

MOLECULAR MODELLING OF FLAVONOID QUERCETIN TARGETING TO THE TOLL-LIKE RECEPTORS

Zaitsev V. G.¹, Zheltova A. A.², Nikonenko A. A.¹

¹Volgograd State University; ²Volgograd State Medical University,
Volgograd, Russia

Molecular modelling of quercetin targeting to the extracellular and cytosolic domains of human Toll-like receptors (TLR1-TLR10) was performed. We showed that quercetin can be targeted to various TRLs preferably either in extracellular domain sites (TLR4, TLR5, TLR7, TLR8) or in cytosolic domain sites (TLR1·TLR2, TLR2·TLR6).

Key words: immunoregulation, Toll-like receptors, flavonoids, quercetin, docking

ХОРИОНИЧЕСКИЙ ГОНАДОТРОПИН В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ ЛИМФОЦИТОВ

Заморина С. А.^{1,2}

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; ²Пермский
государственный национальный исследовательский университет,
Пермь, Россия

Изучали влияние хорионического гонадотропина (ХГ) на апоптоз и продукцию IL-10 и TGF- β 1 изолированными пулами естественных Т-регуляторных лимфоцитов (nTreg, CD4⁺CD25^{bright}) и предшественниками адаптивных Treg (aTreg, CD4⁺CD25⁻) в системе *in vitro*. В итоге, мы продемонстрировали, что ХГ индуцирует апоптоз nTreg, и препятствует апоптозу aTreg, не влияя на продукцию IL-10 и TGF- β 1 этими клетками.

Ключевые слова: хорионический гонадотропин (ХГ), Т-регуляторные лимфоциты (Treg), TGF- β 1, IL-10, апоптоз

Плацентарный гормон хорионический гонадотропин (ХГ) обладает плейотропными эффектами, реализуемыми, в том числе и на уровне иммунной системы. Максимальная концентрация ХГ во время беременности (~100 МЕ/мл) совпадает с экспрессией антигенов МНС I класса эмбриональными клетками (I триместр), распознавание которых приводит к процессам иммунного отторжения. Известно, что полиморфизмы в структуре генов (CGB5 и CGB8) β -субъединицы ХГ связаны с повторяющимися самопроизвольными абортами [1]. Некоторые миссенс-мутации в структуре этих генов приводят к потере биологической активности ХГ, вследствие чего у носительниц таких миссенс-мутаций в анамнезе верифицируются повторяющиеся самопроизвольные аборт [1].

В целом, ХГ считается одним из основных факторов, формирующих иммунную толерантность во время беременности [2]. Иммунная толерантность тесно ассоциирована с активностью Т-регуляторных лимфоцитов (Treg), которые позиционируются как истинные иммуносупрессоры. Известно, что ХГ повышает содержание Treg на периферии, и привлекает их непосредственно в зону фето-плацентарного взаимодействия [3]. В отношении Treg ранее нами было установлено, что ХГ индуцирует генерацию адаптивных Treg (aTreg) и их функциональную активность, ассоциированную с экспрессией CTLA-4 в культуре активированных CD4⁺-клеток [4]. Однако, эффекты гормона на уровне изолированных культур естественных Treg (nTreg) ранее не изучались.

Целью работы являлась оценка роли ХГ в регуляции функциональной активности изолированных Treg в системе *in vitro*.

Материал и методы. Исследовали периферическую кровь небеременных женщин репродуктивного возраста ($n=8$). В эксперименте использовали суспензию мононуклеарных клеток (МНК), которые получали центрифугированием в градиенте плотности фиколл-урографина. Далее методом иммуномагнитной сепарации («Dynabeads Regulatory CD4⁺CD25⁺T-cell Kit»; «Invitrogen», США) из суспензии мононуклеаров выделяли CD4⁺CD25^{bright} (nTreg, CD4⁺CD25^{bright}FOXP3⁺), в процессе выделения была изолирована также субпопуляция CD4⁺CD25⁻ (предшественники aTreg). Полученные клетки (1×10^5 - 5×10^6 кл/мл) инкубировали в плоскодонном 96-луночном планшете, в полной питательной среде (среда RPMI-1640, содержащая 10% FCS, 1 mM HEPES, 2 mM L-глутамин, 200 ед/мл гентамицин), в течение 72 ч при 37 °C, 5% CO₂ с ХГ в физиологических концентрациях 10 и 100 МЕ/мл и активирующими частицами («Dynabeads Human T-activator CD3/CD28», «Invitrogen», США). Апоптоз оценивали окрашиванием аннексином-V (AnV) и йодистым пропидием (PI) коммерческим набором («Annexin V – FITC Kit» «Immunotech», Франция). Результаты представлены как процент клеток в раннем (AnV⁺/PI⁻) и позднем (AnV⁺/PI⁺) апоптозе. Уровень цитокинов (IL-10, TGF-β1) в супернатантах оценивали иммуноферментным методом при помощи диагностических наборов, результаты представлены как пг/мл («Цитокин», Россия; «eBioscience», США, соответственно). Данные представлены в виде медианы с нижним и верхним квартилем (Me(Q1-Q3)). Проверку статистических гипотез об отсутствии различий с контролем (проба без ХГ) осуществляли с помощью *u*-критерия Манна-Уитни ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение. Как уже было сказано, увеличение Treg в периферической крови во время беременности может происходить как за счет индукции адаптивных Treg (aTreg), что уже было продемонстрировано ранее [4], так и путем усиления пролиферации nTreg [5], поэтому представлялось важным оценить влияние ХГ на функциональную активность nTreg. Установлено, что ХГ угнетал ранний апоптоз nTreg (контроль: 6,64 (5,33-9,54); ХГ 100 МЕ/мл: 4,57 (2,57-6,78)), но одновременно стимулировал поздний апоптоз этих кле-

ток (контроль: 28,3 (20,04-59,34) ХГ 100 МЕ/мл: 62,26 (58,28-83,56)). В целом, под воздействием ХГ число nTreg в апоптозе увеличивалось (контроль: 34,76 (32,32-70,65); ХГ 100 МЕ/мл: 70,61 (63,85-79,91)). В супернатантах культур nTreg оценивали уровень IL-10 и TGF-β1, поскольку эти цитокины являются ключевыми с точки зрения реализации супрессорных эффектов Treg. ХГ не оказывал достоверных эффектов на продукцию этих цитокинов, однако, можно говорить о видимой тенденции к снижению их уровня (IL-10: контроль: 10,13 (9,90-11,86); ХГ 100 МЕ/мл: 5,43 (5,07-6,43); TGF-β1: контроль: 19,14 (15,09-27,46); ХГ 100 МЕ/мл: 15,6 (13,60-18,42)). Вероятно, снижение уровня цитокинов связано с уменьшением количества не апоптотирующих клеток.

На уровне предшественников aTreg установлено, что ХГ достоверно снижал количество клеток, находящихся как в раннем, так и позднем апоптозе, способствуя, таким образом, выживанию aTreg (ранний апоптоз – контроль: 3,98 (2,24-7,64); ХГ 100 МЕ/мл: 1,91 (1,25-2,77), поздний апоптоз – контроль: 7,39 (6,54-9,11); ХГ 100 МЕ/мл: 4,47 (3,93-5,29)). В отношении цитокинов установлено, что ХГ не влиял на продукцию IL-10 и TGF-β1 aTreg (IL-10: контроль: 436 (370-512); ХГ 100 МЕ/мл: 347 (223-431); TGF-β1: контроль: 8,87 (7,50-16,79); ХГ 100 МЕ/мл: 7,62 (6,43-10,60)).

Таким образом, на уровне nTreg показано, что в целом ХГ индуцирует их апоптоз, за исключением 2-8% клеток, находящихся в раннем апоптозе, на которые ХГ оказывает антиапоптотический эффект. Довольно трудно интерпретировать этот факт без дополнительных исследований, поскольку ранний апоптоз может быть обратимым явлением и рассматриваться как вариант активации клетки. ХГ не влиял на продукцию IL-10 и TGF-β1 nTreg. По-видимому, это связано с тем, что секреция иммуносупрессорных цитокинов не является основным механизмом реализации эффектов nTreg. Одновременно, на уровне предшественников aTreg, ХГ оказывал антиапоптотический эффект на эти клетки, также не влияя на продукцию цитокинов. По-видимому, ХГ «заинтересован» в дифференцировке и сохранении функциональной активности aTreg и именно за счет этих клеток происходит расширение пула супрессоров во время беременности. Таким образом, ХГ участвует в формировании иммунной толерантности прежде всего за счет адаптивных Treg.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nagirnaja L., Venclovas C., Rull K. et al. Structural and functional analysis of rare missense mutations in human chorionic gonadotrophin β -subunit. *Mol. Hum. Reprod.* 2012, 18, 379-390.
2. Schumacher A., Heinze K., Witte J. et al. Human chorionic gonadotropin as a central regulator of pregnancy immune tolerance. *J Immunol.* 2013, 190, 2650-2658.
3. Schumacher A., Brachwitz N., Sohr S. et al. Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into the fetal-maternal interface during early human pregnancy. *J. Immunol.* 2009, 182, 5488-5497.
4. Заморина С. А., Ширшев С. А. Хорионический гонадотропин – фактор индукции иммунной толерантности при беременности. *Иммунология* 2013, 34(2), 105-107.
5. Hori S., Nomura T., Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2004, 299, 1057-1061.

HORIONIC GONADOTROPIN IN REGULATION OF THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF T-REGULATORY LYMPHOCYTES

Zamorina S. A.^{1,2}

¹*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS;*

²*Perm State National Research University, Perm, Russia*

The effect of human chorionic gonadotropin (HCG) on apoptosis and production of IL-10 and TGF- β 1 by isolated pools of natural T-regulatory lymphocytes (nTreg, CD4⁺CD25^{bright}) and precursors of adaptive Treg (aTreg, CD4⁺CD25⁻) in the in vitro system was studied. As a result, we demonstrated that HCG induces apoptosis of nTreg and interferes with aTreg apoptosis, without affecting the production of IL-10 and TGF- β 1 by these cells.

Key words: human chorionic gonadotropin (HCG), T-regulatory lymphocytes (Treg), TGF- β 1, IL-10, apoptosis

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОВ И ГАПЛОТИПОВ СИСТЕМЫ HLA II КЛАССА В ПОПУЛЯЦИИ НАГАЙБАКОВ В СРАВНЕНИИ С ДРУГИМИ ПОПУЛЯЦИЯМИ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ И ЕВРАЗИИ

Зарипова О. Н.¹, Беляева С. В.^{1,2},
Сташкевич Д. С.¹, Суслова Т. А.^{1,2}

¹*ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет»;*

²*ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови»,
Челябинск, Россия*

В статье освещены вопросы популяционной иммуногенетики, в частности сравнительная характеристика популяции нагайбаков, проживающих в Челябинской области по генам и гаплотипам *HLA* II класса с основными популяциями Челябинской области (русскими, татарами и башкирами) и генетические расстояния популяции нагайбаков с некоторыми популяциями Евразии по генам *HLA* II класса. По результатам исследования популяция нагайбаков по частотам генов и гаплотипов *HLA* II класса в большей степени отличается от популяции башкир Челябинской области. Согласно оценке генетических расстояний к популяции нагайбаков ближе всех по генам *HLA* II класса расположены популяции русских, татар Челябинской области и популяция чуваш.

Ключевые слова: нагайбаки, *HLA*, гаплотипы