

ВЛИЯНИЕ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКОГО β 1-ГЛИКОПРОТЕИНА НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ И ПРОЛИФЕРАЦИЮ Т-ХЕЛПЕРОВ, ПОЛЯРИЗОВАННЫХ В ФЕНОТИП Th17

© 2019 г. В. П. Тимганова^{1*}, М. С. Бочкова¹, А. П. Калугина²,
П. В. Храмцов^{1,2}, М. Б. Раев^{1,2}, С. А. Заморина^{1,2}

*E-mail: timganovavp@gmail.com

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия;

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Поступила: 23.05.2019. Принята: 30.06.2019

Изучали влияние нативного (не рекомбинантного) препарата трофобластического β 1-гликопротеина (ТБГ) на дифференцировку и пролиферацию активированных Т-хелперов 17 типа (Th17). Объектом исследования были изолированные методом иммуномагнитной сепарации культуры «наивных» Т-хелперов (CD4⁺), которые индуцировали в фенотип Th17 при помощи TCR-активатора и провоспалительных цитокинов (IL-1 β и IL-6). Показано, что ТБГ снижал процент Th17-клеток в культуре (CD4⁺ROR- γ t⁺), и подавлял их пролиферацию, оцениваемую методом дифференциального гейтирования. Таким образом, в используемой экспериментальной модели ТБГ оказывал выраженный подавляющий эффект на дифференцировку и пролиферацию Т-хелперов, поляризованных в фенотип Th17.

Ключевые слова: трофобластический β 1-гликопротеин (ТБГ), беременность, CD4⁺- лимфоциты, ИЛ-17, Т-хелперы 17 типа (Th17)

DOI: 10.31857/S102872210007274-6

Адрес: Пермь, Голева, 13, 614081, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Тимганова Валерия Павловна. Тел.: +7 (342) 280-77-94.

E-mail: timganovavp@gmail.com

Авторы:

Тимганова В. П., к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, «ИЭГМ УрО РАН», Пермь, Россия;

Бочкова М. С., к.б.н., научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, «ИЭГМ УрО РАН», Пермь, Россия;

Калугина А. П., магистрант кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия;

Храмцов П. В., к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, «ИЭГМ УрО РАН», доцент кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия;

Раев М. Б., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии «ИЭГМ УрО РАН», профессор кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия;

Заморина С. А., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, «ИЭГМ УрО РАН», профессор кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Трофобластический β 1-гликопротеин (ТБГ) является онкофетальным белком, который продуцируется клетками цито- и синцитиотрофобласта и обладает иммуносупрессивными свойствами, что обеспечивает его важную роль в отмене антагонистических взаимоотношений матери и плода. Однако, несмотря на то, что концентрация ТБГ в крови беременной женщины преобладает над концентрациями других белков беременности и к III триместру достигает значений 200–400 мкг/мл [1], его эффекты на провоспалительную субпопуляцию интерлейкин-17 (IL-17) – продуцирующих лимфоцитов (Th17) человека изучены недостаточно. Процессы диф-

ференцировки Th17 сопровождаются активной пролиферацией этих клеток [6]. Известно, что физиологическая беременность сопровождается снижением Th17 в периферической крови в сравнении с небеременными женщинами [8]. Повышение уровня Th17, в свою очередь, ассоциировано с патологическими процессами и может приводить к преждевременным родам или спонтанному аборту [9]. Основным транскрипционным фактором Th17 является ROR- γ t (retinoic acid receptor (RAR) – related orphan receptor) [7].

Таким образом, целью работы являлась оценка влияния ТБГ на пролиферацию и дифференцировку Т-хелперов, индуцированных в фенотип Th17. Для достижения данной цели, были поставлены следующие задачи:

1. Изучить роль ТБГ в регуляции пролиферации Т-хелперов, индуцированных в фенотип Th17.
2. Оценить влияние ТБГ на дифференцировку Th17, оцениваемую по уровню экспрессии ROR- γ t (маркер Th17), в зависимости от пролиферативного статуса клетки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось согласно Хельсинской Декларации ВМА 2000 г. и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г., получено разрешение этического комитета «ИЭГМ УрО РАН» (IRB00010009) от 12.06.2016.

Объект исследования. В работе использовали мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста ($n=12$). МПК получали центрифугированием в градиенте плотности смеси фикола-верографина ($\rho=1,077$ г/см³) (Германия).

Выделение CD4⁺-клеток. Монокультуры CD4⁺ Т-клеток получали методом иммуномагнитной сепарации с использованием технологии MACS® («Miltenyi Biotec», Германия) из суспензии МПК. Выделенные клетки (1×10^6 кл/мл) культивировали в 48-луночных планшетах в полной питательной среде (ППС): RPMI-1640 с L-глутамином («Sigma-Aldrich», США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) («Sigma», США), 10 мМНерес («Amresco», США) и 100 мкг/мл гентамицина («KRKA», Словения) в течение 72 ч при 37°С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. В работе использовали физиологические концентрации нативного ТБГ (1, 10, 100 мкг/мл), полученного по

авторской технологии [3]. В качестве контроля использовали образец, где вместо белка добавляли ППС. Для индукции лимфоцитов в фенотип Th17 в культуры вносили рекомбинантные цитокины IL-1 β и IL-6 (по 10 нг/мл, «Miltenyi Biotec», Германия) [3]. В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали T-Cell Activation/Expansion Kit human (TCR-активатор) («Miltenyi Biotec», Германия) – частицы MACSi Bead™, нагруженные антителами против CD2, CD3, CD28 человека. После 72 ч инкубации оценивали количество Th17 как процент CD4⁺-лимфоцитов (CD4-FITC, «Miltenyi Biotec», Германия), экспрессирующих транскрипционный фактор ROR- γ t (Anti ROR γ t-PE, «Miltenyi Biotec», Германия). Экспрессия ROR- γ t оценивалась после пермеабиллизации клеток согласно инструкции к буферам («BioLegend», Германия). Измерения проводили на проточном цитометре CytoFLEX S («Beckman Coulter», США).

Для оценки пролиферативного статуса использовали метод дифференциального гейтирования на графике светорассеяния по размеру и гранулярности клеток. Так, после 48 часов культивирования CD4⁺-клетки были представлены тремя популяциями: неделяющиеся клетки в характерном для них регионе, пролиферирующие клетки, образующие характерное смещение вправо и вверх и апоптотирующие клетки [11]. TCR-активация клеток в присутствии провоспалительных цитокинов (IL-1 β и IL-6) приводила к перераспределению клеток в пользу пролиферирующих. Количество клеток внутри каждой популяции выражали как процент от общего количества клеток. Файлы данных были обработаны в программе CytExpert 2.0 («Beckman Coulter», США).

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 6 при помощи критерия Вилкоксона. Результаты представлены в виде медианы, нижней и верхней квартилей (Me (Q1–Q3)). Различия считали достоверными при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Известно, что основным транскрипционным фактором Th17 является ROR- γ t, который индуцируется во время дифференцировки антиген-стимулированных Т-хелперов в направлении Th17 в ответ на IL-6. IL-6, в свою очередь, опосредует свое действие с помощью активации сигнального белка и активатора транскрипции STAT3 [5]. Помимо этого, важным фактором

дифференцировки этих клеток является IL-1 β , который может усиливать действие IL-6 и IL-23. Именно из этих факторов складывается стимул для дифференцировки наивных Т-лимфоцитов в Th17 [9]. Для дифференцировки Th17-клеток, как и для любых других Т-хелперов, важны сигналы, поступающие от TCR, и его активация является ключевым фактором в индукции Th17. TCR-активация индуцирует транскрипционные факторы NFAT, NF- κ B и AP-1, которые необходимы для продукции провоспалительных цитокинов Th17-клетками. Таким образом, наша экспериментальная система имитирует все необходимые для поляризации Т-хелперов в фенотип Th17 стимулы.

В нашем исследовании самостоятельный эффект поляризации в Th17 (TCR-активация в присутствии провоспалительных цитокинов) заключался в существенном (более, чем в 7 раз) повышении экспрессии ROR- γ t Т-хелперами (Табл. 1). При изучении влияния ТБГ на дифференцировку Th17 установлено, что ТБГ в концентрации, соответствующей последнему триместру беременности (100 мкг/мл), подавляет количество CD4⁺-лимфоцитов, экспрессирующих транскрипционный фактор ROR- γ t (Табл. 1).

Учитывая, что процессы дифференцировки Th17 сопровождаются активной пролиферацией этих клеток, мы оценили также влияния ТБГ на

пролиферацию активированных Т-хелперов методом дифференциального гейтирования. Установлено, что самостоятельный эффект TCR-активации в присутствии провоспалительных цитокинов (IL-1 β и IL-6) заключался в существенном увеличении процента пролиферирующих CD4⁺-клеток (с 11,32 (9,32–15,63) до 42,33 (34,03–50,14)), которое сопровождалось одновременным снижением процента не пролиферирующих клеток (с 83,56 (77,85–97,53) до 47,84 (39,47–53,57)), при этом уровень апоптотирующих клеток не изменялся (Табл. 1). В целом, это свидетельствует об адекватной активации CD4⁺-клеток в представленной экспериментальной модели. Важно отметить, что полученные данные согласуются с аналогичными экспериментами, где мы изучали пролиферацию TCR-активированных Т-хелперов в присутствии IL-2 [4].

Установлено, что внесение в культуры активированных лимфоцитов ТБГ в концентрациях 10 и 100 мкг/мл изменяло соотношение пролиферирующих и не пролиферирующих клеток. Так, высокая доза ТБГ снижала процент пролиферирующих Т-хелперов, в то время как концентрации 10 и 100 мкг/мл повышали количество не пролиферирующих клеток (Табл. 1). Таким образом, ТБГ в нашем исследовании прежде всего подавляет пролиферацию активированных CD4⁺-лимфоцитов, индуцированных в фенотип Th17.

Таблица 1. Влияние ТБГ на дифференцировку и пролиферативный статус CD4⁺-лимфоцитов, поляризованных в фенотип Th17 (n=11, Me (Q1 – Q3))

% клеток	Контроль (без активаторов)	(+ TCR-активатор, IL-1 β , IL-6)			
		Контроль	ТБГ (1 МЕ/мл)	ТБГ (10 МЕ/мл)	ТБГ (100 МЕ/мл)
Не пролиферирующие клетки	83,56 (77,85–97,53)	47,84 (39,47–53,57)*	52,94 (32,32–54,27)	49,22 (34,03–53,09)#	50,24 (31,39–53,88)#
Пролиферирующие клетки	11,32 (9,32–15,63)	42,33 (34,03–50,14)*	36,49 (32,32–39,65)	39,39 (33,56–47,00)#	40,68 (31,39–49,79)#
Апоптотирующие клетки	8,12 (7,34–11,45)	9,88 (9,23–12,72)	9,76 (8,83–13,43)	10,23 (9,29–13,67)	10,87 (9,68–12,61)
ROR- γ t ⁺ в общем гейте	1,23 (0,78–2,65)	77,93 (74,39–83,75)*	76,65 (75,32–82,64)	75,77 (73,54–81,56)#	68,15 (64,36–72,74)#
ROR- γ t ⁺ в гейте пролиферирующих клеток	1,02 (0,37–1,89)	80,73 (76,29–83,94)*	80,1 (74,11–82,77)	78,62 (73,48–82,36)	69,28 (65,63–76,06)#
ROR- γ t ⁺ в гейте не пролиферирующих клеток	1,35 (0,65–1,76)	71,51 (63,72–76,26)*	71,59 (63,83–75,80)	69,87 (63,89–73,58)	59,30 (57,50–68,08)#

Примечание: * – достоверные (p < 0,05) по w-критерию Вилкоксона различия между контролем без активатора и контролем с активаторами; # – достоверные (p < 0,05) по w-критерию Вилкоксона различия между контролем с активаторами и экспериментальными пробами.

В заключение мы проанализировали уровень экспрессии ROR- γ t в зависимости от пролиферативного статуса клетки — то есть в пролиферирующем и не пролиферирующем гейтах лимфоцитов. Было показано, что ТБГ в высокой концентрации (100 мкг/мл) снижает экспрессию ROR- γ t как в пролиферирующих, так и в не пролиферирующих клетках. Это довольно интересный результат, так как не пролиферирующие, долгоживущие клоны Т-хелперов, по-видимому участвуют в формировании иммунной памяти.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что при спонтанных абортах пропорция Th17/Treg повышается в сторону Th17, что сопровождается повышением уровня IL-17A в периферической крови. В то же время, нормальная беременность сопровождается снижением Th17 в периферической крови [9]. Вполне вероятно, что ТБГ, снижая активность этих клеток, оказывает фетопротекторный эффект в ситуации *in vivo*.

Анализируя полученные результаты, очевидно, что низкая концентрация ТБГ (соответствующая I триместру беременности) не оказывает значимых эффектов на дифференцировку Th17, в то время как именно в это время клетки полуаллогенного эмбриона активно экспрессируют антигены МНС отцовского гаплотипа. Этот период опасен с точки зрения самопроизвольных иммунных абортов, однако именно I триместр сопровождается пиковым подъемом уровня хорионического гонадотропина (ХГ) [8]. Известно, что ХГ активно модулирует дифференцировку Treg/Th17, оказывая Treg-стимулирующие и Th17-угнетающие эффекты в аналогичной модели клеток [1]. Вероятно, после снижения уровня ХГ во II–III триместрах, его «эстафету» в модуляции минорных регуляторных субпопуляций (Treg, Th17) принимает на себя ТБГ, концентрация которого в динамике беременности постепенно возрастает [2].

ВЫВОДЫ

Таким образом, ТБГ в высоких концентрациях, соответствующих II–III триместру беременности оказывает выраженный супрессивный эффект на провоспалительную субпопуляцию Т-хелперов — Th17, который выражается в подавлении пролиферации и снижении уровня экспрессии ROR- γ t⁺, ключевого мастер-регулятора этих клеток.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: 01201353248 («ИЭГМ УрО РАН»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Заморина С. А., Ширшев С. А.* Хорионический гонадотропин — фактор индукции иммунной толерантности при беременности. Иммунология. 2013, 34(2), 105–107. [*Zamorina S. A., Shirshov S. A.* Chorionic gonadotropin — a factor in the induction of immune tolerance during pregnancy. Immunology. 2013, 34 (2), 105–107.]
2. *Посисеева Л. В., Назаров С. Б., Татаринцев Ю. С.* 2004. Трофобласт-специфический бета-гликопротеин в акушерстве и гинекологии, ОАО «Издательство Иваново», Иваново, 240 с. [*Posiseeva L. V., Nazarov S. B., Tatarinov Yu. S.* 2004. Trophoblast-specific beta glycoprotein in obstetrics and gynecology, Ivanovo Publishing, OJSC, Ivanovo, 240 p.]
3. *Раев М. Б.* Способ выделения и очистки трофобластического β -1-гликопротеина. Патент РФ № 2367449 от 20.09.2009. / «Изобретения. Полезные модели». — 2009. — № 26. [*Raev M. B.* A Method for the Isolation and Purification of Trophoblastic B-1-Glycoprotein. Patent of the Russian Federation 2367449, published on 2006, September 20, Bul. 26.]
4. *Черешнев В. А., Тимганова В. П., Заморина С. А., Боцкова М. С., Храмов П. В., Кропанева М. Д., Раев М. Б.* Роль альфа-фетопротеина в дифференцировке регуляторных Т-лимфоцитов. Доклады академии наук, 2017, 477(4), 496–499. [*Chereshnev V. A., Timganova V. P., Zamorina S. A., Bochkova M. S., Khramtsov P. V., Kropaneva M. D., Raev M. B.* The role of alpha-fetoprotein in the differentiation of regulatory T-lymphocytes. Doklady Biological Sciences. 2017. T. 477. C. 496.]
5. *Alisa A., Boswell S., Pathan A. A., Ayaru L., Williams R., Behboudi S.* Human CD4(+) T cells recognize an epitope within alpha-fetoprotein sequence and develop into TGF-beta-producing CD4(+) T cells. J. Immunol., 2008, 180, 5109–5117.
6. *Annunziato F., Cosmi L., Liotta F., Maggi E., Romagnani S.* The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. Int Immunol. 2008, 20(11), 1361–1368.
7. *Castro G., Liu X., Ngo K., De Leon-Tabaldo A., Zhao S., Luna-Roman R., Yu J., Cao T., Kuhn R., Wilkinson P., Herman K., Nelen M. I., Blevitt J., Xue X., Fourie A., Fung-Leung W. P.* ROR γ t and ROR α signature genes in human Th17 cells. PLoS One 2017, 12 (8): e0181868. doi: 10.1371/journal.pone.0181868.
8. *Cole L. A.* HCG, the wonder of today's science. Reprod. Biol Endocrinol. 2012, 10. 24.
9. *Saito S., Nakashima A., Shima T., Ito M.* Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. Am. J. Reprod. Immunol. 2010, 60(63), 601–610.
10. *Santner-Nanan B., Peek M. J., Khanam R., Richards L., Zhu E., Fazekas de St. Groth. B., Nanan R.*

Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. *J. Immunol.* 2009, 83(11), 7023–7030.

11. Timganova V., Bochkova M., Khramtsov P., Kochurova S., Rayev M., Zamorina S. Effects of Pregnancy-specific β -1-glycoprotein on the Helper T Cell Response. *Arch. Biol. Sci.* 2019, 71(2), 369–378.

EFFECT OF PREGNANCY-SPECIFIC β 1-GLYCOPROTEIN ON THE DIFFERENTIATION AND PROLIFERATION OF TH17-POLARIZED HELPER T CELLS

© 2019 V. P. Timganova^{1*}, M. S. Bochkova¹, A. P. Kalugina², P. V. Khramtsov^{1,2}, M. B. Raev^{1,2}, S. A. Zamorina^{1,2}

*E-mail: timganovavp@gmail.com

¹«Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms Ural Branch Russian Academy of Sciences», Perm, Russia;

²Perm State University, Perm, Russia

Received: 23.05.2019. Accepted: 30.06.2019

The effect of the native (non-recombinant) pregnancy specific β 1-glycoprotein (PSG) preparation on the differentiation and proliferation of Th-17 polarized helper T cells was studied. The object of the study was the culture of “naive” helper T cells (CD4⁺) isolated by the immunomagnetic separation. Cells were polarized into the Th17 phenotype using TCR-activator and pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and IL-6). It was shown that PSG had a suppressive effect on the Th17 cell frequency in culture (CD4⁺ROR- γ t⁺), and inhibited the proliferation of these cells, as measured by the method of differential gating. Thus, in the experimental model used, PSG had a pronounced suppressive effect on the differentiation and proliferation of T-helpers polarized into the Th17 phenotype.

Key words: pregnancy-specific β 1-glycoprotein (PSG), pregnancy, CD4⁺-lymphocytes, IL-17, T-helper 17 type (Th17)

Authors:

Timganova V. P., ✉ Ph.D. (Biology), junior researcher, laboratory of ecological immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», Perm, Russia.

614081, Perm, st. Goleva, 13, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS». Phone: +7 (342) 280-77-94, E-mail: timganovavp@gmail.com;

Bochkova M. S., Ph.D. (Biology), researcher, laboratory of ecological immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», Perm, Russia;

Kalugina A. P., student of the department of microbiology and immunology of the Perm State University's Faculty of Biology, Perm, Russia;

Khramtsov P. V., Ph.D. (Biology), researcher, laboratory of ecological immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», assistant professor of the department of microbiology and immunology of the Perm State University's Faculty of Biology, Perm, Russia;

Rayev M. B., Ph.D., MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Ecological Immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», professor of the department of microbiology and immunology of the Perm State University's Faculty of Biology, Perm, Russia;

Zamorina S. A., Ph.D., MD (Biology), leading researcher, laboratory of ecological immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», professor of the department of microbiology and immunology of the Perm State University's Faculty of Biology, Perm, Russia.