервые показали, что аналогичная активность свойственна PlGF, который усиливает экспрессию Tim-3, PD-1 и CTLA4 на Т-клетках человека с наиболее выраженным эффектом в отношении Tim-3.

Полученные *in vitro* данные об иммуномодулирующей активности PlGF в совокупности с известными данными о высокой концентрации PlGF при нормальной беременности и снижении уровня PlGF у беременных с ПЭ позволили предположить, что имунотропные эффекты PlGF играют важную роль в адаптации иммунной системы при гестации, а дефицит этого фактора причастен к нарушениям иммунологической толерантности при гестационных осложнениях [31,7].

Чтобы проверить это предположение, на следующем этапе был проведен сравнительный анализ периферических CD4+ и CD8+ Т-клеток, экспрессирующих молекулы PD-1, CTLA-4 и Tim-3 при неосложненной гестации и ПЭ в сопоставлении с фертильными небеременными. Выбор в качестве исследуемого бимаркера экспрессии чек-поинт молекул был обусловлен важной ролью ингибиторных рецепторов в реализации большинства механизмов иммунной адаптации при гестации [47], включая индукцию анергии/апоптоза, регуляцию цитокинового баланса, генерацию Трег, а также развитии Т-

клеточного истощения [95, 8, 207, 149], а также полученными нами *in vitro* данными о стимулирующем влиянии PlGF на экспрессию Т-клетками ингибиторных рецепторов.

Сравнение беременных и фертильных небеременных выявило достоверное возрастание Tim-3⁺ и PD-1⁺Tim3⁺ клеток в субпопуляции CD4⁺Т-лимфоцитов, а также PD-1⁺ и PD-1⁺Tim-3⁺ клеток в субпопуляции CD8⁺Т-лимфоцитов при неосложненной гестации. Повышенная экспрессия чек-поинт молекул при беременности описана на Т-клетках децидуальной ткани. Децидуальные CD4⁺ Т-клетки, ко-экспрессирующие PD-1⁺ и Tim-3⁺, обладают Th2 фенотипом [195], и запуск PD-1/PD-L1 сигнального пути приводит к угнетению продукции Th1 цитокинов [165]. Усиление экспрессии ингибиторных рецепторов на децидуальных CD8⁺ Т-клетках расценивается в качестве одного из механизмов снижения цитотоксического потенциала CD8⁺ лимфоцитов [107, 129, 192, 182]. В исследованиях *in vitro* взаимодействие Tim-3- и PD-1 с соответствующими лигандами подавляет цитотоксическую активность CD8⁺Т-клеток, что может обеспечивать толерантность к фетальным антигенам [95, 54]. Slutsky R с соавт. выявили в децидуальной ткани беременных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки с фенотипом эффекторных Т-клеток памяти, ко-экспрессирующих PD-1 и Tim-3, и впервые идентифицировали их как Т-клетки в состоянии истощения [158]. Однако ранее Т-клетки с аналогичным фенотипом были описаны на начальных сроках беременности как Т-клетки с регуляторной (Th2) активностью [192, 195].

Сведения об экспрессии чек-поинт молекул периферическими Т-клетками представлены единичными сообщениями. Так, Zhao J. с соавт. не выявили возрастания Tim-3 на CD3⁺ Т-лимфоцитах беременных [208]. Meggyes M с соавт. в своих исследованиях также не обнаружили различий между содержанием CD8⁺Tim-3⁺ у беременных и небеременных, однако CD8⁺Tim-3⁺ клетки беременных во всех триместрах продуцировали меньше провоспалительных цитокинов (IL-2, TNF- α , IFN- γ и IL-17) в сравнении с CD8⁺Tim-3⁻ клетками [92]. Позднее эти авторы продемонстрировала, что содержание CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих молекулу PD-1 в 3-ем триместре беременности, также не

отличалось от такового у небеременных [96]. Эти результаты согласуются с нашими данными об отсутствии различий в содержании CD4+PD-1+ и CD8+Tim-3+ клеток между беременными и небеременными, однако расходятся в отношении CD4+Tim-3+ и CD8+PD-1+ Т-клеток, содержание которых при беременности в нашем исследовании возрастало. Эти расхождения могут быть связаны с различиями исследуемых когорт, а также образцов клеток, в частности, предварительной криоконсервацией клеток в зарубежных исследованиях. При этом нами впервые показано возрастание при беременности Т-клеток, коэкспрессирующих Tim-3 и PD-1 (CD4+PD-1+ Tim Tim-3+ и CD8+PD-1+T Tim-3+ Т-лимфоцитов).

Вторым важным результатом данного фрагмента исследований является анализа зависимости между экспрессией чек-поинт молекул и коморбидным статусом. Возрастание Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и Tim-3 наблюдалось у беременных как с отсутствием, так и наличием сопутствующих экстрагенитальных заболеваний, свидетельствуя, что усиление экспрессии ингибиторных рецепторов является следствием гестации, а не коморбидности. С другой стороны, наличие коморбидной патологии ассоциировалось с рядом особенностей, в частности, более выраженным увеличением CD8+PD-1+ клеток (в сравнении с беременными без сопутствующей патологии), меньшим содержанием CD8+Tim-3+ и отсутствием (характерного для беременных без коморбидности) возрастания PD-1+Tim-3+ Т-клеток. Дополнительным подтверждением зависимости между коморбидностью и экспрессией чек-поинт молекул являлось выявление корреляций между количеством сопутствующих патологий и экспрессией PD-1 и Tim-3 (прямая корреляции с долей CD8+PD-1+ и обратная - с долей CD8+Tim-3+ и CD4+PD-1+Tim-3+ клеток).

По данным литературы сопутствующие экстрагенитальные заболевания, многие из которых связаны с хроническим воспалением, могут осложнять течение беременности и в ряде случаев приводить к материнской смертности [77, 152, 66]. В то же время нами впервые показано, что наличие коморбидности ассоциировано с характером экспрессии чек-поинт молекул на периферических Т-

клетках. При этом разнонаправленная зависимость между количеством сопутствующих патологий с субпопуляциями CD8+PD1+ клеток (положительная связь) и CD8+Tim3+ клеток (отрицательная связь) может свидетельствовать о различной роли молекул PD-1 и Tim-3 в регуляции функций CD8+ клеток при беременности.

В частности, прямая зависимость между экспрессией PD1+ на CD8+ Т-клетках с количеством сопутствующих патологий позволяет предполагать, что появление этой молекулы на Т-клетках связано с их активацией, поскольку не сопровождается параллельным увеличением CD8+Т-клеток, ко-эксперссирующих PD1+ и Tim-3+ (признак Т-клеточного истощения). В то же время экспрессия Tim3+ и ко-экспрессия PD1+ и Tim3+ скорее отражает функциональный статус, ассоциированный с регуляторной (противовоспалительной) активностью Т-клеток [193] или Т-клеточным истощением [158, 54]. При таком рассмотрении уменьшение относительного содержания CD8+Tim3+ Т-клеток и PD1+Tim3+ Т-клеток может отражать ослабление механизмов, обеспечивающих адаптацию иммунной системы при гестации.

Также в настоящей работе получены новые данные о сопряженности между экспрессией ингибиторных рецепторов со сроком гестации и в меньшей степени - возрастом женщин. более высокое содержание Tim-3+ Т-клеток регистрировалось у более молодых беременных и на больших сроках гестации.

Еще одним разделом работы явилось исследование зависимости между экспрессией ингибиторных рецепторов и сенсibilизацией к фетальным антигенам. В модели беременности на мышах экспрессия PD-1 и LAG-3 наиболее выражена при повторной гестации, что объясняется функциональным истощением аллореактивных Т-клеток памяти в условиях антигенной рестимуляции [68]. В нашем исследовании доля CD4+Tim-3+, CD8+PD1+ и PD1+Tim3+ Т-клеток не коррелировала с количеством беременностей или паритетом родов, что возможно объясняется сенсibilизацией спермальными антигенами, которые экспрессируют антигены главного комплекса гистосовместимости [151]. В то же время особенностью повторной беременности

являлось достоверно меньшее содержание CD8+CTLA-4+клеток. Взаимодействие костимуляторных молекул с CTLA-4 приводит к усилению продукции Th2 цитокинов, экспансии Трег и сохранению беременности [210]. Аналогичный эффект наблюдается при стимуляции CTLA-4 –сигнального пути белком CTLA4Ig, что является еще одним подтверждением иммуносупрессивной активности CTLA-4 [79]. Меньшее содержание CTLA-4+ Т-лимфоцитов при повторной беременности и у повторнородящих может отражать результат деплеции указанных лимфоцитов вследствие апоптоза дисфункциональных Т-клеток. Таким образом, гравидарность и паритет родов являются еще одним фактором, ассоциированным с особенностями экспрессии чек-поинт молекул.

Завершающим разделом исследований явился анализ экспрессии чек-поинт молекул на циркулирующих Т-клетках у беременных с ПЭ. Выяснилось, что пациентки с ПЭ характеризуются достоверно меньшим содержанием CD4+Tim-3+ и CD8+PD-1+ клеток, отсутствием характерного для неосложненной беременности достоверного возрастания PD-1+Tim-3+ Т-клеток, а с другой стороны - более высоким содержанием CD4+CTLA-4 клеток в сравнении с неосложненной гестацией.

Преэклампсия является ведущей причиной тяжелой материнской патологии и смертности и, как правило, развивается во второй половине беременности (после 20-й недели). Частота этой патологии составляет в среднем 7% [125, 90]. Патогенез ПЭ связывают с нарушением иммунной регуляции - ослаблением механизмов иммунной толерантности и активацией иммунной системы, о чем свидетельствует снижение Трег и возрастание Th17, а также активация Th1 ответа и усиление цитотоксической активности CD8+ Т-клеток [146, 176, 144, 75]. Поскольку ингибиторные рецепторы вовлечены в Th1/T2h переключение, смещение Th17/Трег баланса в сторону Трег и ограничение цитотоксической функции CD8 Т-лимфоцитов [178], изменение экспрессии этих рецепторов может являться важным молекулярным механизмом и биомаркером развития ПЭ.

Полученные нами данные о снижении CD4⁺Tim-3⁺ клеток у беременных с ПЭ могут свидетельствовать о смещении баланса в сторону провоспалительных

субпопуляции Т-хелперных клеток, поскольку Tim-3 играет важную роль в негативной регуляции Th1 и Th17 [8] и экспрессия этой молекулы на дифференцированных Th1 клетках имеет решающее значение для подавления отторжения аллотрансплантата [54]. В литературе имеются данные о снижении экспрессии Tim-3 в популяции децидуальных и периферических CD8 Т-клеток при ПЭ [193; 98]. Причем по данным Wang S. с соавт. децидуальные CD8+Tim-3+ Т-клетки продуцируют противовоспалительные цитокины, а блокирование Tim-3 сигнального пути приводит к усилению продукции IFN- γ и снижению секреции IL-4 и IL-10 [193]. В то же время в исследованиях Miko E с соавт. CD8+Tim-3+ клетки обладали более высоким цитотоксическим потенциалом (экспрессией молекулы CD107a) в сравнении с Tim-3 негативными CD8+Т-клетками и CD8+Tim-3+ Т-клетками женщин с неосложненной беременностью [98].

В настоящей работе мы также наблюдали уменьшение Tim-3+ клеток в популяции CD8+ Т-лимфоцитов, однако только в подгруппе с поздней ПЭ и эти изменения проявлялось в виде тренда ($p=0,09$). В то же время снижение экспрессии Tim-3+ в популяции периферических CD4+ Т-клеток выявлено нами впервые.

Относительно изменений экспрессии PD-1 Т-клетками беременных с ПЭ – данные противоречивы. Meggyes M. с соавт выявили возрастание у беременных с ранней ПЭ относительного количества CD8+PD-1+ Т-клеток, которые характеризовались более высоким цитотоксическим потенциалом (по экспрессии CD107a) по сравнению с таковыми при неосложненной беременности, т.е. повышенная экспрессия PD-1 на Т-клетках не коррелировала с признаками Т-клеточного истощения. Это позволило авторам сделать заключение о несостоятельности PD-1 / PD-L1 сигнального пути как механизм ингибиции Th1 ответа при ПЭ [99]. В то же время Morita K с соавт, выявили у беременных с ПЭ снижение экспрессии PD-1 на антигенспецифических децидуальных эффекторных Т-клетках памяти [107]. Снижения экспрессии PD1 на Т-клетках может быть результатом протеолитического отщепления мембранной формы PD-1. Это согласуется с данными о повышенном уровне растворимой формы PD-1 у

беременных с ПЭ [44], которая способна оказывать выраженный стимулирующий эффект на Т-клетки, блокируя PD-L1:PD-1 и PD-L2:PD-1 сигнальные пути [161]. Полученные нами данные в целом согласуются с результатами Morita K и др. и при этом впервые демонстрируют уменьшение CD8+PD-1+ клеток в периферической крови. Учитывая, что аналогичные изменения регистрируются при активации иммунной системы у беременных с воспалением плаценты или в родах [158], можно предположить, что снижение CD8+PD-1+ клеток в периферической крови является отражением преодоления Т-клеточного истощения и активации иммунной системы.

Снижение PD-1+ клеток в нашем исследовании выявлялось не только в популяции CD8+, но и CD4+ лимфоцитов (в подгруппе с поздней ПЭ). Tian M. с соавт. описали снижение экспрессии PD-1 в субпопуляции Th17 и впервые связали нарушение PD-1/PD-L1 сигналинга в периферических CD4⁺ клетках с дисбалансом Treg /Th17 у беременных с ПЭ. Снижения доли PD-1+ клеток по мнению авторов ослабляло негативный контроль, способствуя возрастанию Th17 [170]. В нашем исследовании снижение экспрессии PD-1 в общей популяции CD4⁺ клеток в подгруппе беременных с поздней ПЭ в целом согласуется с этими данными [170]. Поскольку экспрессия молекулы PD-1 на CD4 Т-клетках способствует Th2 переключению [54], можно полагать, что уменьшение CD4+PD-1+ клеток у беременных с ПЭ предрасполагает к активации Th1 ответа.

Следует отметить, что наряду со снижением экспрессии PD-1 и Tim-3 популяция CD4 лимфоцитов характеризовалась повышенной экспрессией CTLA-4. Разнонаправленные изменения в экспрессии ингибиторных молекул, могут быть связаны с гетерогенностью CD4 клеток, включающих различные субпопуляции Т-хелперных клеток и Трег, среди которых высокая экспрессия CTLA-4 характерна для Трег. Voij R с соавт. выявил возрастание Трег, экспрессирующих CTLA-4, при ранней и тяжелой ПЭ и объяснили этот факт дефектом миграции Трег в децидуальную ткань [14]. В этом аспекте полученные нами данные согласуются с результатами Voij R. и позволяют предположить, что увеличение CD4+CTLA-4 клеток обусловлено субпопуляцией Трег.

Сравнительный анализ экспрессии ингибиторных молекул у беременных с умеренной и тяжелой ПЭ позволил выявить ряд особенностей, ассоциированных с тяжестью ПЭ. Так, снижение CD4+Tim-3+ и CD8+PD-1+ Т-клеток было характерно именно для умеренной ПЭ, тогда как повышение экспрессии CTLA-4 в популяции CD4+ Т-клеток - для тяжелой ПЭ. По данным литературы наиболее выраженное возрастание в крови провоспалительных цитокинов наблюдается при умеренной ПЭ, а снижение противовоспалительных цитокинов - при тяжелой ПЭ [27, 89]. С этой точки зрения наиболее выраженное снижение CD4+Tim-3+ и CD8+PD-1+ Т-клеток при умеренной ПЭ косвенно подтверждает предположение о том, что уменьшение экспрессии Tim-3 и PD-1 на Т-клетках при ПЭ сопряжено со смещением баланса в сторону доминирования провоспалительной активности. Полученные нами результаты также являются еще одним фактом, демонстрирующим сопряженность между иммунными нарушениями и тяжестью ПЭ.

Важно отметить, что по времени манифестации выделяют раннюю и позднюю ПЭ. Ранняя преэклампсия развивается до 34 недель беременности и вызвана дисфункцией плаценты. Поздняя преэклампсия развивается преимущественно из-за несоответствия и нарушений метаболизма, включая ожирение и диабет [132, 110]. При этом ранняя ПЭ ассоциирована с более выраженной активацией врожденного иммунитета [7] и дисфункциями регуляторных Т-клеток [145]. Проведенные в настоящей работе исследования показали, что возрастание CD4+CTLA-4+ клеток характерно именно для ранней ПЭ. Отличительной особенностью этой формы ПЭ является также уменьшение доли CD8+CTLA-4+ клеток. В свою очередь, снижение CD4+Tim-3+ и CD8+PD-1+ клеток наиболее выражено при поздней ПЭ. Особенностью поздней ПЭ является также достоверное уменьшение CD4+PD-1+ клеток и тенденция к снижению CD8+Tim-3+ клеток (в сравнении с неосложненной беременностью). Эти данные, с одной стороны, свидетельствуют о том, что особенности ранней и поздней ПЭ ассоциированы с изменением различных чекпойнт молекул. При ранней ПЭ – это разнонаправленное изменение экспрессии CTLA-4 на CD4+

(возрастание) и CD8⁺ (снижение) Т-клетках. При поздней ПЭ – это снижение экспрессии PD-1 на CD4⁺ лимфоцитах и Tim-3 - на CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитах. С другой стороны, различия в характере изменений экспрессии чекпоинт молекул при ранней и поздней ПЭ могут являться дополнительным аргументом в пользу иммунопатогенетической разнородности указанных форм ПЭ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рабочей гипотезой настоящего исследования стало предположение о том, что PlGF обладает иммунорегуляторной активностью и играет важную роль в перестройке иммунной системы при беременности. Поводом для этого послужили данные об иммуносупрессорной активности ангиогенных VEGF, при опухолевом росте; сходстве опухоли и плода в контексте неоангиогенеза, инвазивного роста и индукции иммунологической толерантности, а также данные о возрастании PlGF при нормальной беременности и снижении его концентрации при ПЭ, сопряженной со срывом толерантности и активацией иммунной системы.

Полученные данные показали, что PlGF подавляет пролиферацию Т-клеток, стимулированных через Т-клеточный рецептор α CD3 или Т-клеточным митогеном ConA в культурах МНК, ингибируя как CD4⁺, так и CD8⁺ Т-клетки. При этом сохранение супрессорного эффекта PlGF после удаления моноцитов (деплеция адгезивной к пластику фракции МНК), а также в культурах сепарированных Т-клеток свидетельствует о прямом действии фактора. Также продемонстрировано, что супрессорный эффект PlGF на пролиферацию Т-клеток реализуется через связывание с VEGF-R1, экспрессия которого существенно возрастает при активации Т-лимфоцитов. Подтверждением роли PlGF/VEGFR-1 сигнального пути в подавлении пролиферации является отмена супрессорного эффекта PlGF при блокировании VEGFR-1 при сохранении ингибирующего действия в условиях блокирования VEGFR-2.

Наряду с подавлением пролиферации иммуномодулирующая активность PlGF проявляется в способности PlGF повышать продукцию IL-10 субпопуляциями CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов, а также усиливать активационно-индуцированную гибель CD8⁺ Т-клеток в культурах α CD3-стимулированных МНК. Другим эффектом PlGF является стимулирующее действие фактора на экспрессию ингибиторных рецепторов активированными Т-клетками. Это проявляется в возрастании доли Tim-3⁺ клеток и средней интенсивности флюорисценции Tim-3 в субпопуляции CD4⁺ и CD8⁺лимфоцитов, повышении

средней флюорисценции PD-1+ в обеих субпопуляциях Т-клеток и возрастании плотности CTLA-4+ на CD8+ клетках.

Чтобы оценить возможное участие PlGF в модуляции иммунной системы при гестации, во второй части работы проведено сравнительное исследование Т-клеток у беременных с неосложненной гестацией и ПЭ, характеризующихся, соответственно, высоким и сниженным уровнем сывороточного PlGF (в нашем исследовании 479 и 253 пг/мл). Учитывая выявленный *in vitro* стимулирующий эффект PlGF на экспрессию Т-клетками ингибиторных рецепторов и важную роль чек-поинт молекул в реализации механизмов иммунной адаптации, основным исследуемым параметром стала оценка относительного содержания Т-клеток, экспрессирующих PD-1, CTLA-4 и Tim-3.

Установлено, что беременные во второй половине неосложненной гестации в сравнении с фертильными небеременными характеризуются повышенным содержанием циркулирующих CD4+ Tim-3+ и CD8+PD-1+ Т-лимфоцитов, в том числе CD4+ и CD8+ Т-клеток, коэкспрессирующих PD-1 и Tim-3. Увеличение доли Т-клеток, экспрессирующих чек-поинт молекулы, регистрируется как у беременных с наличием, так и отсутствием сопутствующей экстрагенитальной патологии, являясь следствием гестации, а не коморбидного статуса. Тем не менее, наличие экстрагенитальной патологии ассоциировано с рядом особенностей – более высоким содержанием CD8+PD-1+ клеток и меньшим количеством CD8+Tim-3+ Т-клеток. При этом количество регистрируемых сопутствующих патологий прямо коррелирует с долей CD8+PD-1+ клеток и обратно – с долей CD8+Tim-3+ Т-клеток, что является дополнительным аргументом в пользу сопряженности коморбидного статуса с характером экспрессии чек-поинт молекул. Другими факторами, ассоциированными с экспрессией чек-поинт молекул при неосложненной гестации, являются срок беременности и паритет родов. Причем, если срок гестации ассоциирован в большей степени с экспрессией молекулы Tim-3 и PD-1 (прямая корреляция с долей CD8+Tim-3+, CD4+PD-1+Tim-3+ и CD8+PD-1+Tim-3+ клеток), то паритет родов – с экспрессией CTLA-4 и PD-1 (обратная корреляция с долей CD4+CTLA-

4+ и CD8+CTLA-4+ Т-лимфоцитов и прямая - с содержанием CD4+PD-1+ Т-клетками).

В сравнении с неосложненной гестацией пациентки с ПЭ характеризуются снижением экспрессии молекул Tim-3 и PD-1 (достоверно меньшим содержанием CD4+Tim-3+ и CD8+PD-1+ клеток и отсутствием характерного для неосложненной гестации возрастанием PD-1+Tim-3+ Т-клеток) в сочетании с увеличением CTLA-4-экспрессирующих CD4+ клеток. При этом выявлен ряд особенностей, ассоциированных с тяжестью и сроками манифестации ПЭ. Так, снижение CD4+Tim-3+ и CD8+PD-1+ Т-клеток характерно именно для умеренной ПЭ, тогда как повышение экспрессии CD4+CTLA-4 - для тяжелой ПЭ. При сопоставлении ПЭ в зависимости от сроков манифестации - отличительной особенностью ранней ПЭ является снижение доли CD8+CTLA-4+ клеток и более выраженное возрастание CD4+CTLA-4+ клеток, а с поздней ПЭ – уменьшение CD4+PD-1+ клеток и более выраженное снижение CD4+Tim-3+ клеток. Таким образом, особенности в экспрессии чек-поинт молекул при ранней и поздней ПЭ ассоциированы с различными чекпоинт молекул (CTLA-4 при ранней ПЭ и PD-1/Tim-3 – при поздней ПЭ), что является дополнительным аргументом в пользу иммунопатогенетической разнородности указанных форм ПЭ. В целом, выявленное усиление экспрессии PD-1 и Tim-3 при неосложненной гестации и снижении их экспрессии в группе с ПЭ является аргументом в пользу участия PlGF в модуляции функций Т-клеток при гестации и обосновывает целесообразность дальнейшего исследования экспрессии ингибиторных рецепторов на периферических Т-клетках в качестве нового биомаркера иммунной адаптации при беременности.

ВЫВОДЫ

1. PlGF в широком диапазоне доз подавляет пролиферацию активированных Т-клеток, включая CD4 и CD8 Т-лимфоциты. При этом способность фактора проявлять ингибирующий эффект при деплеции моноцитов и в культурах сепарированных Т-клеток, а также подавление супрессорного эффекта при блокировании VEGF-R1, но не VEGF-R2 свидетельствует о прямом действии PlGF на Т-клетки, опосредованном рецептором к VEGF 1-го типа.
2. PlGF в культурах aCD3-активированных МНК повышает продукцию IL-10 в субпопуляциях CD4 и CD8 Т-лимфоцитов и уровень апоптоза CD8 Т-клеток, а также усиливает на Т-клетках экспрессию PD-1, CTLA-4 и в наибольшей степени Tim-3, что свидетельствует о выраженном иммуномодулирующем эффекте PlGF на активированные Т-лимфоциты.
3. Беременные во второй половине неосложненной гестации в сравнении с фертильными небеременными характеризуются повышенным содержанием циркулирующих CD4+Tim-3+ и CD8+PD-1+ Т-клеток, а также CD4 и CD8 Т-лимфоцитов, коэкспрессирующих PD-1 и Tim-3, что свидетельствует об усилении экспрессии ингибиторных рецепторов на периферических Т-клетках при гестации.
4. Увеличение CD4+Tim-3+ и CD8+PD-1+ Т-клеток регистрируется независимо от коморбидного фона, однако наличие сопутствующих экстрагенитальных заболеваний ассоциировано с более выраженным увеличением CD8+PD-1+ клеток и снижением CD8+Tim3+ лимфоцитов, что в совокупности с отсутствием достоверного возрастания PD-1+Tim-3+Т-клеток свидетельствует о влиянии сопутствующей патологии на характер экспрессии Т-клетками ингибиторных рецепторов.
5. Пациентки с ПЭ (в сравнении с неосложненной беременностью) характеризуются меньшим содержанием CD4+Tim-3+ и CD8+PD-1+ клеток (что в

большей степени характерно для умеренной ПЭ), отсутствием возрастания PD-1+Tim-3+Т-лимфоцитов и возрастанием CD4+CTLA-4+ Т-клеток (более выраженным при тяжелой ПЭ), что свидетельствует о существенных изменениях в экспрессии ингибиторных молекул на Т-клетках при осложненной гестации и сопряженности выявленных изменений с тяжестью ПЭ.

6. Отличительной особенностью ранней ПЭ является снижение доли CD8+CTLA-4+ клеток и более выраженное возрастание CD4+CTLA-4+ клеток, а поздней ПЭ – уменьшение CD4+PD-1+ клеток и более выраженное снижение CD4+Tim-3+ клеток, что свидетельствует в пользу иммунопатогенетической разнородности ранней и поздней ПЭ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abu-Raya, B., Michalski, C., Sadarangani, M., & Lavoie, P. M. (2020). Maternal Immunological Adaptation During Normal Pregnancy. *Frontiers in immunology*, 11, 575197. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.575197>
2. Adini A., Kornaga T., Firoozbakht F., Benjamin L.E. Placental growth factor is a survival factor for tumor endothelial cells and macrophages. *Cancer Res.* 2002;62:2749–2752.
3. Albonici L, Benvenuto M, Focaccetti C, et al. PlGF Immunological Impact during Pregnancy. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):8714. Published 2020 Nov 18. doi:10.3390/ijms21228714
4. Albonici L, Giganti M, Modesti A, et al. Multifaceted role of the placental growth factor (PlGF) in the antitumor immune response and cancer progression. *Int J Mol Sci.* 2019; 18: 20(12). pii: E2970. doi: 10.3390/ijms20122970.
5. Ali L.E., Salih M.M., Elhassan E.M., Mohmmmed A.A., Adam I. Placental growth factor, vascular endothelial growth factor, and hypoxia-inducible factor-1alpha in the placentas of women with pre-eclampsia. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 2019;32:2628–2632. doi:10.1080/14767058.2018.1443066.
6. Anarck PC, Hecher K. Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health. *Nat Med.* (2013) 99:548–56. 10.1038/nm.3160
7. Aneman I, Pienaar D, Suvakov S, Simic TP, Garovic VD, McClements L. Mechanisms of Key Innate Immune Cells in Early- and Late-Onset Preeclampsia. *Front Immunol.* 2020;11:1864. Published 2020 Aug 18. doi:10.3389/fimmu.2020.01864
8. Banerjee H, Kane LP. Immune regulation by Tim-3. *F1000Res.* 2018;7:316. Published 2018 Mar 14. doi:10.12688/f1000research.13446.1
9. Barber DL, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature.* This study shows that exhausted CD8+ T cells can be reinvigorated by blocking PD1 signalling during chronic viral infection in mice. 2006; 439:682–687
10. Barton BM, Xu R, Wherry EJ, Porrett PM. Pregnancy promotes tolerance to future offspring by programming selective dysfunction in long-lived maternal T cells. *J Leukoc Biol.* 2017;101:975–87.
11. Binder N.K., Evans J., Salamonsen L.A., Gardner D.K., Kaitu'u-Lino T.J., Hannan N.J. Placental Growth Factor Is Secreted by the Human Endometrium and Has Potential Important Functions during Embryo Development and Implantation. *PLoS ONE.* 2016; 11:e0163096. doi:10.1371/journal.pone.0163096.

12. Blackburn et al., 2009 Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, Betts MR, Freeman GJ, Vignali DA, Wherry EJ *Nat Immunol.* 2009 Jan; 10(1):29-37.
13. Blank CU, Haining WN, Held W, Hogan PG, Kallies A, Lugli E, Lynn RC, Philip M, Rao A, Restifo NP, Schietinger A, Schumacher TN, Schwartzberg PL, Sharpe AH, Speiser DE, Wherry EJ, Youngblood BA, Zehn D. Defining 'T cell exhaustion'. *Nat Rev Immunol.* 2019 Nov;19(11):665-674. doi: 10.1038/s41577-019-0221-9.
14. Boij R, Mjøsberg J, Svensson-Arvelund J, Hjorth M, Berg G, Matthiesen L, Jenmalm MC, Ernerudh J. Regulatory T-cell Subpopulations in Severe or Early-onset Preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2015 Oct;74(4):368-78. doi: 10.1111/aji.12410. Epub 2015 Jun 27. PMID: 26118401.
15. Bonney EA. Immune Regulation in Pregnancy: A Matter of Perspective? *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2016 Dec;43(4):679-698. doi: 10.1016/j.ogc.2016.07.004.
16. Bottomley M., Webb N., Watson C., Holt L., Bukhari M., Denton J., Freemont A., Brenchley P. Placenta growth factor (PlGF) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from mononuclear cells and is co-expressed with VEGF in synovial fluid. *Clin Exp Immunol.* 2000; 119(1): 182-188. DOI: 10.1046/j.1365-2249.2000.01097.x
17. Bourhis M, Palle J., Galy-Fauroux I.[et al.] Direct and Indirect Modulation of T Cells by VEGF-A Counteracted by Anti-Angiogenic Treatment. *Front Immunol.* - 2021.-12:616837.doi.org/10.3389/fimmu.2021.616837.
18. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol.* 2016;39(1):98-106. doi:10.1097/COC.0000000000000239
19. Chang RQ, Zhou WJ, Li DJ, Li MQ. Innate Lymphoid Cells at the Maternal-Fetal Interface in Human Pregnancy. *Int J Biol Sci* 2020; 16(6):957-969. doi:10.7150/ijbs.38264. Available from <http://www.ijbs.com/v16p0957.htm>
20. Chau, K., Hennessy, A. & Makris, A. Placental growth factor and pre-eclampsia. *J Hum Hypertens* 31, 782–786 (2017). <https://doi.org/10.1038/jhh.2017.61>
21. Chen X, Liu X, Liu W, et al. Comparative analysis of dendritic cell numbers and subsets between smoking and control subjects in the peripheral blood. *Int J ClinExpPathol.* 2013;6(2):290-6.
22. Chen, L., Flies, D. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 13, 227–242 (2013). <https://doi.org/10.1038/nri3405>
23. Christiansen OB, Steffensen R, Nielsen HS. The impact of anti-HY responses on outcome in current and subsequent pregnancies of patients with recurrent pregnancy losses. *J Reprod Immunol.* 2010;85:9–14.

24. Collins MK, Tay C-S, Erlebacher A. Dendritic cell entrapment within the pregnant uterus inhibits immune surveillance of the maternal/fetal interface in mice. *J Clin Invest.* 2009;119:2062–2073
25. Xu Y.Y , Riella LV, Mfarrej BG, Chabtini L, Adams LT, Yeung M, Yagita H, Azuma M, Sayegh MH, Guleria I The link between the PDL1 costimulatory pathway and Th17 in fetomaternal tolerance. *J Immunol.* 2011 Nov 1; 187(9):4530-41.
26. D'Orsogna LJ, Roelen DL, Doxiadis II, Claas FH. TCR cross-reactivity and allorecognition: new insights into the immunogenetics of allorecognition. *Immunogenetics.* 2012;64:77–85.
27. Daneva AM, Hadhi-Lega M, Stefanovic M. Correlation of the system of cytokines in moderate and severe preeclampsia. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2016;43(2):220-4. PMID:Most pronounced changes in the levels of proinflammatory cytokines were observed in mild preeclampsia. In severe preeclampsia there was reduction of the concentration of anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10.
28. De Falco S. The discovery of placenta growth factor and its biological activity. *Exp Mol Med.* 2012; 44(1): 1–9. DOI: 10.3858/emm.2012.44.1.025.
29. Deshmukh, H., & Way, S. S. (2019). Immunological Basis for Recurrent Fetal Loss and Pregnancy Complications. *Annual review of pathology*, 14, 185–210. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012743>
30. Dewerchin M., Carmeliet P. PlGF: a multitasking cytokine with disease-restricted activity. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012; 2(8): a011056. DOI: 10.1101/cshperspect.a011056
31. Dikov M, Ohm J, Ray N, Tchekneva EE, Burlison J, Moghanaki D, et al. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in dendritic cell differentiation. *J Immunol.* 2005;174:215–22. doi:10.4049/jimmunol.174.1.215.
32. Doering TA, et al. Network analysis reveals centrally connected genes and pathways involved in CD8+ T cell exhaustion versus memory. *Immunity.* 2012;37:1130–1144.
33. Dolina JS, Van Braeckel-Budimir N, Thomas GD, Salek-Ardakani S. CD8+ T Cell Exhaustion in Cancer. *Front Immunol.* 2021 Jul 20;12:715234. doi: 10.3389/fimmu.2021.715234.
34. Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol* 2009; 33: 130–137 (найти дополнительно русскую ссылку)
35. Dutta S., Sengupta P. Defining pregnancy phases with cytokine shift // *Journal of Pregnancy and Reproduction* 2017, DOI:10.15761/JPR.1000124
36. Erlebacher A, Vencato D. Constraints in antigen presentation severely restrict T cell recognition of the allogeneic fetus. *J Clin Invest.* 2007;117(5):1399-1411.

37. Erlebacher A. Mechanisms of T cell tolerance towards the allogeneic fetus. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(1):23-33.
38. Faas MM, de Vos P. Uterine NK cells and macrophages in pregnancy. *Placenta.* 2017 Aug;56:44-52. doi: 10.1016/j.placenta.2017.03.001.
39. Figueiredo AS, Schumacher A. The T helper type 17/regulatory T cell paradigm in pregnancy. *Immunology.* 2016 May;148(1):13-21. doi: 10.1111/imm.12595.
40. Fox R, Kitt J, Leeson P, Aye CYL, Lewandowski AJ. Preeclampsia: Risk Factors, Diagnosis, Management, and the Cardiovascular Impact on the Offspring. *J Clin Med.* 2019;8(10):1625. Published 2019 Oct 4. doi:10.3390/jcm8101625
41. Gardner A. Dendritic cells and cancer immunity./A. Gardner, B. Ruffell// *Trends Immunol-* 2016.- V. 37.- P. 855–65
42. Gavalas N, Tsiatas M, Tsitsilonis O, et al. VEGF directly suppresses activation of T cells from ascites secondary to ovarian cancer via VEGF receptor type 2. *Br J Cancer.* 2012; 107:1869–75.10.1038/bjc.2012.468
43. Griffith O.W., Chavan A.R., Protopapas S., Maziarz J., Romero R., Wagner G.P. Embryo implantation evolved from an ancestral inflammatory attachment reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017;114:E6566–E6575. doi: 10.1073/pnas.1701129114.
44. Gu Y, Morgan J, Lewis DF, Cooper DB, McCathran CE, Wang Y. Maternal soluble PD-1 levels are significantly increased in women with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2020 Jan;83(1):e13193. doi: 10.1111/aji.13193. Epub 2019 Oct 17. PMID: 31585483.
45. Guerin LR, Moldenhauer LM, Prins JR, Bromfield JJ, Hayball JD, Robertson SA. Seminal Fluid Regulates Accumulation of FOXP3+ Regulatory T Cells in the Preimplantation Mouse Uterus Through Expanding the FOXP3+ Cell Pool and CCL19-Mediated Recruitment1. *Biology of Reproduction.* 2011;85(2):397-408
46. Guerrero B, Hassouneh F, Delgado E, Casado JG, Tarazona R. Natural killer cells in recurrent miscarriage: An overview. *J Reprod Immunol.* 2020 Nov;142:103209. doi: 10.1016/j.jri.2020.103209.
47. Hardardottir L, Bazzano MV, Glau L, Gattinoni L, Kuninger A, Tolosa E, Solano ME. The New Old CD8+ T Cells in the Immune Paradox of Pregnancy. *Front Immunol.* 2021 Nov 16;12:765730. doi: 10.3389/fimmu.2021.765730. PMID: 34868016; PMCID: PMC8635142.
48. Hashimoto M, Im SJ, Araki K, Ahmed R. Cytokine-Mediated Regulation of CD8 T-Cell Responses During Acute and Chronic Viral Infection. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2019 Jan 2;11(1):a028464. doi: 10.1101/cshperspect.a028464. PMID: 29101105; PMCID: PMC6314063
49. He, X., Xu, C. Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy. *Cell*

50. Herraiz I, Llubra E, Verlohren S, Galindo A; Spanish Group for the Study of Angiogenic Markers in Preeclampsia. Update on the Diagnosis and Prognosis of Preeclampsia with the Aid of the sFlt-1/ PlGF Ratio in Singleton Pregnancies. *Fetal Diagn Ther*. 2018;43(2):81-89. doi: 10.1159/000477903.
51. Holme A.M., Roland M.C., Henriksen T., Michelsen T.M. In vivo uteroplacental release of placental growth factor and soluble Fms-like tyrosine kinase-1 in normal and preeclamptic pregnancies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2016;215:782e1–782e9. Doi: 10.1016/j.ajog.2016.07.056.
52. Hou H., Cheng S., Chung K., Wei S., Tsao P., Lu H., Wang H., Yu C. PlGF mediates neutrophil elastase-induced airway epithelial cell apoptosis and emphysema. *Respir Res*. 2014; 15(1): 106. DOI 10.1186/s12931-014-0106-1.
53. Houser BL, Tilburgs T, Hill J, Nicotra ML, Strominger JL. Two unique human decidual macrophage populations. *J Immunol*. 2011;186:2633–2642
54. Hu XH, Tang MX, Mor G, Liao AH. Tim-3: Expression on immune cells and roles at the maternal-fetal interface. *J Reprod Immunol*. 2016 Nov;118:92-99. doi: 10.1016/j.jri.2016.10.113. Epub 2016 Oct 20. PMID: 27792886.
55. Huang Y, Chen X, Dikov M, et al. Distinct roles of VEGFR-1 and VEGFR-2 in the aberrant hematopoiesis associated with elevated levels of VEGF. *Blood*. 2007; 15:110(2):624-31.
56. Inada K, Shima T, Nakashima A, Aoki K, Ito M, Saito S. Characterization of Regulatory T Cells in Decidua of Miscarriage Cases With Abnormal or Normal Fetal Chromosomal Content. *J Reprod Immunol* (2013) 97:104–11. 10.1016/j.jri.2012.12.001
57. Incio J, Tam J, Rahbari NN, Fukumura D. PlGF/VEGFR-1 Signaling Promotes Macrophage Polarization and Accelerated Tumor Progression in Obesity. *Clin Cancer Res*. 2016 Jun 15;22(12):2993-3004. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1839.
58. Jankovic D., Kugler D., Sher A. Emmerich J., IL-10 production by CD4+ effector T cells: a mechanism for self-regulation. *Mucosal Immunol*. 2010; 3(3): 239-246. DOI: 10.1038/mi.2010.8.
59. Jiang TT, Chaturvedi V, Ertelt JM, Kinder JM, Clark DR, Valent AM, et al. Regulatory T cells: new keys for further unlocking the enigma of fetal tolerance and pregnancy complications. *J Immunol*. (2014) 192:4949–56. 10.4049/jimmunol.1400498
60. Jin LP, Chen QY, Zhang T, Guo PF, Li DJ. The CD4+CD25 bright regulatory T cells and CTLA-4 expression in peripheral and decidual lymphocytes are down-regulated in human miscarriage. *Clin Immunol*. 2009 Dec;133(3):402-10. doi: 10.1016/j.clim.2009.08.009. Epub 2009 Sep

61. Jin LP, Fan DX, Zhang T, Guo PF, Li DJ. The costimulatory signal upregulation is associated with Th1 bias at the maternal-fetal interface in human miscarriage. *Am J Reprod Immunol.* (2011) 66:270–8. 10.1111/j.1600-0897.2011.00997.x
62. Jurgensen N, Persson G, Hviid TVF. The Tolerogenic Function of Regulatory T Cells in Pregnancy and Cancer. *Front Immunol.* 2019 May 8;10:911. doi: 10.3389/fimmu.2019.00911. PMID: 31134056; PMCID: PMC6517506
63. Kahn DA, Baltimore D. Pregnancy induces a fetal antigen-specific maternal T regulatory cell response that contributes to tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2010) 107:9299–304. 10.1073/pnas.1003909107
64. Kang, X., Zhang, X., Liu, Z., Xu, H., Wang, T., He, L. and Zhao, A., Granulocytic myeloid- derived suppressor cells maintain feto- maternal tolerance by inducing Foxp3 expression in CD4+CD25- T cells by activation of the TGF- beta/beta- catenin pathway. *Mol. Hum. Reprod.* 2016. 22: 499–511.
65. Kieffer TEC, Laskewitz A, Scherjon SA, Faas MM, Prins JR. Memory T Cells in Pregnancy. *Front Immunol.* 2019;10:625. Published 2019 Apr 2. doi:10.3389/fimmu.2019.00625
66. Kilpatrick SJ, Abreo A, Greene N, Melsop K, Peterson N, Shields LE, Main EK. Severe maternal morbidity in a large cohort of women with acute severe intrapartum hypertension. *Am J Obstet Gynecol.* 2016 Jul;215(1):91.e1-7. doi: 10.1016/j.ajog.2016.01.176.
67. Kinder JM, Stelzer IA, Arck PC, Way SS. Immunological implications of pregnancy-induced microchimerism. *Nat Rev Immunol.* 2017 Aug;17(8):483-494. doi: 10.1038/nri.2017.38
68. Kinder JM, Turner LH, Stelzer IA, Miller-Handley H, Burg A, Shao TY, Pham G, Way SS. CD8+ T Cell Functional Exhaustion Overrides Pregnancy-Induced Fetal Antigen Alloimmunization. *Cell Rep.* 2020 Jun 23;31(12):107784. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107784.
69. Kobayashi, H., Ichikawa, M., Akasaka, J., Tsunemi, T., & Sado, T. (2019). Immune-related pathophysiological causes relevant to a subset of patients with preeclampsia (Review). *World Academy of Sciences Journal.* 2019.- Vol.1;P-59-66, DOI: 10.3892/wasj.2019.10
70. Koch S, Tugues S, Li X, et al. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J.* 2011; 437(2):169–8310.1042/BJ2011030.
71. Koch S., Tugues S., Li X., Gualandi L., Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J.* 2011; 437(2): 169–183. DOI: 10.1042/BJ20110301
72. Krop J, Heidt S, Claas FHJ, Eikmans M. Regulatory T Cells in Pregnancy: It Is Not All About FoxP3. *Front Immunol.* 2020;11:1182. Published 2020 Jun 23. doi:10.3389/fimmu.2020.01182.
73. Laidlaw BJ, Craft JE, Kaech SM. The multifaceted role of CD4(+) T cells in

- CD8(+) T cell memory. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(2):102-111. doi:10.1038/nri.2015.10
74. Lapeyre-Prost A, Terme M, Pernot S, Pointet AL, Voron T, Tartour E, Taieb J. Immunomodulatory Activity of VEGF in Cancer. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2017;330:295-342. doi: 10.1016/bs.ircmb.2016.09.007.
 75. Laresgoiti-Servitje E., Gymez-Lypez N., Olson David M. An immunological insight into the origins of pre-eclampsia, *Human Reproduction Update*, Volume 16, Issue 5, September-October 2010, Pages 510–524, <https://doi.org/10.1093/humupd/dmq007>
 76. Lecarpentier Ё., Vieillefosse S., Haddad B., Fournier T., Leguy M., Guibourdenche J., Tsatsaris V. Placental growth factor (PlGF) and sFlt-1 during pregnancy: physiology, assay and interest in preeclampsia. *Ann Biol Clin (Paris).* 2016; 74(3): 259-267. DOI: 10.1684/abc.2016.1158.
 77. Lewandowska M, Więckowska B, Sajdak S, Lubiński J. Pre-Pregnancy Obesity vs. Other Risk Factors in Probability Models of Preeclampsia and Gestational Hypertension. *Nutrients.* 2020;12(9):2681. Published 2020 Sep 2. doi:10.3390/nu12092681
 78. Li B, Chan HL, Chen P. Immune Checkpoint Inhibitors: Basics and Challenges. *Curr Med Chem.* 2019;26(17):3009-3025. doi: 10.2174/0929867324666170804143706. PMID: 28782469.
 79. Li W, Li B, Fan W, Geng L, Li X, Li L, et al. . CTLA4 Ig gene transfer alleviates abortion in mice by expanding CD4+CD25+regulatory T cells and inducing indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Reprod Immunol.* (2009) 80:1–11. 10.1016/j.jri.2008.11.006
 80. Li X, Zhou J, Fang M, Yu B. Pregnancy immune tolerance at the maternal-fetal interface. *Int Rev Immunol.* 2020;39(6):247-263. doi: 10.1080/08830185.2020.1777292. Epub 2020 Jun 12. PMID: 32530719.
 81. Li Y.L, Zhao H., Ren X. Relationship of VEGF/VEGFR with immune and cancer cells: staggering or forward? *Cancer Biol Med.*, 2016, Vol. 13, no. 2, pp. 206-214.
 82. Lin Y, Liang Y, Chiang B. Placental growth factor down-regulates type 1 T helper immune response by modulating the function of dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 2007;82:1473–1480. doi: 10.1189/jlb.0307164
 83. Linscheid C, Petroff MG. Minor histocompatibility antigens and the maternal immune response to the fetus during pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2013;69(4):304-314. doi:10.1111/aji.12075
 84. Lissauer D, Kilby MD, Moss P. Maternal effector T cells within decidua: The adaptive immune response to pregnancy? *Placenta.* 2017 Dec;60:140-144. doi: 10.1016/j.placenta.2017.09.003.

85. Lissauer D, Piper K, Goodyear O, Kilby MD, Moss PA. Fetal-Specific CD8+ Cytotoxic T Cell Responses Develop During Normal Human Pregnancy and Exhibit Broad Functional Capacity. *J Immunol* (2012) 189:1072–80. doi:10.4049/jimmunol.1200544
86. Liu L, Huang X, Xu C, Chen C, Zhao W, Li D, et al. Decidual CD8(+)T cells exhibit both residency and tolerance signatures modulated by decidual stromal cells. *J Transl Med.* (2020)18:221. doi: 10.1186/s12967-020-02371-3
87. Lu B, Teng X, Fu G, Bao L, Tang J, Shi H, et al. Analysis of PD-L1 expression in trophoblastic tissues and tumors. *Hum Pathol.* (2019) 84:202–12. doi: 10.1016/j.humpath.2018.10.001
88. Marino J, Paster J, Benichou G. Allorecognition by T Lymphocytes and Allograft Rejection. *Front Immunol.* 2016 Dec 14;7:582. doi: 10.3389/fimmu.2016.00582.
89. Markova, A. D., Hadhi-Lega, M., & Mijakoski, D. (2016). Indicators of Moderate and Severe Preeclampsia in Correlation with Maternal IL10. *Open access Macedonian journal of medical sciences*, 4(2), 236–242. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2016.047>
90. Mayrink J, Costa ML, Cecatti JG. Preeclampsia in 2018: Revisiting Concepts, Physiopathology, and Prediction. *ScientificWorldJournal.* 2018;2018:6268276. Published 2018 Dec 6. doi:10.1155/2018/6268276
91. McLane LM, Abdel-Hakeem MS, Wherry EJ. CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. *Annu Rev Immunol.* 2019 Apr 26;37:457–495. doi: 10.1146/annurev-immunol-041015-055318.
92. Meggyes M., Miko E., Polgar B., Bogar B., Farkas B., Illes Z., Szereday L. Peripheral blood TIM-3 Positive NK and CD8+ T cells throughout pregnancy: TIM-3/Galectin-9 interaction and its possible role during pregnancy. *PLoS ONE.* 2014;9:e92371. doi:10.1371/journal.pone.0092371
93. Meggyes M, Lajko A, Palkovics T, Totsimon A, Illes Z, Szereday L, et al. . Feto-maternal immune regulation by TIM-3/galectin-9 pathway and PD-1 molecule in mice at day 14.5 of pregnancy. *Placenta.* (2015) 36:1153–60. doi:10.1016/j.placenta.2015.07.124
94. Meggyes M, Miko E, Lajko A, et al. Involvement of the PD-1/PD-L1 Co-Inhibitory Pathway in the Pathogenesis of the Inflammatory Stage of Early-Onset Preeclampsia. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3):583. Published 2019 Jan 29. doi:10.3390/ijms20030583
95. Meggyes, M., Miko, E., Szigeti, B. et al. The importance of the PD-1/PD-L1 pathway at the maternal-fetal interface. *BMC Pregnancy Childbirth* 19, 74 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12884-019-2218-6>
96. Meggyes M, Nagy DU, Szereday L. Investigation of the PD-1 and PD-L1 Immune Checkpoint Molecules Throughout Healthy Human Pregnancy and in Nonpregnant Women. *J Clin Med.* 2020;9(8):2536. Published 2020 Aug 6. doi:10.3390/jcm9082536

97. Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mişu C, Istrate M, Moldovan IM, Roman AL, Mişu CM. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol*. 2018;59(2):455-467. .
98. Miko E, Meggyes M, Bogar B, Schmitz N, Barakonyi A, Varnagy A, Farkas B, Tamas P, Bodis J, Szekeres-Bartho J, Illes Z, Szereday L. Involvement of Galectin-9/TIM-3 pathway in the systemic inflammatory response in early-onset preeclampsia. *PLoS One*. 2013 Aug 2;8(8):e71811. doi
99. Miko E, Meggyes M, Doba K, Barakonyi A, Szereday L. Immune Checkpoint Molecules in Reproductive Immunology. *Front Immunol*. 2019 18;10:846. doi: 10.3389/fimmu.2019.00846
100. Miller D., Motomura K., Garcia-Flores V., Romero R., Gomez-Lopez N. Innate lymphoid cells in the maternal and fetal compartments. *Frontiers in Immunology*. 2018;9, article 2396 doi: 10.3389/fimmu.2018.02396.
101. Mittelberger, J., Seefried, M., Franitza, M., Garrido, F., Ditsch, N., Jeschke, U., & Dannecker, C. (2022). The Role of the Immune Checkpoint Molecules PD-1/PD-L1 and TIM-3/Gal-9 in the Pathogenesis of Preeclampsia-A Narrative Review. *Medicina* (Kaunas, Lithuania), 58(2), 157. <https://doi.org/10.3390/medicina58020157>
102. Mizuno R, Sugiura D, Shimizu K, Maruhashi T, Watada M, Okazaki IM, Okazaki T. PD-1 Primarily Targets TCR Signal in the Inhibition of Functional T Cell Activation. *Front Immunol*. 2019 Mar 29;10:630. doi: 10.3389/fimmu.2019.00630.
103. Mobini M., Mortazavi M., Nadi S., Zare-Bidaki M., Pourtalebi S., Arababadi M.K. Significant roles played by interleukin-10 in outcome of pregnancy. *Iran J Basic Med Sci*. 2016; 19(2):119-124.
104. Moffett A, Chazara O, Colucci F. Maternal allo-recognition of the fetus. *Fertil Steril*. 2017 Jun;107(6):1269-1272. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.05.001.
105. Mor, G., Aldo, P. and Alvero, A. B., The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nat. Rev. Immunol*. 2017. 17: 469–482.
106. Morelli S, Mandal M, Goldsmith LT, Kashani BN, Ponzio NM. The maternal immune system during pregnancy and its influence on fetal development. *Research and Reports in Biology*. 2015;6:171-189 <https://doi.org/10.2147/RRB.S80652> Robertson S.A 2020
107. Morita K, Tsuda S, Kobayashi E, Hamana H, Tsuda K, Shima T, et al. Analysis of TCR repertoire and PD-1 expression in decidual and peripheral CD8(+) T cells reveals distinct immune mechanisms in miscarriage and preeclampsia. *Front Immunol*. (2020) 11:1082. doi: 10.3389/fimmu.2020.01082
108. Motz GT, Santoro SP, Wang LP, Garrabrant T, Lastra RR, Hagemann IS, et al. Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors. *Nat Med* (2014) 20:607–15. 10.1038/nm.3541

109. Mumm J.B., Chan I.H., LaFace D., Truong H., McClanahan T., Gorman D.M., Oft M. IL-10 directly activates and expands tumor-resident CD8(+) T cells without de novo infiltration from secondary lymphoid organs. *Cancer Research*. 2012; 72(14): 3570–3581. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0721.
110. Myatt L, Redman CW, Staff AC, Hansson S, Wilson ML, Laivuori H, Poston L and Roberts JM; Global Pregnancy CoLaboratory: Strategy for standardization of preeclampsia research study design. *Hypertension*. 63:1293–1301. 2014
111. Nair RR, Verma P, Singh K. Immune-endocrine crosstalk during pregnancy. *Gen Comp Endocrinol*. 2017 Feb 1;242:18-23. doi: 10.1016/j.ygcen.2016.03.003. Epub 2017 Mar 7. PMID: 26965955.
112. Nakashima, A.; Ito, M.; Yoneda, S.; Shiozaki, A.; Hidaka, T.; Saito, S. Circulating and decidual Th17 cell levels in healthy pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol*. 2010, 63, 104–109.
113. Nam JH, Lee JH, Choi SY, et al. Functional Ambivalence of Dendritic Cells: Tolerogenicity and Immunogenicity. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9):4430. Published 2021 Apr 23. doi:10.3390/ijms22094430
114. Nancy P, Tagliani E, Tay CS, Asp P, Levy DE, Erlebacher A. Chemokine gene silencing in decidual stromal cells limits T cell access to the maternal-fetal interface. *Science*. 2012;336:1317–1321.
115. Newell L.F., Holtan S.G., Yates J.E., Pereira L., Tyner J.W., Burd I., Bagby G.C. PlGF enhances TLR-dependent inflammatory responses in human mononuclear phagocytes. *Am. J. Reprod. Immunol*. 2017;78:e12709. doi:10.1111/aji.12709.
116. Oh H, Yu C, Golestaneh N, et al. STAT3 protein promotes T-cell survival and inhibits interleukin-2 production through up-regulation of Class O Forkhead transcription factors. *J Biol Chem*. 2011; 286(35):30888-97. doi: 10.1074/jbc.M111.253500.
117. Ohkuchi A, Saito S, Yamamoto T, Minakami H, Masuyama H, Kumasawa K, Yoshimatsu J, Nagamatsu T, Dietl A, Grill S, Hund M. Short-term prediction of preeclampsia using the sFlt-1/PlGF ratio: a subanalysis of pregnant Japanese women from the PROGNOSIS Asia study. *Hypertens Res*. 2021 Jul;44(7):813-821.
118. Okoye IS, Houghton M, Tyrrell L, Barakat K, Elahi S. Coinhibitory Receptor Expression and Immune Checkpoint Blockade: Maintaining a Balance in CD8+ T Cell Responses to Chronic Viral Infections and Cancer. *Front Immunol*. 2017;8:1215. Published 2017 Sep 29. doi:10.3389/fimmu.2017.01215
119. Pang B, Shin DH, Park KS, Huh YJ, Woo J, Zhang YH, Kang TM, Lee KY, Kim SJ. Differential pathways for calcium influx activated by concanavalin A and CD3 stimulation in Jurkat T cells. *Pflugers Arch*. 2012 Feb;463(2):309-18. doi: 10.1007/s00424-011-1039-x.

120. Paolino, M., Koglgruber, R., Cronin, S.J.F. et al. RANK links thymic regulatory T cells to fetal loss and gestational diabetes in pregnancy. *Nature* 589, 442–447 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03071-0>
121. Papúchová H, Meissner TB, Li Q, Strominger JL, Tilburgs T. The Dual Role of HLA-C in Tolerance and Immunity at the Maternal-Fetal Interface. *Front Immunol.* 2019;10:2730. Published 2019 Dec 9. doi:10.3389/fimmu.2019.02730
122. Park J, Chen H, Winer J, et al. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 25646-25654.
123. Peck, A.; Mellins, E.D. Plasticity of T-cell phenotype and function: The T helper type 17 example. *Immunology* 2010, 129, 147–153.
124. Petroff MG. Review: Fetal antigens--identity, origins, and influences on the maternal immune system. *Placenta.* 2011;32 Suppl 2(Suppl 2):S176-S181. doi:10.1016/j.placenta.2010.12.014
125. Phipps E, Prasanna D, Brima W, Jim B. Preeclampsia: Updates in Pathogenesis, Definitions, and Guidelines. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016;11(6):1102-1113. doi:10.2215/CJN.12081115
126. Piper K.P. , McLarnon A., Moss P.A., Functional HY-Specific CD8+ T Cells Are Found in a High Proportion of Women Following Pregnancy with a Male Fetus, *Biology of Reproduction*, Volume 76, Issue 1, 1 January 2007, Pages 96–101, <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.055426>
127. Polanczyk MJ, Hopke C, Vandembark AA, Offner H. Estrogen-mediated immunomodulation involves reduced activation of effector T cells, potentiation of Treg cells, and enhanced expression of the PD-1 costimulatory pathway. *J Neurosci Res* 2006; 84: 370–378.
128. Polese, B.; Gridelet, V.; Araklioti, E.; Martens, H.; D’Hauterive, S.P.; Geenen, V. The endocrine milieu and CD4 T-lymphocyte polarization during pregnancy. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 2014, 5, 106.
129. Powell RM, Lissauer D, Tamblyn J, Beggs A, Cox P, Moss P, et al. Decidual T cells exhibit a highly differentiated phenotype and demonstrate potential fetal specificity and a strong transcriptional response to IFN. *J Immunol.* (2017) 199:3406–17. doi: 10.4049/jimmunol.1700114
130. Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today.* (1997) 18:478–82. doi: 10.1016/S0167-5699(97)01127-4
131. Ratsep M.T., Felker A.M., Kay V.R., Tolusso L., Hofmann A.P., Croy B.A. Uterine natural killer cells: Supervisors of vasculature construction in early decidua basalis. *Reproduction.* 2015;149:R91–R102. doi:10.1530/REP-14-0271.
132. Raymond D, Peterson E A critical review of early-onset and late-onset preeclampsia. *Obstet Gynecol Surv.* 2011 Aug; 66(8):497-506.

133. Riella LV, Paterson AM, Sharpe AH, Chandraker A. Role of the PD-1 pathway in the immune response. *Am J Transplant.* 2012;12(10):2575-2587. doi:10.1111/j.1600-6143.2012.04224.x
134. Ristich V, Liang S, Zhang W, Wu J, Horuzsko A. Tolerization of dendritic cells by HLA-G. *Eur J Immunol.* (2005) 35:1133–42. 10.1002/eji.200425741
135. Rizov M., Andreeva P., Dimova I. Molecular regulation and role of angiogenesis in reproduction. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2017; 56(2): 127-132. DOI: 10.1016/j.tjog.2016.06.019.
136. Robertson S.A., Petroff Joan M.J., Hunt S. 41 - Immunology of Pregnancy in book Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition) 2015, Pages 1835-1874
137. Robertson SA, Care AS, Moldenhauer LM. Regulatory T Cells in Embryo Implantation and the Immune Response to Pregnancy. *J Clin Invest* (2018) 128:4224–35. 10.1172/JCI122182
138. Rowe JH, Ertelt JM, Xin L, Way SS. Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen. *Nature.* (2012) 490:102–6. 10.1038/nature11462
139. Rubtsov YP, Rudensky AY. TGFbeta signalling in control of T cell-mediated self-reactivity. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:443–453.
140. Saito S, Sakai M. Th1/Th2 balance in preeclampsia. *J Reproduct Immunol.* (2003) 59:161–73. doi: 10.1016/S0165-0378(03)00045-7
141. Saito, S.; Nakashima, A.; Shima, T.; Ito, M. Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010, 63, 601–610.
142. Salvany-Celades M, van der Zwan A, Benner M, Setrajcic-Dragos V, Bougleux Gomes HA, Iyer V, Norwitz ER, Strominger JL, Tilburgs T. Three Types of Functional Regulatory T Cells Control T Cell Responses at the Human Maternal-Fetal Interface. *Cell Rep.* 2019 May 28;27(9):2537-2547.e5.
143. Samstein RM, Josefowicz SZ, Arvey A, Treuting PM, Rudensky AY. Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. *Cell.* 2012;150(1):29-38.
144. Santner-Nanan B. et al. Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. *J Immunol* 183, 7023–7030 (2009).
145. Sasaki Y, Darmochwal-Kolarz D, Suzuki D, Sakai M, Ito M, Shima T, et al. . Proportion of Peripheral Blood and Decidual Cd4(+) CD25(bright) Regulatory T Cells in Pre-Eclampsia. *Clin Exp Immunol* (2007) 149:139–45. 10.1111/j.1365-2249.2007.03397.x
146. Sasaki Y. Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod.* (2004) 10:347–53. doi: 10.1093/molehr/gah044

147. Sawano A., Iwai S., Sakurai Y., Ito M., Shitara K., Nakahata T., Shibuya M. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood*. 2001;97:785–791. doi: 10.1182/blood.V97.3.785
148. Schietinger A, Greenberg PD. Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends Immunol*. 2014;35:51–60.
149. Schnell, A., Bod, L., Madi, A. et al. The yin and yang of co-inhibitory receptors: toward anti-tumor immunity without autoimmunity. *Cell Res* 30, 285–299 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0277-x>
150. Selvaraj S.K., Giri R.K., Perelman N., Johnson C., Malik P., Kalra V.K. Mechanism of monocyte activation and expression of proinflammatory cytochemokines by placenta growth factor. *Blood*. 2003;102:1515–1524. doi:10.1182/blood-2002-11-3423.
151. Sereshki N, Andalib A, Ghahiri A, et al. The expression of human leukocyte antigen by human ejaculated spermatozoa. *Mol Genet Genomic Med*. 2019;7(12):e1005. doi:10.1002/mgg3.1005
152. Shakhbasova N.A. EVALUATION OF PREGNANCY ASSOCIATED HYPERTENSIVE STATES. *Russian Journal of Cardiology*. 2014;(5):97-100. (In Russ.) <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2014-5-97-100>
153. Sharma S. Natural killer cells and regulatory T cells in early pregnancy loss. *Int J Dev Biol*. 2014;58(2-4):219-229. doi:10.1387/ijdb.140109ss
154. Shin J, Yoon I, Kim J, Kim B, Park C. Vascular endothelial growth factor-induced chemotaxis and IL-10 from T cells. *Cell Immunol*. 2009;256(1-2):72-8. doi: 10.1016/j.cellimm.2009.01.006.
155. Shin, J. Y., Yoon, I. H., Lim, J. H., Shin, J. S., Nam, H. Y., Kim, Y. H., Cho, H. S., Hong, S. H., Kim, J. S., Lee, W. W., & Park, C. G. CD4+VEGFR1(HIGH) T cell as a novel Treg subset regulates inflammatory bowel disease in lymphopenic mice. *Cellular & molecular immunology*, 12(5), (2015). 592–603. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.71>
156. Sia D, Alsinet C, Newell P, Villanueva A. VEGF signaling in cancer treatment. *Curr Pharm Des* (2014) 20:2834–42. 10.2174/13816128113199990590
157. Simons M., Gordon E., Claesson-Welsh L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. 2016;17:611–625. doi:10.1038/nrm.2016.87
158. Slutsky R, Romero R, Xu Y, et al. Exhausted and Senescent T Cells at the Maternal-Fetal Interface in Preterm and Term Labor. *J Immunol Res*. 2019;2019:3128010. Published 2019 May 23. doi:10.1155/2019/3128010
159. Smith L.K., Boukhaled G.M., Condotta S.A., Interleukin-10 directly inhibits CD8+ T cell function by enhancing N-glycan branching to decrease antigen sensitivity. *Immunity*. 2018; 48(2): 299-312.e5

160. Sojka DK, Yang L, Yokoyama WM. Uterine Natural Killer Cells. *Front Immunol.* 2019; 10:960. Published 2019 May 1 doi:10.3389/ fimmu.2019.00960
161. Song MY, Park SH, Nam HJ, Choi DH, Sung YC. Enhancement of vaccine-induced primary and memory CD8(+) T-cell responses by soluble PD-1. *J Immunother.* 2011;34:297–306.
162. Spierings E. Minor histocompatibility antigens: past, present, and future. *Tissue Antigens*, 2014, Vol. 84, no. 4, pp. 374-360.
163. Stuttfeld E, Ballmer-Hofer K. Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB Life.* 2009; 61(9):915-22. doi: 10.1002/iub.234.
164. Taglauer ES, Adams Waldorf KM, Petroff MG. The hidden maternal-fetal interface: events involving the lymphoid organs in maternal-fetal tolerance. *Int J Dev Biol.* 2010;54(2-3):421-430. doi:10.1387/ijdb.082800et
165. Taglauer ES, Trikhacheva AS, Slusser JG, Petroff MG. Expression and function of PDCD1 at the human maternal-fetal interface. *Biol Reprod.* (2008) 79:562–9. doi: 10.1095/biolreprod.107.066324
166. Tamura, R., Tanaka, T., Akasaki, Y. et al. The role of vascular endothelial growth factor in the hypoxic and immunosuppressive tumor microenvironment: perspectives for therapeutic implications. *Med Oncol* 37, 2 (2020). <https://doi.org/10.1007/s12032-019-1329-2>
167. Tayade C., Hilchie D., He H., Fang Y., Moons L., Carmeliet P., Foster R.A., Croy B.A. Genetic deletion of placenta growth factor in mice alters uterine NK cells. *J. Immunol.* 2007;178:4267–4275. doi 10.4049/jimmunol. 178.7.4267.
168. Tchaikovski V, Fellbrich G, Waltenberger J. The molecular basis of VEGFR-1 signal transduction pathways in primary human monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Feb;28(2):322-8. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.158022.
169. Than NG, Hahn S, Rossi SW, Szekeres-Bartho J. Editorial: Fetal-Maternal Immune Interactions in Pregnancy. *Front Immunol.* 2019;10:2729. Published 2019 Nov 27. doi:10.3389/fimmu.2019.02729
170. Tian M, Zhang Y, Liu Z, Sun G, Mor G, Liao A. The PD-1/PD-L1 inhibitory pathway is altered in pre-eclampsia and regulates T cell responses in pre-eclamptic rats. *Sci Rep.* 2016;6:27683.)Published 2016 Jun 9. doi:10.1038/srep27683
171. Tilburgs T, Claas FH, Scherjon SA. Elsevier Trophoblast Research Award Lecture: unique properties of decidual T cells and their role in immune regulation during human pregnancy. *Placenta.* 2010;31(Suppl):S82–S86.
172. Tilburgs T, Crespo AC, van der Zwan A, Rybalov B, Raj T, Stranger B, et al. . Human HLA-G+ extravillous trophoblasts: Immune-activating cells that interact with decidual leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2015) 112:7219–24. 10.1073/pnas.1507977112

173. Tilburgs T, Scherjon SA, van der Mast BJ, Haasnoot GW, Versteeg VD, Voort-Maarschalk M, et al. . Fetal-Maternal HLA-C Mismatch Is Associated With Decidual T Cell Activation and Induction of Functional T Regulatory Cells. *J Reprod Immunol* (2009) 82:148–57. 10.1016/j.jri.2009.05.003
174. Tilburgs T, Schonkeren D, Eikmans M, Nagtzaam NM, Datema G, Swings GM, Prins F, van Lith JM, van der Mast BJ, Roelen DL, Scherjon SA, Claas FH. Human decidual tissue contains differentiated CD8+ effector-memory T cells with unique properties. *J Immunol*. 2010;185:4470–4477.
175. Tilburgs T, Strominger JL. CD8+ effector T cells at the fetal-maternal interface, balancing fetal tolerance and antiviral immunity. *Am J Reprod Immunol*. 2013;69(4):395-407. doi:10.1111/aji.12094
176. Toldi G., Rigby J., Orbón C., Tamóssy Z., Bajnok A., Shima T., Saito S., Molvarec A. Prevalence of regulatory T-cell subtypes in preeclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol*. 2015;74:110–115. doi: 10.1111/aji.12380
177. Tong M, Abrahams VM. Immunology of the Placenta. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2020 Mar;47(1):49-63. doi: 10.1016/j.ogc.2019.10.006. PMID: 32008671.
178. Tripathi S. & Guleria I. Role of PD1/PDL1 pathway, and TH17 and treg cells in maternal tolerance to the fetus. *Biomed J* 38, 25–31 (2015)
179. Tsiakkas A, Duvdevani N, Wright A, Wright D, Nicolaides KH. Serum placental growth factor in the three trimesters of pregnancy: effects of maternal characteristics and medical history. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015 May;45(5):591-8. doi: 10.1002/uog.14811. Epub 2015 Apr 1. PMID: 25653039.
180. Tudisco L., Orland A., Tarallo V., De Falco S. Hypoxia activates placental growth factor expression in lymphatic endothelial cells. *Oncotarget*. 2017; 8: 32873-32883. Retrieved from <https://www.oncotarget.com/article/15861/text/>
181. Valencia-Ortega J, Saucedo R, Peca-Cano MI, Hernández-Valencia M, Cruz-Durón JG. Immune tolerance at the maternal-placental interface in healthy pregnancy and pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol Res*. 2020 Jul;46(7):1067-1076. doi: 10.1111/jog.14309. Epub 2020 May 19. PMID: 32428989.
182. Van der Zwan A, Bi K, Norwitz ER, Crespo B C, Claas FHJ, Strominger JL, et al. Mixed signature of activation and dysfunction allows human decidual CD8(+) T cells to provide both tolerance and immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2018) 115:385–90. doi: 10.1073/pnas.1713957115
183. Van Halteren AG, Jankowska-Gan E, Joosten A, Blokland E, Pool J, Brand A, et al. Naturally acquired tolerance and sensitization to minor histocompatibility antigens in healthy family members. *Blood*. 2009;114:2263–72
184. Van Voorhis W, Valinsky J, Hoffman E, et al. Relative efficacy of human monocytes and dendritic cells as accessory cells for T cell replication. *J Exp Med*. 1983;158(1):174-91.

185. Veras E, Kurman RJ, Wang TL, Shih IM. PD-L1 expression in human placentas and gestational trophoblastic diseases. *Int J Gynecol Pathol.* (2017) 36:146–53. doi: 10.1097/pgp.0000000000000305
186. Verdijk RM, Kloosterman A, Pool J, van de Keur M, Naipal AMIH, van Halteren AGS, Brand A, Mutis T, Goulmy E. Pregnancy induces minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T cells: implications for stem cell transplantation and immunotherapy. *Blood.* 2004;103:1961–1964.
187. Verdon D.J., Mulazzani M., Jenkins M.R. Cellular and Molecular Mechanisms of CD8+ T Cell Differentiation, Dysfunction and Exhaustion. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(19):7357. doi:10.3390/ijms 21197357
188. Voron T, Colussi O, Marcheteau E, et al. VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors. *J Exp Med.* 2015; 212(2):139-48. doi: 10.1084/jem.20140559.
189. Voron T., Marcheteau E., Pernot S., Colussi O., Tartour E., Taieb J., Terme M. Control of the immune response by pro-angiogenic factors. *Front Oncol.* 2014; 4: 70. DOI: 10.3389/fonc.2014.00070.
190. Waki K, Yamada T, Yoshiyama K, et al. PD-1 expression on peripheral blood T-cell subsets correlates with prognosis in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.* 2014;105(10):1229-1235. doi:10.1111/cas.12502
191. Walker LS, Sansom DM. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat Rev Immunol.* 2011 Nov 25;11(12):852-63. doi: 10.1038/nri3108.
192. Wang S-C, Li Y-H, Piao H-L, Hong X-W, Zhang D, Xu Y-Y, et al. . PD-1 and Tim-3 pathways are associated with regulatory CD8+ T-cell function in decidua and maintenance of normal pregnancy. *Cell Death Dis.* (2015) 6:e1738. 10.1038/cddis.2015.112
193. Wang S, Chen C, Sun F, Li M, Du M, Li X, Zhang Y. Involvement of the Tim-3 Pathway in the Pathogenesis of Pre-Eclampsia. *Reprod Sci.* 2021 Dec;28(12):3331-3340. doi: 10.1007/s43032-021-00675-3.
194. Wang S, Sun F, Li M, et al. The appropriate frequency and function of decidual Tim-3+CTLA-4+CD8+ T cells are important in maintaining normal pregnancy. *Cell Death Dis.* 2019;10(6):407. Published 2019 May 28. doi:10.1038/s41419-019-1642-x
195. Wang S, Zhu X, Xu Y, Zhang D, Li Y, Tao Y, Piao H, Li D, Du M. Programmed cell death-1 (PD-1) and T-cell immunoglobulin mucin-3 (Tim-3) regulate CD4+ T cells to induce Type 2 helper T cell (Th2) bias at the maternal-fetal interface. *Hum Reprod.* 2016 Apr;31(4):700-11. doi: 10.1093/humrep/dew019.
196. Wang W, Sung N, Gilman-Sachs A, Kwak-Kim J. T Helper (Th) Cell Profiles in Pregnancy and Recurrent Pregnancy Losses: Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tfh Cells. *Front Immunol.* 2020;11:2025. Published 2020 Aug 18. doi:10.3389/fimmu.2020.02025

197. Wang WJ, Salazar Garcia MD, Deutsch G, Sung N, Yang X, He Q, Jubiz G, Bilal M, Dambaeva S, Gilman-Sachs A, Beaman K, Kwak-Kim J. PD-1 and PD-L1 expression on T-cell subsets in women with unexplained recurrent pregnancy losses. *Am J Reprod Immunol*. 2020 May;83(5):e13230. doi: 10.1111/aji.13230.
198. Wegmann, T.G.; Lin, H.; Guilbert, L.; Mosmann, T.R. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: Is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol. Today* 1993, 14, 353–356.
199. Wei R, Lai N, Zhao L, Zhang Z, Zhu X, Guo Q, Chu C, Fu X, Li X. Dendritic cells in pregnancy and pregnancy-associated diseases. *Biomed Pharmacother*. 2021 Jan;133:110921. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110921
200. Wei SC, Duffy CR, Allison JP. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discov*. 2018 Sep;8(9):1069-1086. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0367
201. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(8):486-499. doi:10.1038/nri3862
202. Wiesel M, Walton S, Richter K, Oxenius A. Virus-specific CD8 T cells: activation, differentiation and memory formation. *APMIS*. 2009 May;117(5-6):356-81. doi: 10.1111/j.1600-0463.2009.02459.x
203. Xu X, Zhou Y, Wei H. Roles of HLA-G in the Maternal-Fetal Immune Microenvironment. *Front Immunol*. 2020 Oct 22;11:592010. doi: 10.3389/fimmu.2020.592010.
204. Xu Y.Y., Wang S.C., Li D.J., Du M.R. Co-Signaling Molecules in Maternal-Fetal Immunity. *Trends Mol. Med*. 2017;23:46–58. doi:10.1016/j.molmed.2016.11.001.
205. Xu YY, Wang SC, Lin YK, Li DJ, DU MR. Tim-3 and PD-1 regulate CD8+ T cell function to maintain early pregnancy in mice. *J Reprod Dev*. 2017;63(3):289-294. doi:10.1262/jrd.2016-177
206. Yang J, Yan J, Liu B. Targeting VEGF/VEGFR to Modulate Antitumor Immunity *Front Immunol*. 2018; 9: 978. doi: 10.3389/fimmu.2018.00978
207. Zhang YH, Sun HX. Immune checkpoint molecules in pregnancy: Focus on regulatory T-cells. *Eur J Immunol*. 2020 Feb;50(2):160-169
208. Zhao J, Lei Z, Liu Y, Li B, Zhang L, Fang H, Song C, Wang X, Zhang GM, Feng ZH, Huang B. Human pregnancy up-regulates Tim-3 in innate immune cells for systemic immunity. *J Immunol*. 2009 May 15;182(10):6618-24. doi: 10.4049/jimmunol.0803876.
209. Zhao X, Jiang Y, Wang L, Li Z, Li Q, Feng X. Advances in Understanding the Immune Imbalance between T-Lymphocyte Subsets and NK Cells in Recurrent Spontaneous Abortion. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2018;78(7):677-683. doi:10.1055/a-0634-1813

210. Zhu X-Y, Zhou Y-H, Wang M-Y, Jin L-P, Yuan M-M, Li D-J. Blockade of CD86 signaling facilitates a Th2 bias at the maternal-fetal interface and expands peripheral CD4+CD25+ regulatory T cells to rescue abortion-prone fetuses1. *Biol Reprod.* (2005) 72:338–45. 10.1095/biolreprod.104.034108
211. Ziogas AC, Gavalas NG, Tsiatas M, Tsitsilonis O, Politi E, Terpos E, et al. VEGF directly suppresses activation of T cells from ovarian cancer patients and healthy individuals via VEGF receptor Type 2. *Int J Cancer* (2012) 130:857–64. 10.1002/ijc.26094
212. Zych M, Roszczyk A, Kniotek M, Dąbrowski F, Zagożdżon R. Differences in Immune Checkpoints Expression (TIM-3 and PD-1) on T Cells in Women with Recurrent Miscarriages-Preliminary Studies. *J Clin Med.* 2021;10(18):4182. Published 2021 Sep 16. doi:10.3390/jcm10184182