

На правах рукописи



Сметаненко Екатерина Александровна

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

3.2.7. Аллергология и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Новосибирск 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении
«Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор, член-корреспондент РАН

Черных Елена Рэмовна

Официальные оппоненты:

Савченко Андрей Анатольевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярно-клеточной физиологии и патологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «КНЦ СО РАН» обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера» (г. Красноярск)

Повешенко Ольга Владимировна, доктор медицинских наук, доцент, заведующая лабораторией клеточных технологий «Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии», филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии генетики» Сибирского отделения Российской академии наук» (г. Новосибирск).

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «Ив НИИ Мид им. В.Н. Городкова» Минздрава России) г. Иваново.

Защита состоится «___» _____ 2023 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.001.XX (24.1.184.01) НИИФКИ по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИФКИи на сайте <http://niikim.ru/ru/диссовет/объявления-диссовета>

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук

Облеухова И.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Подавление иммунного ответа в условиях неоангиогенеза является установленным фактом и свидетельствует об иммуномодулирующей активности ангиогенных факторов. Наиболее убедительно такая активность была продемонстрирована для фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) при опухолевом росте [Bourhis M., 2021]. Выяснилось, что обеспечивающий васкуляризацию опухоли VEGF обладает широким спектром иммуносупрессивной активности и подавляет противоопухолевый иммунный ответ [Lapeyre-Prost A., 2016]. При беременности формирование новых сосудов также сопряжено с подавлением иммунного ответа (к антигенам плода) [Abu-Raya B., 2020], однако в этом случае ангиогенез связан с возрастанием другого белка семейства VEGF – плацентарного ростового фактора (PlGF), который наряду со стимуляцией роста сосудов играет важную роль в инвазии трофобласта и ремоделировании спиральных артерий [De Falco S 2012, Rizov M. 2017]. Концентрация PlGF у небеременных находится на низких (пороговых) уровнях, однако резко возрастает начиная с 11-ой недели нормальной беременности и достигает пика к 30-32 неделям гестации [Tsiakkas A., 2015]. Причем снижение PlGF является предиктором развития грозного акушерского осложнения - преэклампсии (ПЭ) [Chau K., 2017, Lecarpentier Й., 2016, Ohkuchi A., 2021], которая позиционируется в качестве основной причины материнской и детской смертности [Duley L., 2009] и связана со срывом иммунологической толерантности [Valencia-Ortega J., 2020].

Сопряженность между низким уровнем PlGF и нарушением толерантности позволяет предполагать, что PlGF так же, как и VEGF обладает иммунорегуляторной активностью и может участвовать в реорганизации иммунной системы при беременности. Однако иммуномодулирующие свойства PlGF, особенно в отношении Т-клеток, остаются практически не исследованными [Dewerchin M., 2012, Albonici L., 2020]. Это отчасти связано с тем, что ингибирующий эффект VEGF на Т-клетки опосредуется через VEGFR-2 [Gavalas N., 2012, Yang J., 2018], тогда как PlGF взаимодействует исключительно с VEGFR-1, который длительное время рассматривался как рецептор ловушка [De Falco S., 2012]. Кроме того, отсутствует ясность в отношении экспрессии Т-клетками VEGFR-1. Появившиеся сведения о функциональности VEGFR-1 на клетках моноцитарно/макрофагального ряда [Dikov M., 2005, Incio J., 2016], а также выявленная экспрессия VEGFR-1 на отдельных субпопуляциях Т-клеток [Shin J., 2015] позволяют предположить, что PlGF способен модулировать функции Т-клеток и может быть причастен к изменению функций иммунной системы при гестации.

Беременность остается лучшей моделью для исследования естественных механизмов иммунной толерантности, поскольку вынашивание полуаллогенного плода требует подавления иммунного ответа матери на фетальные антигены при сохранении способности распознавать и элиминировать инфекционные патогены [Anarck P., 2013]. Начало этим исследованиям было положено Р. В. Medawar еще в 1950-м годах. Тем не менее, и сегодня механизмы «уклонения» фетального аллотрансплантата от разрушительного действия иммунной системы матери, далеки от полного осмысления.

Формирование толерантности к фетальным антигенам требует существенной перестройки иммунной системы матери, которая получила название иммунной адаптации и осуществляется с вовлечением различных механизмов - изменения баланса субпопуляций Т-хелперов (Th) в сторону снижения Th1 и Th17 и возрастания

Th2; генерации Т-регуляторных клеток (Treg); индукции анергии и апоптоза цитотоксических CD8+ Т-клеток [Abu-Raya B., 2020]. Важную роль в реализации этих механизмов играют ингибиторные «чек-поинт» молекулы, которые объединяют рецепторы и лиганды, проводящие сигналы негативной регуляции [Meggyes M., 2019, Schnell A., 2020]. Наиболее изученными ингибиторными рецепторами на Т-лимфоцитах являются PD-1, CTLA-4 и Tim-3. Активация этих рецепторов на эффекторных Т-клетках приводит к снижению пролиферации, продукции Th1 и Th17 цитокинов, цитотоксической активности и выживаемости лимфоцитов, а на Treg клетках – к экспансии и усилению супрессорной активности [Miko E., 2019, Zhang Y., 2020]. Повышенная экспрессия и особенно ко-экспрессия ингибиторных рецепторов отражает также дисфункциональное состояние Т-лимфоцитов (Т-клеточное истощение), которое является еще один механизм ограничения активности эффекторных клеток [Slutsky R., 2019, Verdon D., 2020].

Недавно было показано, что децидуальные Т-клетки на границе мать-плод характеризуются повышенной экспрессией и коэкспрессией CTLA-4, PD-1 и Tim-3 [Miko E., 2019], что может быть связано со стимулирующим влиянием трофобласта (молекул HLA-C и HLA-G) на экспрессию ингибиторных рецепторов [Parúchová H., 2019, Xu X., 2020]. Тем не менее, экспрессия ингибиторных рецепторов на циркулирующих Т-клетках остается мало изученной. Усиление экспрессии этих рецепторов может индуцироваться гормонами [Binder N., 2016] и иммуносупрессивными цитокинами [Dutta S., 2017]. Кроме того, способность стимулировать экспрессию ингибиторных рецепторов была выявлена для VEGF [Bourhis M., 2021, Voron T., 2014]. В то же время вопрос о причастности PlGF к регуляции указанных рецепторов остается открытым.

Цель исследования : изучить иммуномодулирующую активность PlGF на основе исследования влияния фактора на функции Т-клеток и экспрессию ингибиторных рецепторов *in vitro* и оценки экспрессии ингибиторных молекул на Т-клетках беременных с высоким (неосложненная беременность) и низким (преэклампсия) уровнем сывороточного PlGF.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **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 сигнального пути 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 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 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, достаточной выборкой исследования и применением современных иммунологических методов и адекватных методов статистической обработки. 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 30 июня 2022 г на семинаре клинического отдела ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии. Автор лично участвовал в разработке дизайна исследования, формировании критериев включения и исключения, рекрутировании пациенток, проведении иммунологических исследований, статистической обработке результатов и интерпретация экспериментальных данных..

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 НИИФКИ, а также родильного отделения ГБУЗ НСО «ГКБ №1» при поддержке гранта РФФИ 18-44-540005.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, включая 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов диссертационных работ, в том числе одна статья в журнале, индексируемом в базе Web of Science (Q1).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования.

Характеристика доноров крови 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 фактора (беременные с преэклампсией). Критериями отбора в первую группу являлись наличие беременности со сроком гестации более 20 недель, возраст от 18 до 45 лет, одноплодная 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 ПЭ - повышенного систолического артериального давления выше 140 мм рт. ст. и/или диастолического артериального давления выше 90 мм рт. ст. и протеинурии (более 0,3 г/л в суточной моче). Контрольную группу (с минимальным уровнем PlGF) составили сопоставимые по возрасту фертильные небеременные (т.е. женщины, имеющие как минимум одни роды в анамнезе). Рекрутирование беременных проводилось из числа женщин, проходивших обследование в родильном доме ГБУЗ НСО ГKB №1. Иммунологическое исследование было одобрено этическим комитетом ГБУЗ НСО ГKB №1 и проводилось после получения письменного информированного добровольного согласия.

Выделение и культивирование клеток. Мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови выделяли стандартно центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколла (Ficoll®400 ; Sigma-Aldrich, USA). МНК культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах 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 гентамином (100 мкг/мл; Genepharm Ltd) при температуре 37°C и 5 % CO₂ в течение 3-5 суток. Для стимуляции клеток использовали моноклональные анти-CD3 антитела (aCD3, 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 aCD3 антителами (ТОО «Медбиоспектр», Москва) в присутствии растворимых анти-CD28 антител (5 µg/ml; Thermo Fisher Scientific).

Оценка пролиферативного ответа. Интенсивность пролиферации оценивали по включению в нуклеопротейидные фракции 3Н-тимидина, вносимого за 18 часов до окончания культивирования в дозе 1 мкКю/лунку, с использованием жидкостного сцинтиляционного счетчика SL-30 (Intertech, Франция). 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 флуоресцентным 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). По завершению культивирования МНК 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 (aVEGFR-1) и анти-VEGFR-2 антител (aVEGFR-2) на супрессорный эффект PlGF. Для этого в культуры МНК, стимулированные a-CD3, добавляли PlGF (5 нг/мл) и культивировали в отсутствие и присутствии нейтрализующих a-VEGFR-1 или a-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.

Оценка экспрессии VEGFR-1 и VEGFR-2. Экспрессию VEGFR-1 и VEGFR-2 на CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках оценивали в культурах свежeweделенных, спонтанно-культивируемых (нестимулированных), a-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).

Оценка продукции IL-10. Продукцию IL-10 оценивали по относительному содержанию IL10⁺ секретирующих клеток в гейтах CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии с использованием anti-CD3 (APC), anti-CD8(FITC); anti-CD4 (PerCP) и anti-IL-10 (PE) антител (BD Biosciences») в 48-часовых культурах МНК, активированных aCD3 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»). Анализ проводили в пробах после накопления не менее 30000 событий в регионе Т-клеток.

Оценка экспрессии ингибиторных рецепторов. Экспрессию ингибиторных рецепторов (PD-1, CTLA-4, Tim-3) на Т-клетках исследовали цитофлуориметрически путем окрашивания клеток анти-CD4(Per), 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 в среднем 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. Апоптоз активированных Т-клеток оценивали цитофлуориметрически. МНК, стимулированные a-CD3 (1 мкг/мл), культивировали в отсутствие или присутствии PlGF (5 нг/мл). Через 48 часов 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.

Статистическую обработку 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 $p < 0,05$

Результаты и обсуждение

Влияние PlGF на пролиферацию Т-клеток.

Исследование влияния PlGF на пролиферацию Т-клеток показало, что добавление фактора в широком диапазоне доз (от 0,1 до 100 нг/мл) в культуры aCD3-стимулированных МНК подавляло пролиферативный ответ. Наибольший супрессорный эффект наблюдался при использовании PlGF в дозе 5 нг/мл (Рис. 1А), которая была выбрана оптимальной для последующих экспериментов. Супрессорный эффект при данной концентрации фактора варьировал от 25 до 76% с медианой 45% (Рис. 1В).

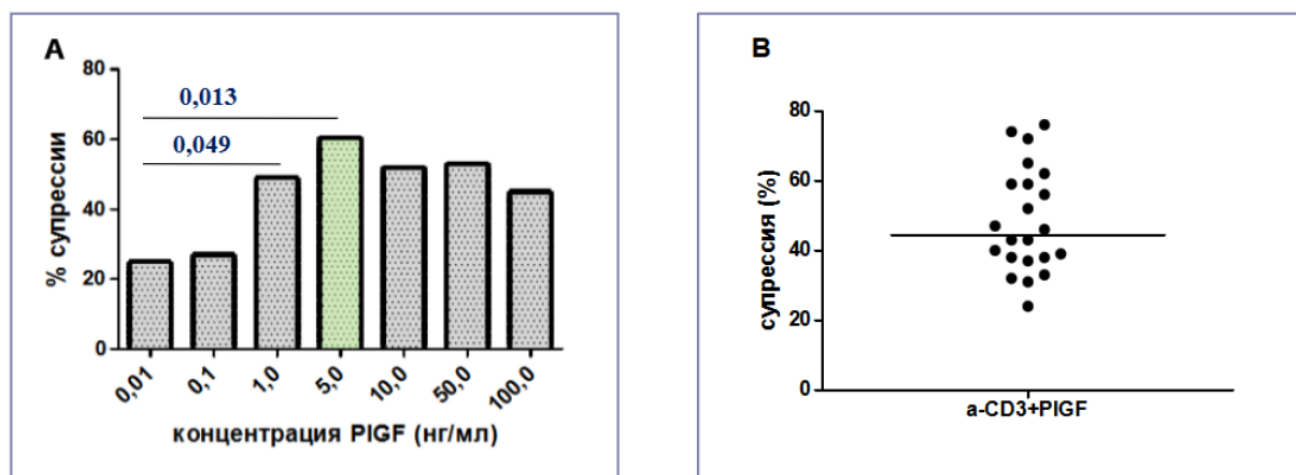


Рисунок 1 - Супрессорный эффект PlGF (5 нг/мл) на пролиферацию Т-клеток в aCD3-стимулированных культурах МНК. А – представлены медианные значения супрессорной активности различных концентраций PlGF в культурах МНК 8 доноров. В – индивидуальные значения и медиана супрессорного эффекта PlGF в дозе 5 нг/мл на пролиферацию aCD3-стимулированных МНК доноров (n=22).

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). В нестимулированных культурах МНК доля пролиферирующих CD4⁺ клеток составляла 0,35 (0,19-0,62)% и возрастала до 71 (62-79)% при стимуляции a-CD3. Медианный уровень пролиферирующих CD8⁺ Т-лимфоцитов в нестимулированных культурах МНК составлял 0,66 (0,28-1,2)%, и в присутствии aCD3 увеличивался до 60 (56-68)%. Добавление PlGF в культурах МНК приводило к достоверному снижению относительного содержания пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ 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

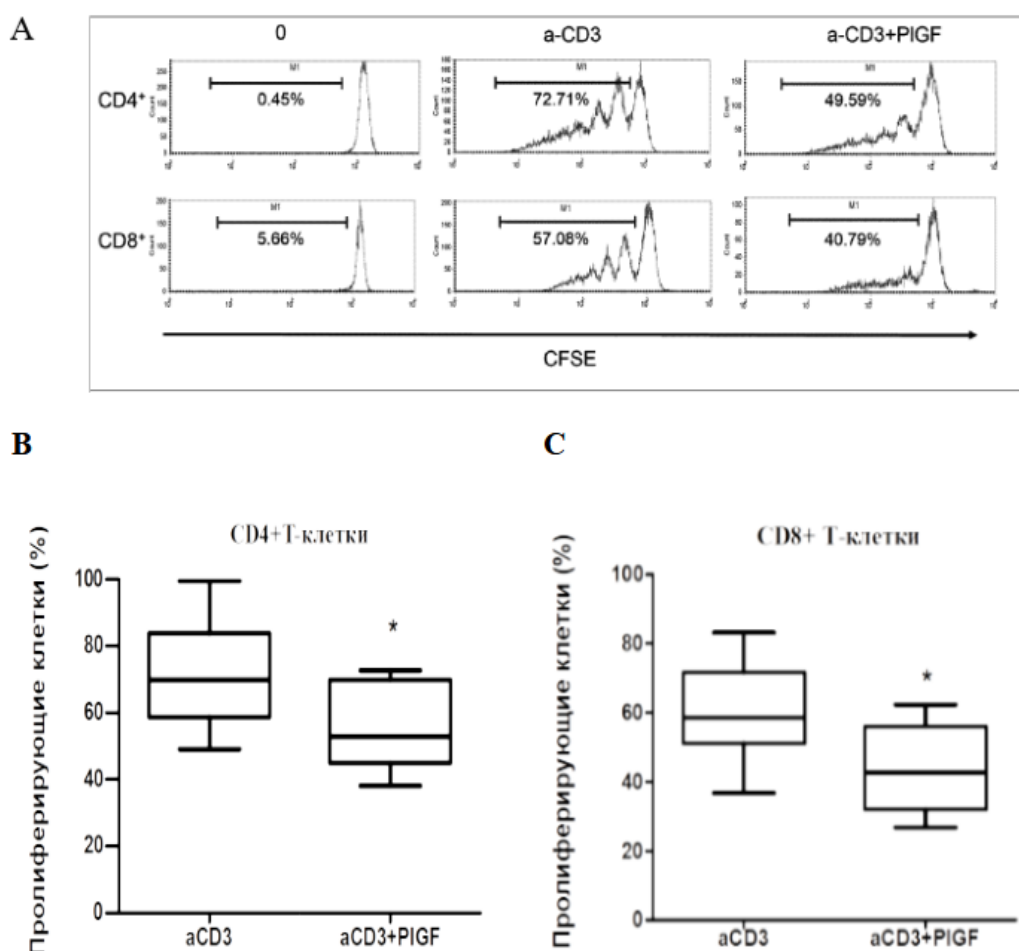


Рисунок 2. Супрессорный эффект PlGF на пролиферацию CD4 и CD8 Т-клеток в культурах aCD3-стимулированных МНК. Пролиферацию оценивали по разведению флюоресцентного красителя CFSE методом проточной цитометрии. Долю пролиферирующих клеток (%) оценивали в гейтах CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов. Данные представлены в виде репрезентативных гистограмм (верхняя панель) и медианы, интерквартильного диапазона и минимальных–максимальных значений ($n=6$, нижняя панель). * - $p < 0,05$ (W-критерий Вилкоксона).

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

Как известно, для эффективной активации растворимыми aCD3 антителами Т-клеткам необходим костимуляторный сигнал, который в культурах МНК осуществляется моноцитами. Чтобы выяснить, является ли эффект PlGF на Т-клетки прямым, или опосредуется моноцитами, в отдельной серии экспериментов ($n=9$) исследовали, как уменьшение моноцитов (после однократного удаления фракции адгезивных к пластику клеток) скажется на супрессорном эффекте PlGF (Табл 1). Видно, что фактор ингибировал пролиферативный ответ как в культурах несепарированных, так и истощенных по адгезивным клеткам МНК.

Таблица 1 – Зависимость супрессорного эффекта PlGF от моноцитов

Тест-культуры	Пролиферативный ответ; имп/мин; Ме (L-UQ)			ИБ PlGF
	0	aCD3 ^{&}	aCD3+PlGF	
МНК(n=9)	516 (335-650)	7250 (6220-11524)	3883 (3431-4883)*	0,67 (0,48-0,76)
МНК с деплечией адгезивных к пластику клеток (n=9)	587 (505-837)	7631 (5210-11000)	5421 (4620-7900)*	0,73 (0,64-0,79)
Сепарированные CD4+ Т-клетки (n=8)	606 (505 -679)	35174 (34465-37176)	23810 (21406-24981)*	0,68 (0,61 - 0,74)

Примечание: [&] - для стимуляции МНК использовали растворимые aCD3, для активации сепарированные CD4+ Т-клеток - иммобилизованные aCD3 и растворимые aCD28 антитела, * - $pW < 0,01$ - достоверность различий в культурах активированных клеток в отсутствие и присутствии PlGF; W-критерий Вилкоксона.

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. Стимуляция сепарированных CD4+ Т-клеток иммобилизованными анти-CD3 антителами в комбинации с растворимыми анти-CD28 антителами индуцировала выраженную пролиферацию Т-лимфоцитов. Ингибирующий эффект PlGF регистрировался во всех восьми тест-культурах, варьировала от 19 до 42%, составляя на уровне медианы 32% (Табл 1).

Таким образом, PlGF в широком диапазоне доз ингибировал пролиферацию Т-клеток, активированных aCD3 через Т-клеточный рецептор. Эффект PlGF являлся прямым, поскольку сохранялся при истощении моноцитов, а также воспроизводится в культурах сепарированных Т-клеток. При этом PlGF в одинаковой степени подавлял пролиферацию как CD4, так и CD8 Т-клеток.

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

Чтобы выяснить, является ли эффект фактора специфическим, т.е. реализуется через связывание с VEGFR-1, исследовали экспрессию указанного рецептора на Т-клетках (Рис. 3). Относительное содержание CD4+VEGFR-1+ и CD8+VEGFR-1+ клеток в свежевыделенных МНК было низким и составляло 1,29% (0,2-4,4) и 0,51% (0,24-2,17), соответственно. 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.

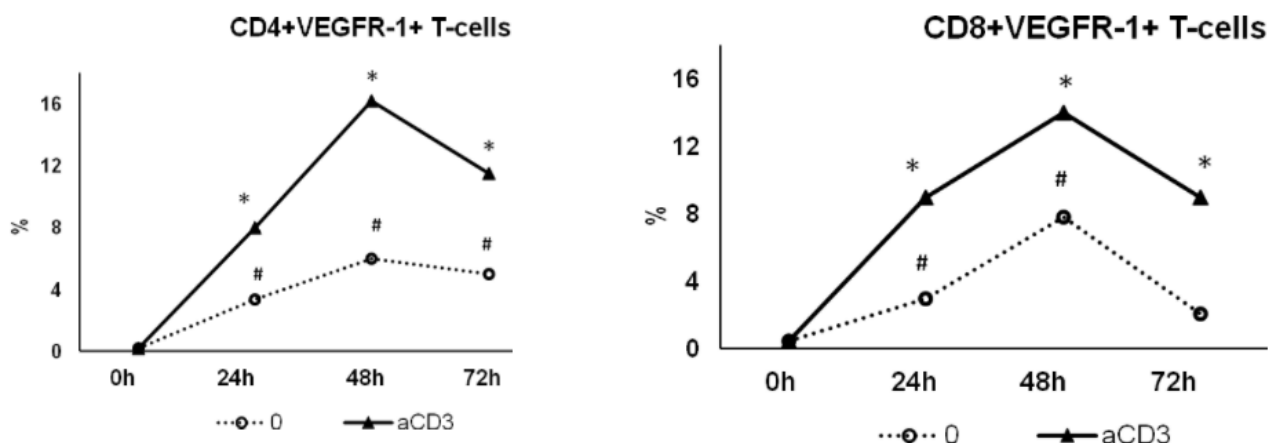


Рисунок 3 - Экспрессия VEGFR-1 на CD4+ и CD8+ Т-клетках в нестимулированных (0) и аCD3-стимулированных (аCD3) культурах МНК (n=8). * - $p < 0,05$ - достоверность различий по сравнению с нестимулированными МНК; # $p < 0,05$ - достоверность различий по сравнению с свежевыделенными МНК (W-критерий Вилкоксона).

Чтобы убедиться, что иммуномодулирующий эффект PlGF является специфичным и опосредуется через VEGFR-1, исследовали как блокирование VEGFR-1 сигнального пути будет сказываться на способности фактора ингибировать пролиферацию активированных Т-клеток. Поскольку в литературе имеются сообщения о том, что высокие дозы PlGF могут активировать МНК к продукции VEGF [Bottomley M., 2000], который способен ингибировать функции Т-клеток через VEGFR-2 [Voron T., 2015, Ziogas A., 2012], в качестве контроля использовали блокирующие антитела к VEGFR-2 (Рис 4). Видно, что PlGF достоверно подавлял пролиферативный ответ в аCD3-стимулированных культурах МНК, а добавление аVEGFR-1 практически отменяло ингибирующий эффект. В отсутствие блокирующих антител медиана супрессорного эффекта PlGF составляла 31% (IQR 26-38, $pU = 0,013$), а при одновременном добавлении фактора и аVEGFR-1 снижалась до 9% (IQR 3,0-25). При отсроченном добавлении аVEGFR-1 (через 24 часа от начала культивирования) супрессорный эффект PlGF снижался до 3%. Более выраженное подавление супрессорной активности фактора в этом случае, было, по-видимому, связано с низким содержанием VEGFR-1+ Т-клеток в свежеизолированных МНК и существенным их возрастанием через 24 часа после активации. 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.

Таким образом, Т-клетки в популяции свежевыделенных МНК, т.е. находящиеся «в покое», практически не экспрессируют VEGFR-1, однако активация клеток приводит к экспрессии VEGFR-1 с пиком на 48 часов, и данный тип рецепторов опосредует ингибирующий эффект PlGF.

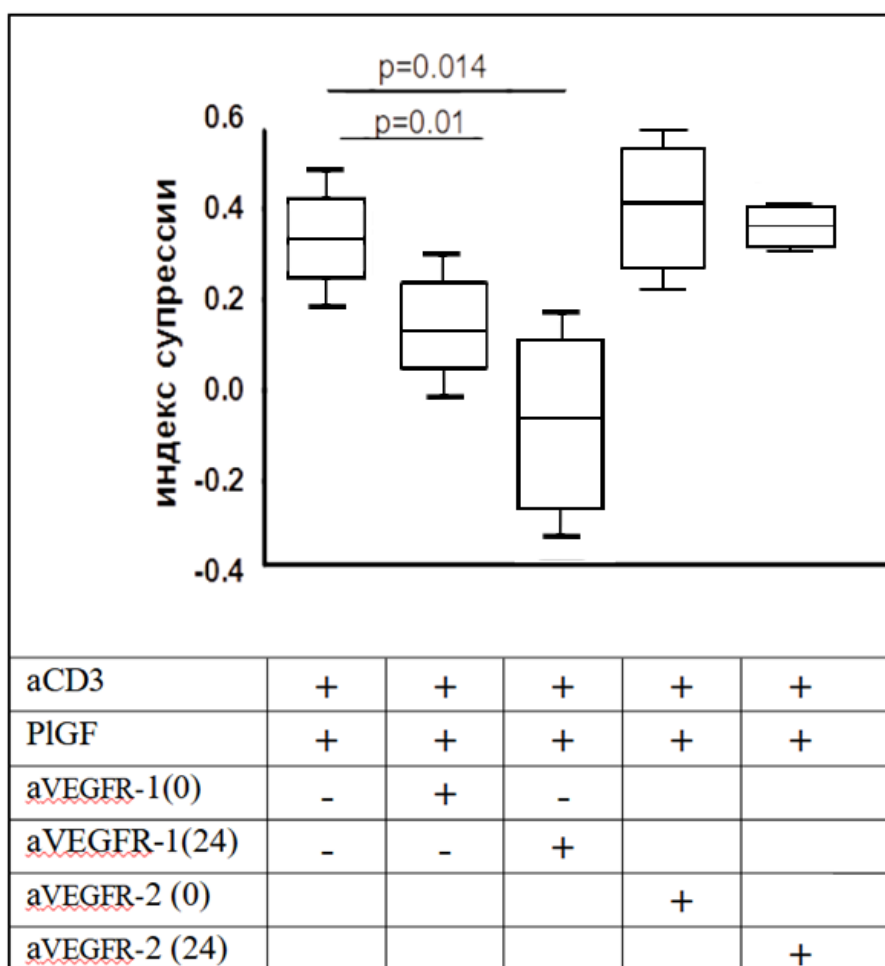


Рисунок 4 - Влияние нейтрализующих a-VEGFR-1 и a-VEGFR-2 антител на пролиферативный ответ МНК в a-CD3-стимулированных культурах клеток. Данные представлены в виде медианы, IQR и диапазона минимальных и максимальных значений индекса супрессии (n=8). МНК стимулировали aCD3-антителами в отсутствии (1) и присутствии (2-4) PlGF (5 нг/мл). Нейтрализующие a-VEGFR-1 и a-VEGFR-2 (2,5 мкг/мл) антитела добавляли либо совместно с PlGF (3), либо через 24 ч культивирования (4). Индекс супрессии рассчитывали как отношение ответа aCD3-стимулированных МНК в присутствии и отсутствие фактора, p – достоверность различий, W - критерий Вилкоксона.

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

Снижение пролиферации может быть обусловлено различными механизмами, включая усиление продукции иммуносупрессивных цитокинов и/или индукцию активационно-индуцированной гибели Т-клеток. Поэтому на следующем этапе исследовали влияние PlGF на продукцию иммуносупрессивного цитокина IL-10 и апоптоз активированных Т-клеток (Рис. 5). Оценка относительного содержания CD4+ и CD8+ Т клеток, продуцирующих IL-10, показала, что доля CD4+IL-10+ клеток в культурах нестимулированных МНК составляла 0,8 (0,43-1,5)%, а CD8+IL-10+ лимфоцитов - 2,3 (1,3-6,4)% и в aCD3-стимулированных культурах возрастала до 2,0 (1,5-2,0) и 5,0 (3,0-7,0)%, соответственно. При этом активация МНК в присутствии PlGF приводила к достоверно более выраженному возрастанию CD4+IL-10+ и CD8+IL-10+ - до 3,0 (2,0-4,0)% и 8,2 (4,2-17)%, соответственно.

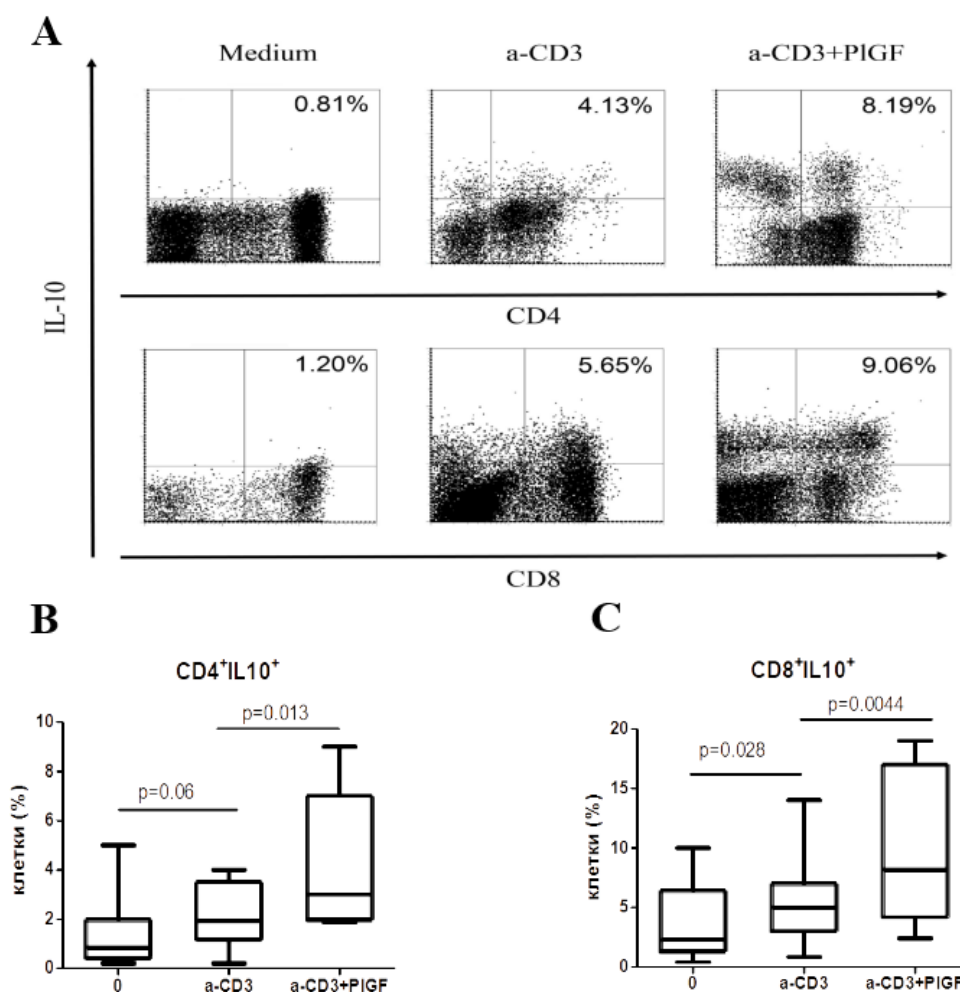


Рисунок 5 - Влияние PlGF на способность CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток к продукции IL-10 культурах aCD3-стимулированных МНК. Свежевыделенные МНК от 10 здоровых доноров культивировали в среде (0) или aCD3 в отсутствие (a-CD3) и присутствии (a-CD3+PlGF) PlGF (5 нг/мл). После 3 суток культивирования оценивали относительное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

Далее исследовали влияние PlGF на активационно-индуцированную гибель CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов (Рис 6). Клетки в стадии раннего апоптоза идентифицировали как Ann⁺/7ADD⁻, в стадии позднего апоптоза (или некроза) - как Ann⁺/7-ADD⁺. Соответственно общее количество апоптотических клеток оценивали как популяцию с фенотипом Ann⁺. Активация aCD3 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 aCD3 достоверно возрастала с 5,0 (2,8-6,3)% до 9,3(1,6-11)%. Причем присутствие PlGF повышало содержание Ann⁺CD8⁺ клеток

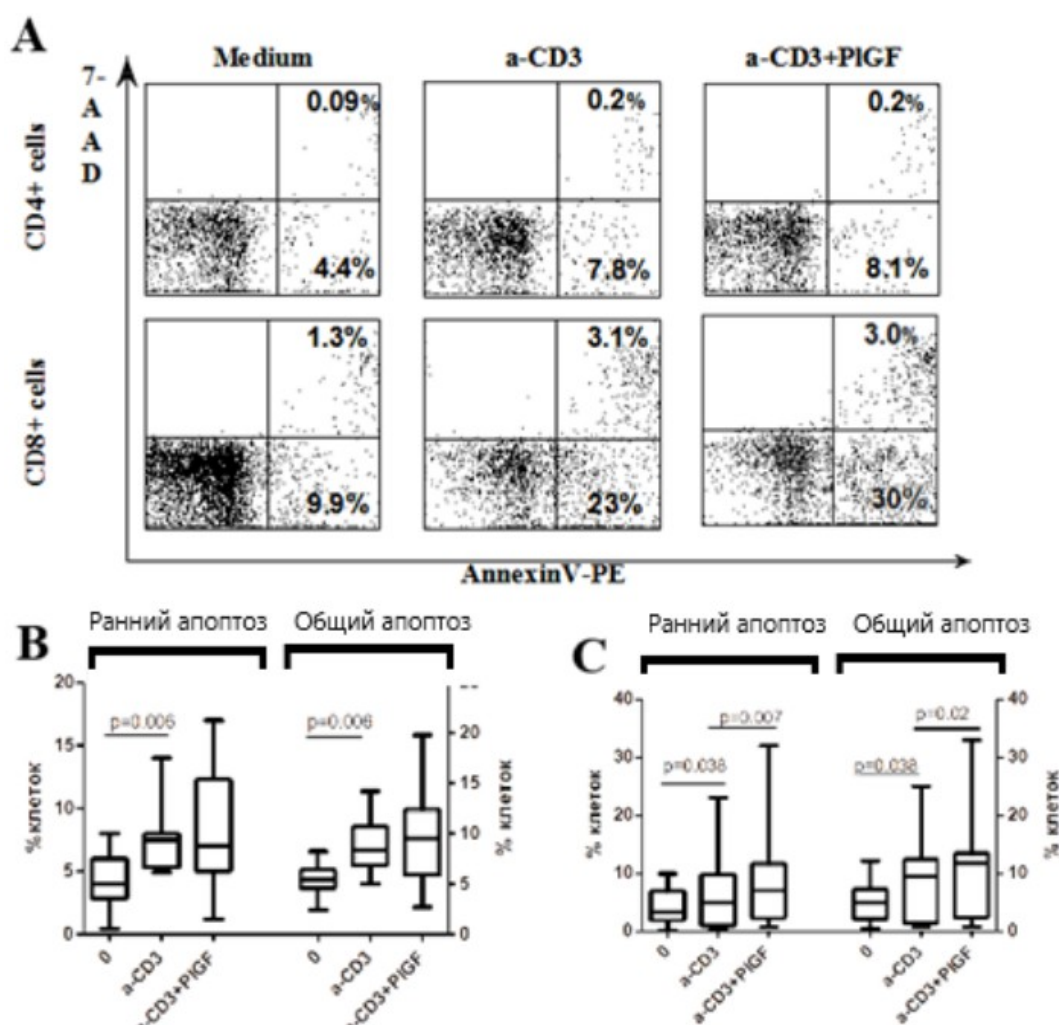


Рисунок 6 - Влияние PlGF на апоптоз Т-клеток в aCD3 стимулированных культурах МНК. Представлены репрезентативные дот-плоты (А) и суммированные данные (n=9-12) 4-х независимых экспериментов (В), отражающие содержание клеток в стадии раннего апоптоза (annV⁺ 7-ADD⁻) и общее количество апоптотических клеток (Ann V⁺) в гейтах CD4⁺ (В) и CD8⁺ (С) лимфоцитов, p - критерий Вилкоксона.

до 12% (9,4-13)%. Стимулирующий эффект PlGF также проявлялся в отношении раннего апоптоза CD8 клеток.

Полученные данные свидетельствуют, что PlGF способен усиливать продукцию IL-10 и апоптоз Т-клеток в культурах aCD3-стимулированных МНК. При этом стимулирующий эффект фактора на продукцию IL-10 выявляется как в субпопуляции CD4⁺, так и CD8⁺ Т-лимфоцитов, тогда как усиление апоптоза регистрируется только субпопуляции CD8⁺ 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 [Mizuno R., 2019, Verdon D., 2020]. Поскольку способность усиливать экспрессию ингибиторных рецепторов была ранее продемонстрирована для VEGF [Bourhis M., 2017], представлялось важным выяснить, обладает ли PlGF аналогичной активностью. Для этого исследовали содержание CD4 и CD8+Т клеток, несущих молекулы PD-1, CTLA-4 и Tim-3 (Рис. 7), а также среднюю флуоресценцию указанных молекул (Табл. 2) в культурах МНК, стимулированных aCD3 в отсутствие и присутствии PlGF.

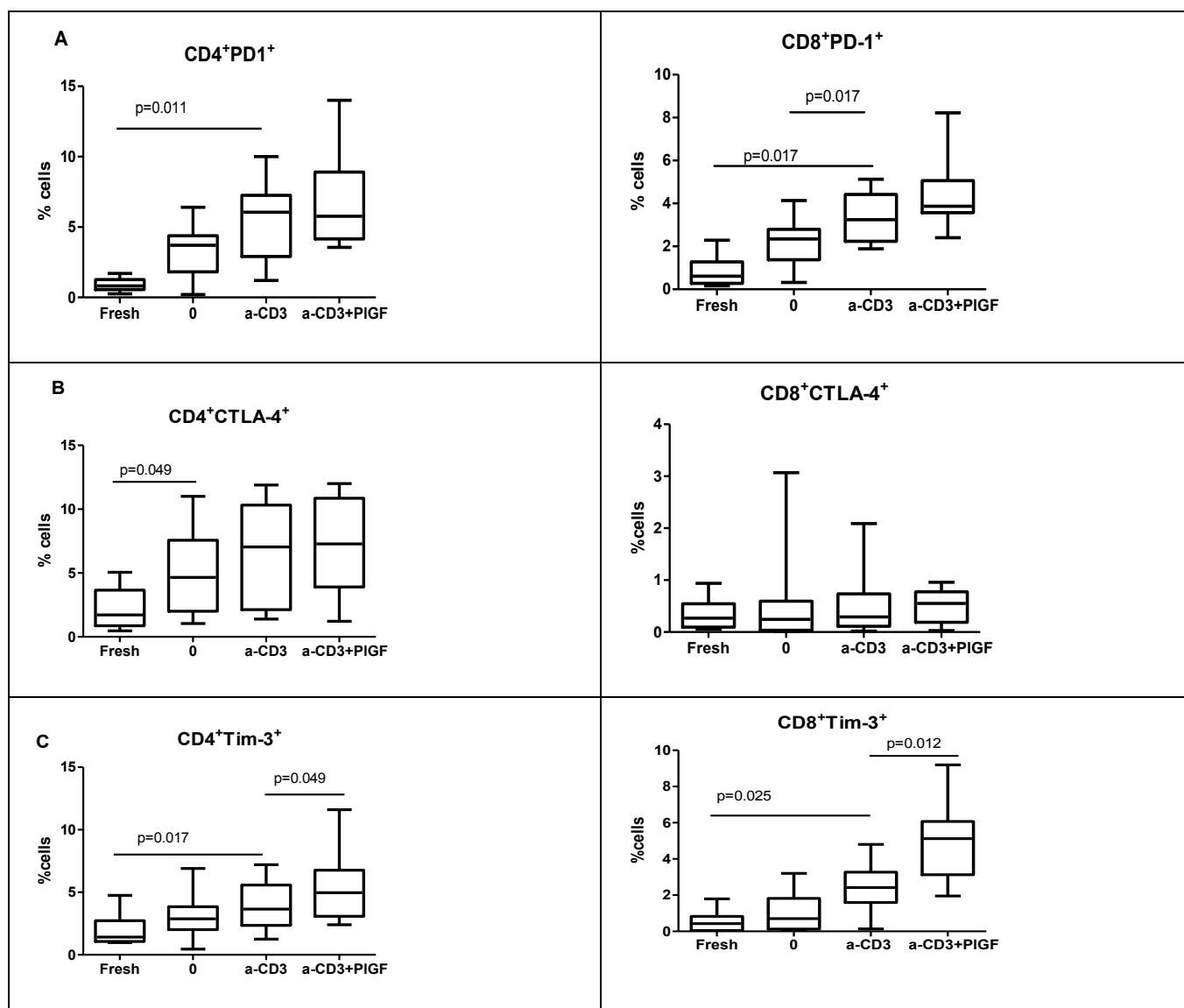


Рисунок 7 - Влияние PlGF на экспрессию ингибиторных рецепторов. Представлено относительное содержание CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих PD-1⁺ (A), CTLA-4⁺ (B) и Tim-3⁺ (C). Fresh –изолированные МНК; 0 - культуры нестимулированных МНК; a-CD3 и a-CD3+PlGF –aCD3-активированные МНК в отсутствие и присутствии PlGF, соответственно; p- достоверность различий, W -парный критерий Вилкоксона.

Медианный уровень CD4⁺ и CD8⁺ клеток, экспрессирующих PD-1 (Рис 7А), возрастал при стимуляции aCD3, и доля этих клеток в присутствии PlGF достоверно не изменялась. Относительное содержание CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, несущих на поверхности CTLA-4 (Рис 7В), в присутствии PlGF также не изменялась. При анализе экспрессии молекулы Tim-3 (рис. 7С) относительное содержание CD4⁺Tim-3⁺ клеток в популяции изолированных МНК составляло 1,4 (1,1-2,6)% и возрастало до 3,7% (2,7-5,3)% в aCD3-стимулированных МНК (p=0,017). При этом добавление PlGF сопровождалось достоверным увеличением CD4⁺Tim-3⁺ клеток до 5,0 (3,3-6,6)%. 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)%, достигало 2,4 (1,6-3,3)% в aCD3- стимулированных МНК и двукратно повышалось при активации aCD3 в присутствии PlGF, достигая 5,1 (3,4-6,1)%.

Анализ средней интенсивности флуорисценции (MFI) исследуемых ингибиторных рецепторов (табл. 2) показал, что PlGF усиливал среднюю интенсивность экспрессии ингибиторных рецепторов на Т-клетках. В присутствии фактора отмечалось достоверное возрастание MFI молекул Tim-3 и PD-1 в популяции CD4+ и CD8+Т-лимфоцитов и CTLA-4 в популяции CD8+Т-лимфоцитов. Таким образом, PlGF обладает стимулирующим эффектом на экспрессию ингибиторных рецепторов, наиболее выраженным в отношении Tim-3.

Таблица 2 - Влияние PlGF на среднюю интенсивность флуорисценции ингибиторных рецепторов активированными CD4+ и CD8+ Т-клетками

MFI (усл. Ед)	PD-1	CTLA-4	Tim-3
CD4+Т-клетки в популяциях			
Свежеизолированные МНК	31 (26-32)	25 (20-30)	28 (19-32)
Нестимулированные МНК	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 в популяциях			
Свежеизолированные МНК	30 (29-32)	30 (19-40)	24 (20-31)
Нестимулированные МНК	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: *- $p < 0.05$ достоверность различий с изолированными МНК, ** - $p < 0.05$ - с нестимулированными МНК и #- $p < 0,05$ - с aCD3-стимулированными культурами МНК; p - парный критерий Вилкоксона; n=8.

Экспрессия ингибиторных рецепторов Т-клетками периферической крови при беременности.

Полученные выше данные показали, что PlGF обладает широким спектром иммуномодулирующей активности в отношении активированных *in vitro* Т-клеток. Чтобы оценить возможное участие PlGF в модуляции иммунной системы *in vivo* и, в частности, перестройке иммунной системы при гестации, во второй части работы было проведено сравнительное исследование Т-клеток в группах беременных с высоким (неосложненная гестация) и сниженным (преэклампсия) уровнем фактора в сопоставлении с фертильными небеременными (с низким/пороговым уровнем PlGF). Учитывая стимулирующий эффект PlGF на экспрессию Т-клетками ингибиторных рецепторов и важную роль этих молекул в иммунной адаптации, основное внимание было уделено оценке экспрессии PD-1, CTLA-4, Tim-3 на CD4 и CD8 Т-лимфоцитах.

Группы с неосложненной гестацией и ПЭ были представлены, соответственно, 36 и 29 беременными (Табл. 3). Пациентки этих групп были схожи и по срокам гестации, частоте беременных с сопутствующей экстрагенитальной патологией, гравидности и паритету родов. Частота беременных в возрасте 40 и более лет в обеих группах также не различалась. При этом концентрация PlGF в группе с нормальной беременностью в соответствии с данными литературы была значительно выше (практически двукратно), чем у женщин с ПЭ.

Таблица 3 - Сравнительная характеристика беременных с ПЭ и неосложненной беременностью

Параметры	ПЭ	Неосложненная беременность	p
Количество	29	36	
Возраст ≥ 40 лет (%)	14	6	$P_{\text{ТКФ}}=0,48$
Срок беременности Me (IQR);	33 (30-36)	34 (31-37)	$P_U=0,62$
Количество беременностей	2 (1-3)	1 (1-2,5)	$P_{\text{ТКФ}}=0,19$
Паритет родов Me (IQR)	1 (1,0-2,0)	1 (1,0-1,5)	$P_U=0,28$
Экстрагенитальная патология (n/%)	14 (48,3%)	12 (33,3%)	$P_{\text{ТКФ}}=0,33$
PIGF в сыворотке крови (пг/мл)	253 (158-416)	479 (304-695)	$P_U=0,014$

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

Оценка Т-клеток, экспрессирующих ингибиторные рецепторы (Табл. 4), показала, что у женщин с неосложненной гестацией в сравнении с небеременными отмечалось 5-кратное возрастание Tim-3+ клеток в популяции CD4 лимфоцитов и более чем 2-кратное увеличение PD-1+клеток в популяции CD8 Т-лимфоцитов. В обеих субпопуляциях Т-лимфоцитов также отмечалось достоверное возрастание доли клеток, коэкспрессирующих PD-1 и Tim-3.

Таблица 4 – Экспрессия ингибиторных рецепторов Т-клетками беременных с неосложненной гестацией в группах с наличием и отсутствием экстрагенитальной патологии

Субпопуляция (%)	Фертильные небеременные n=(16-28)	Общая группа беременных с неосложненной гестацией n=(14-36)	Сопутствующая экстрагенитальная патология	
			Отсутствует n=(10-24)	Имеется n=(4-12))
CD4+PD-1+	4,1 (3,0-5,9)	5,0 (2,8-8,4)	4,8 (3,0-7,4)	6,6 (2,5-9,6)
CD4+CTLA-4+	2,6 (1,3-4,0)	2,6 (2, 1-3,9)	3,8 (2,0-4,0);	2,4 (2,1-2,8)
CD4+Tim-3+	1,4 (1,0-2,9)	7,0 (4,0-10)*	6,5 (1,6-8,6)**	9,7 (6,9-13)**
CD8+PD-1+	2,9 (1,1-5,9)	6,9 (4,8- 12)*	5,8 (4,7-8,3)**	10 (6,9-15)**,#
CD8+CTLA4+	2,0 (0,93-3,4)	2,4 (0,58-4,1)	1,2 (0,52-4,0)	3,4 (1,3-5,5)
CD8+Tim-3+	5,3 (2,5-9,2)	5,3 (1,5-8,2)	5,8 (2,3-19)	1,1 (0,62-0,9)*,#
CD4+PD-1+Tim1+	0,35 (0,19-0,5)	1,8 (1,1-2,6)*	2,1 (1,6-2,8)**	0,27 (0,18-1,5)
CD8+PD-1+Tim3+	1,5 (0,66-2,3)	3,5 (1,5-4,5)*	3,9 (2,2-4,5)**	0,77 (0,57-3,5)

Примечание: * $p_U < 0,05$; ** $p_U < 0,001$ – достоверность различий с небеременными, # $p_U < 0,05$ – достоверность различий между беременными с наличием и отсутствием экстрагенитальной патологии; U- критерий Манна-Уитни.

Следует отметить, что, группа беременных с неосложненной гестацией, т.е. отсутствием поздних гестационных осложнений, и прежде всего ПЭ, была гетерогенной в плане сопутствующих экстрагенитальных заболеваний, включающих артериальную гипертензию (в том числе гестационную), отеки беременных, сахарный диабет (в том числе гестационный), ожирение, патологию 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. Поскольку анализируемые сопутствующие заболевания сопряжены с изменениями в иммунной системе, представлялось важным выяснить, с чем связано возрастание экспрессии ингибиторных рецепторов - гестацией или коморбидным статусом. Для этого было проведено сравнительное исследование экспрессии ингибиторных рецепторов в подгруппах с наличием и отсутствием сопутствующей патологии (Табл. 4). Как видно, выявленные в общей группе беременных особенности (возрастание доли CD4+Tim3+, CD8+PD-1+ и Т-клеток, коэкспрессирующих PD-1 и Tim3+) сохранялись в группе беременных с отсутствием экстрагенитальной патологии, свидетельствуя, что усиление экспрессии PD-1 и Tim3 связано с гестацией, а не сопутствующей патологией. В группе с экстрагенитальными заболеваниями содержание CD4+Tim-3+ и CD8+PD-1+ клеток было также повышенным, однако отмечался ряд особенностей. Так, доля CD8+Tim-3+ клеток было достоверно ниже, а CD8+PD-1+ клеток – выше, чем у беременных без сопутствующей патологии. Кроме того, в этой группе не наблюдалось повышения CD4+ и CD8+ Т-клеток, коэкспрессирующих молекулы PD-1 и Tim-3.

Сопряженность между экспрессией ингибиторных молекул и коморбидным фоном дополнительно подтверждалось наличием корреляционных зависимостей между указанными параметрами. Количество экстрагенитальных заболеваний находилось в обратной достоверной связи с содержанием CD8+Tim-3+ клеток ($R = -0,58$; $p = 0,09$) и CD4+PD-1+Tim-3+ клеток ($R = -0,57$; $p = 0,03$) и прямой - с долей CD8+PD-1+ клеток ($R = -0,37$; $p = 0,02$). Поскольку беременные различались по возрасту (от 18 до 45 лет) и срокам гестации (от 26 до 40 нед), также исследовали сопряженность этих факторов с экспрессией ингибиторных рецепторов. Срок гестации прямо коррелировал с долей CD8+Tim-3+ клеток ($R = 0,5$; $p = 0,03$), CD4+PD-1+Tim-3+ ($R = 0,54$; $p = 0,04$) и CD8+PD-1+Tim-3+ клеток ($R = 0,61$; $p = 0,02$).

Оценка ингибиторных рецепторов на Т-клетках у беременных с ПЭ (Рис 8А), характеризующихся 2-кратно сниженным уровнем PlGF, показала, что в целом по группе пациентки с ПЭ характеризовались меньшим относительным содержанием CD4+Tim-3+ и CD8+PD-1+ клеток (в сравнении с неосложненной беременностью), отсутствием характерного для неосложненной гестации возрастания Т-лимфоцитов с коэкспрессией PD-1 и Tim-3 и одновременно более высоким содержанием CD4 клеток, экспрессирующих CTLA-4.

Следует отметить, что у 48% женщин ПЭ была умеренной, а у 52% - тяжелой. При сравнении этих групп, оказалось, что снижение экспрессии PD-1 и Tim-3, в частности, уменьшение доли CD4+Tim-3+, CD4+PD-1+Tim-3+ и CD8+PD-1+ Т-клеток были характерны именно для умеренной ПЭ, а возрастание CD4+CTLA-4 клеток - для тяжелой ПЭ. То есть изменения экспрессия «чек-поинт» молекул ассоциировалась с тяжестью ПЭ (Рис 8 В).

Изменения в экспрессии ингибиторных рецепторов имели также свои особенности в зависимости от сроков манифестации ПЭ. Ранняя ПЭ (до 34 нед гестации) выявлялась у 17, а поздняя (≥ 34 нед гестации) ПЭ – у 12 пациенток.

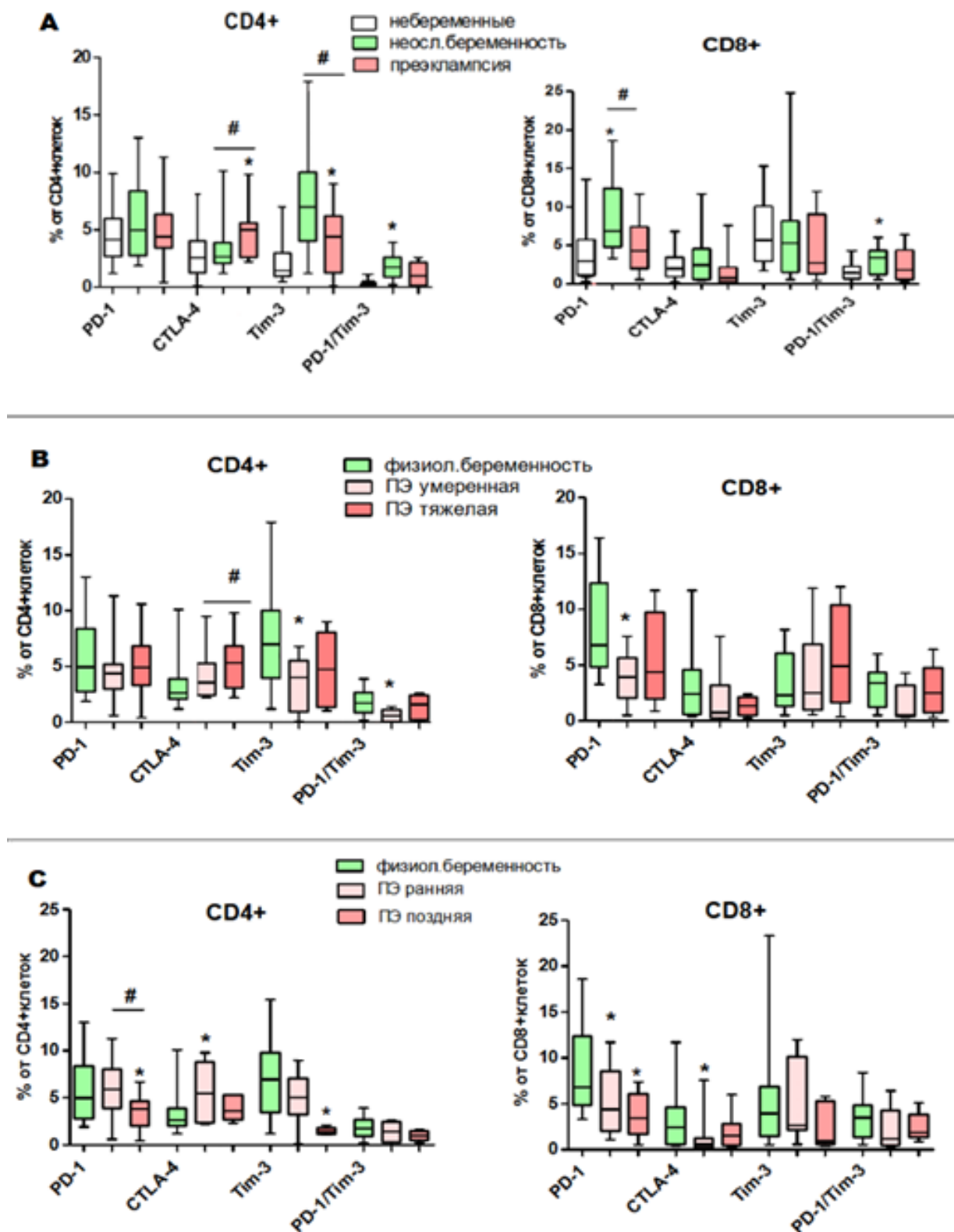


Рисунок 8 – Экспрессия ингибиторных рецепторов на периферических Т-клетках у беременных с ПЭ. А - содержание CD4+ и CD8+ лимфоцитов, несущих PD-1, CTLA-4 и Tim-3, в общей группе ПЭ (* $p < 0,05$ – достоверность различий с небеременными, # $p < 0,05$ – с неосложненной гестацией); В - экспрессия ингибиторных рецепторов у пациенток с тяжелой и умеренной ПЭ (* $p < 0,05$ – различия с неосложненной беременностью, # $p < 0,05$ – между группами с умеренной и тяжелой ПЭ); С- экспрессия ингибиторных рецепторов у пациенток с ранней и поздней ПЭ (* $p < 0,05$ – различия с неосложненной беременностью, # $p < 0,05$ – между группами с ранней и поздней ПЭ).

Отличительной особенностью ранней ПЭ являлось дополнительно 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 (Рис. 8С), что являлось аргументом в пользу иммунопатогенетической разнородности ранней и поздней ПЭ.

Учитывая возрастание экспрессии Т-клетками молекул PD-1 и Tim-3 при неосложненной гестации и снижения этих молекул при ПЭ, т.е. в группах, значимо различающихся по уровню PlGF, в завершении была проанализирована корреляционная связь между концентрацией фактора во второй половине гестации и экспрессией указанных молекул. Между концентрацией PlGF в сыворотке крови беременных и относительным содержанием CD8+PD-1+ клеток выявлялась прямая достоверная корреляционная связь ($R_s=0,51$; $p=0,026$). Содержание CD4+Tim-3+ клеток также находилось в прямой зависимости с уровнем PlGF, которая проявлялась на уровне выраженного тренда ($R_s=0,55$; $p=0,07$).

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 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 активированных Т-клеток, ингибируя как CD4+, так и CD8+ Т-клетки. При этом сохранение супрессорного эффекта PlGF после удаления моноцитов (деплегия адгезивной к пластику фракции МНК), а также в культурах сепарированных Т-клеток свидетельствует о способности фактора оказывать прямой эффект на Т-клетки. 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. 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 *in vivo* при гестации, во второй части работы проведено сравнительное исследование Т-клеток у беременных с неосложненной гестацией и ПЭ, характеризующихся, соответственно, высоким и низким уровнем сывороточного PlGF (в нашем исследовании 479 и 253 пг/мл, соответственно). Учитывая выявленный *in vitro* стимулирующий эффект PlGF на

экспрессию Т-клетками ингибиторных рецепторов и важную роль этих молекул в реализации механизмов иммунной адаптации, основное внимание было сосредоточено на оценке экспрессии периферическими Т-клетками молекул 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 экспрессии ингибиторных рецепторов регистрируется как у беременных с наличием, так и отсутствием сопутствующей экстрагенитальной патологии, и, следовательно, является следствием гестации, а не коморбидного статуса. Тем не менее, коморбидный фон ассоциирован с рядом особенностей – сниженной долей CD8+Tim-3+ Т-клеток и более высоким содержанием CD8+PD-1+ клеток. При этом количество сопутствующих патологий прямо коррелирует с содержанием 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 ингибиторных рецепторов. Другими факторами, ассоциированными с экспрессией «чек-поинт» молекул при неосложненной гестации, является срок беременности, прямо коррелирующий с долей CD8+Tim-3+, CD4+PD-1+Tim-3+ и CD8+PD-1+Tim-3+ клеток.

В сравнении с неосложненной гестацией пациентки с ПЭ характеризуются сниженной экспрессией молекул Tim-3 и PD-1, о чем свидетельствует достоверное снижение CD4+Tim-3+ и CD8+PD-1+ клеток и отсутствие характерного для неосложненной гестации возрастания 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. 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 ингибиторных молекул при ранней и поздней ПЭ ассоциированы с различными рецепторами (CTLA-4 при ранней ПЭ и PD-1/Tim-3 – при поздней ПЭ), что является дополнительным аргументом в пользу иммунопатогенетической разнородности указанных форм ПЭ. Возрастание PD-1 и Tim-3 Т-клетками при неосложненной гестации и снижение – при ПЭ указывает на ассоциацию между уровнем PlGF и экспрессией указанных молекул, что дополнительно подтверждается наличием прямых корреляционных связей CD8+PD-1+ и CD4+Tim-3+ клеток с концентрацией фактора в сыворотке крови. Эти данные свидетельствуют в пользу возможного участия PlGF в модуляции функций Т-клеток при гестации и обосновывают целесообразность дальнейших исследований 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 ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ташкина Е.А., Леплина О.Ю., Баторов Е.В., Останин А.А., Пасман Н.М. Экспрессия рецепторов к сосудисто-эндотелиальному фактору роста-1 (VEGFR-1) и их роль в регуляции пролиферации Т-лимфоцитов // Российский иммунологический журнал. 2019; Т. 13(22), № 2.- С. 942-944..
2. Сметаненко Е.А., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Пасман Н.М., Останин А.А., Черных Е.Р. Фактор роста плаценты модулирует ответ активированных *in vitro* Т-клеток // Бюллетень сибирской медицины. – 2020, Т. 19, № 4, С. 158-166. doi: 10.20538/1682-0363-2020-4-158-166

3. Leplina O., Smetanenko E., Tikhonova M., Batorov E., Tyrinova T., Pasman N., Ostanin A., Chernykh E.. Binding of the placental growth factor to VEGF receptor type 1 modulates human T cell functions // J of Leukocyte boil. 2020 DOI: 10.1002/JLB.2A0420-723RR
4. Хонина Н.А., Федорова А.В., Сметаненко Е.А., Пасман Н.М., Черных Е.Р. Иммуномодулирующие свойства ангиогенных факторов и миелоидных супрессорных клеток: роль в гестационном процессе. – Якутский медицинский журнал. -2022. – № 2. – С. 117-121
5. Сметаненко Е.А., Хонина Н.А., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Баторов Е.В., Пасман Н.М., Черных Е.Р. Экспрессия ингибиторных рецепторов (PD-1, CTLA-4- и Tim-3) периферическими Т-клетками при беременности/Бюллетень сибирской медицины. – 2022.-Том 21, № 3 .- С. 87-95

Тезисы материалов конференций

1. Черных Е.Р., Леплина О.Ю., Ташкина Е.А., Тихонова М.А., Останин А.А., Пасман Н.М. Фактор роста плаценты ингибирует пролиферацию Т-лимфоцитов через VEGF-R1-сигнальный путь.// Статья в сборнике. Материалы IV международного конгресса «Новые технологии в акушерстве, гинекологии, перинатологии и репродуктивной медицине Новосибирск, 24-27 апреля 2019 г. – С.167-170.
2. Сметаненко Е.А., Пасман Н.М., Черных Е.Р. Влияние плацентарного фактора роста на экспрессию чекпойнт молекул как механизм адаптации иммунной системы во время беременности.// Статья в сборнике. Материалы XXI Всероссийского научно-образовательного форума «Мать и Дитя – 2020» Москва, 28–30 сентября 2020 года – С.38-39.
3. Сметаненко Е.А. , Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Пасман Н.М., Шаклейн А.В., Черных Е.Р. Повышенная экспрессия чек-пойнт молекул на периферических Т-клетках при неосложненной беременности // статья в сборнике научных материалов V международный конгресс «новые технологии в акушерстве, гинекологии, перинатологии и репродуктивной медицине 22-25 апреля 2021 Новосибирск –С.1179-182
4. Сметаненко Е.А. , Леплина О.Ю., Пасман Н.М Черных Е.Р. Чек-пойнт молекулы и адаптация иммунной системы при беременности // статья в сборнике научных материалов Международного научного форума «Мать и дитя», октябрь 2021 Москва – С.1180-181

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

МНК — моноклеарные клетки
 ПЭ — преэклампсия
 СРБ — С-реактивный белок
 α-CD3 —антитела против Т-клеточного рецептора
 CD — кластер дифференцировки
 CTLA-4 — цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный белок-4
 IL—интерлейкин
 PD-1 — рецептор программируемой клеточной гибели
 PlGF — плацентарный фактор роста
 Th – Т хелперы
 VEGF — фактор роста эндотелия сосудов
 VEGFR-1 — рецептор 1 типа фактора роста эндотелия сосудов
 VEGFR-2 — рецептор 1 типа фактора роста эндотелия сосудов
 Tim-3 — Т-клеточный иммуноглобулин муцин - 3