

МЕХАНИЗМЫ ГОРМОНАЛЬНО ОБУСЛОВЛЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ NK-КЛЕТОК В ПЕРИОД БЕРЕМЕННОСТИ*

С.В. Ширшев, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

И.В. Некрасова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

О.Л. Горбунова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

Е.Г. Орлова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

И.Л. Масленникова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

Исследовано влияние гормонов репродукции (ХГ, эстриол, кисспептин, лептин, грелин) на фенотипические характеристики, продукцию цитокинов и уровень литической активности естественных киллерных (NK)-клеток. Изучена роль микроРНК в гормональных механизмах формирования регуляторных и цитотоксических субпопуляций NK-клеток при беременности.

Установлено, что гормоны репродукции смещают баланс NK-клеток с цитотоксической субпопуляции в сторону регуляторной. При этом происходит усиление экспрессии ингибиторной молекулы NKG2A и L-селектина. Исследуемые гормоны в концентрациях, соответствующих их уровню во время беременности, модулируют цитокиновый спектр, характерный для регуляторной NK3 субпопуляции NK-клеток. Выявленное действие гормонов, проявляющееся в снижении цитотоксического потенциала сепарированных NK-клеток, в некоторых случаях реализуется за счет регуляции уровня специфических микроРНК.

В результате проведенной работы удалось выявить новые физиологические механизмы эндокринного контроля NK-клеток иммунной системы матери, которые могут реализовываться в разные периоды беременности.

Ключевые слова: *гормоны гестации, NK-клетки, микроРНК, гранзимы, перфорин, цитокины, ингибиторные рецепторы.*

Введение

Уникальность процесса беременности заключается не только в преодолении трансплантатом иммунных механизмов, но и в становлении новых эндокринных взаимодействий, обеспечивающих на качественно новом уровне нормальное сосуществование и развитие двух организмов. Будущий посредником в создании нового гормо-

нального зеркала системы мать-плод, плацента играет роль железы внутренней секреции и вырабатывает гормоны, используя материнские и фетальные предшественники [1]. Стероидные и белковые гормоны беременности обладают выраженным влиянием на иммунитет. Во время беременности, присутствуя в крови матери в значительно более высоких, чем вне бере-

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Пермского края (грант № 13-04-96035).

менности, концентрациях, они индуцируют целый ряд изменений в иммунной системе матери [2–4]. Гестационный процесс затрагивает многие системы организма, в том числе и иммунную, что сопровождается изменениями в функциональной активности различных популяций лейкоцитов, направленными на сохранение плода. Естественные киллерные (NK) клетки представляют собой популяцию лимфоцитов врожденного иммунитета, способных к проявлению цитотоксической, а также регуляторной активности. NK-клетки доминируют среди лимфоидных клеток, локализованных в децидуальной оболочке во время беременности. Помимо реализации своего цитотоксического действия NK-клетки имеют решающее значение для нормального развития беременности [5]. Они продуцируют цитокины, хемокины, ферменты, факторы роста сосудов, тем самым способствуя формированию и моделированию спиральных артерий, плацентации и регуляции инвазии трофобласта [6]. Фетотрофические функции NK-клеток проявляются под воздействием специфических регуляторных сигналов, к которым, в первую очередь, можно отнести гормоны фетоплацентарного комплекса.

Цель исследования – изучить влияние гормонов репродукции: хорионического гонадотропина (ХГ), киссептина, эстриола (Е₃), лептина и грелина в концентрациях, соответствующих их уровням в периферической крови во время физиологически протекающей беременности на функциональную активность NK-клеток.

Материалы и методы исследования

В работе использованы NK-лимфоциты, выделенные из периферической крови женщин репродуктивного возраста методом иммуномагнитной сепарации.

Гормоны применяли в физиологических концентрациях, соответствующих разным триместрам беременности. Для стимуляции развития NK-клеток при культивировании *in vitro* использовали интерлейкины (IL)-2, IL-12 и IL-15.

NK-клетки культивировали в полной питательной среде в присутствии гормонов репродукции в течение 3 суток, после чего оценивали их фенотип методом проточной цитометрии. Определяли следующие маркеры: для идентификации NK-клеток – CD56, NKp46, оценки уровня активации – CD94/NKG2A, оценки хоминга NK-клеток – экспрессия L-селектина (CD62L).

В клеточных супернатантах иммуноферментным методом определяли уровень цитокинов IFN- γ , IL-4, IL-10, TGF- β , IL-17.

Методом real-time PCR оценивали экспрессию микроРНК (hsa-miR-155, hsa-miR-29a, hsa-miR-30c-1*, hsa-miR-378b) в сепарированных NK-клетках.

Результаты исследования

При исследовании влияния гормонов на сепарированные по специфическому маркеру NKp46 NK-клетки установлено, что в концентрациях, характерных для I и III триместров беременности, только Е₃ и киссептин повышают процент CD56^{bright} NK-клеток. При этом Е₃ дополнительно снижает уровень цитотоксических NK-клеток – CD56^{dim} (рис. 1).

ХГ, вносимый в культуры фракционированных NK лимфоцитов в концентрации, свойственной для I триместра беременности, усиливает экспрессию молекул селектина CD62L, определяющих распределение клеток в маточно-плацентарной зоне, и достоверно снижает секрецию абортотропного цитокина IFN- γ . При этом гормон снижает внутриклеточный уровень молекул перфорина и гранзима В. Это действие сопряжено с повышенным содержанием miR-30c-1*, которая позитивно регулирует цитолитический потенциал NK-клеток [7], что, по-видимому, препятствует регулируемому действию гормона на экспрессию ингибиторной молекулы NKG2A и противовоспалительного цитокина TGF- β . В концентрации, характерной для III триместра беременности, ХГ не влияет на экспрессию CD62L, но достоверно увеличивает число клеток, экспрессирующих молекулу NKG2A. При

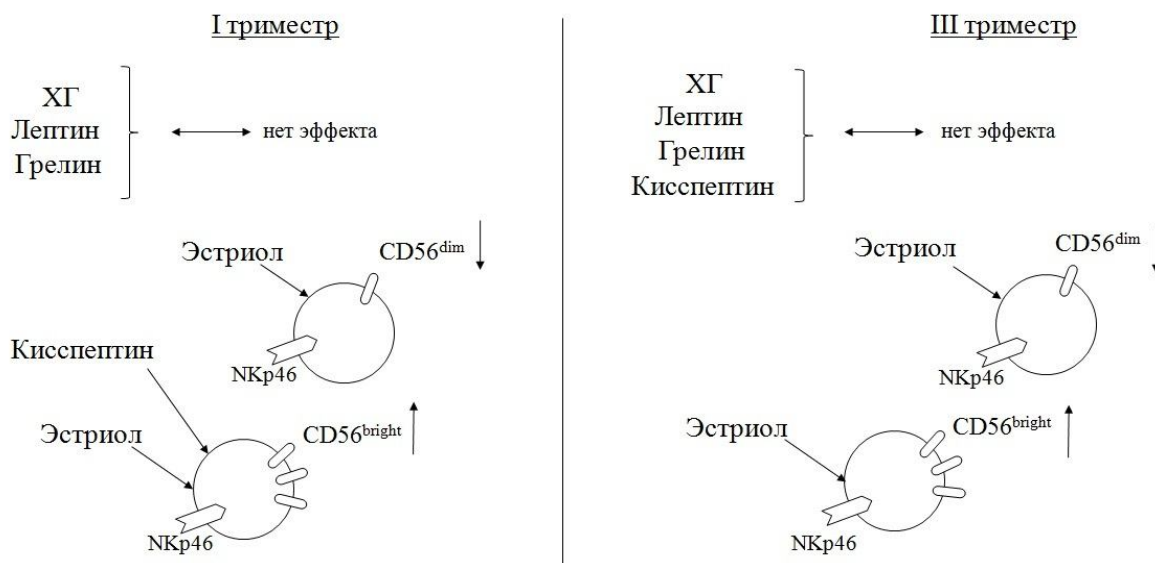


Рис. 1. Влияние гормонов репродукции на степень экспрессии молекул CD56 на NKp46⁺-клетках в культурах сепарированных NK-лимфоцитов

этом отменяется угнетающий эффект на экспрессию молекул перфорина с реципрокной регуляцией гранзима В и А. Гормон существенно усиливает секрецию TGF-β, одновременно снижает уровень продуцируемых цитокинов IL-4, IL-10, IL-17 и, что наиболее важно – IFN-γ. Данные эффекты гормона сопровождаются снижением уровня miR-30c-1*, miR-155, которая стимулирует продукцию IFN-γ [7, 8], и miR-29a – угнетающей синтез молекул перфорина [9], что и служит механизмом отмены действия гормона, которым он обладает в концентрации I триместра беременности (рис. 2).

Как видно из рис. 3, E₃ в концентрации, характерной для I триместра беременности, повышает число NK-клеток, экспрессирующих молекулы CD62L и NKG2A, не влияя на уровень перфорина и гранзимов. E₃ угнетает продукцию цитокинов, за исключением TGF-β. Эффект гормона связан со снижением активирующей функцию NK-клеток miR-30c-1*, miR-155 и стимулированием образования miR-378b, негативно регулирующей синтез гранзима В [10]. Аналогичные эффекты E₃ может проявлять и в III триместре, дополнительно усиливая секрецию TGF-β.

При оценке регуляторного потенциала лептина установлено, что в концентрации

10 нг/мл (I триместр беременности) гормон не оказывает достоверного влияния на исследованные показатели. Однако в концентрации 35 нг/мл (III триместр беременности) лептин достоверно повышает число CD62L⁺ клеток и угнетает продукцию только IL-4 и IL-10 NK-лимфоцитов. При этом он снижает все исследованные микроРНК (рис. 4).

Грелин является гормоном-антагонистом лептина. Эта антагонистическая пара принимает активное участие в регуляции липидного и энергетического обменов, что определяет их важнейшую роль в репродукции. Изучение действия грелина на фенотип и функциональную активность NK-клеток показала, что в концентрации, характерной для I триместра беременности, грелин повышает внутриклеточный уровень гранзима А, не влияя на остальные исследуемые показатели. При этом он достоверно снижает уровень miR-30c-1*, miR-155, miR-29a, что не позволяет говорить об их заинтересованности в данном эффекте гормона. По-видимому, через данные микроРНК гормоном регулируются иные функции NK-клеток. В концентрации, характерной для III триместра, гормон достоверно снижает секрецию IL-10 и уменьшает уровень miR-155 (рис. 5).

Исследование действия кисспептина

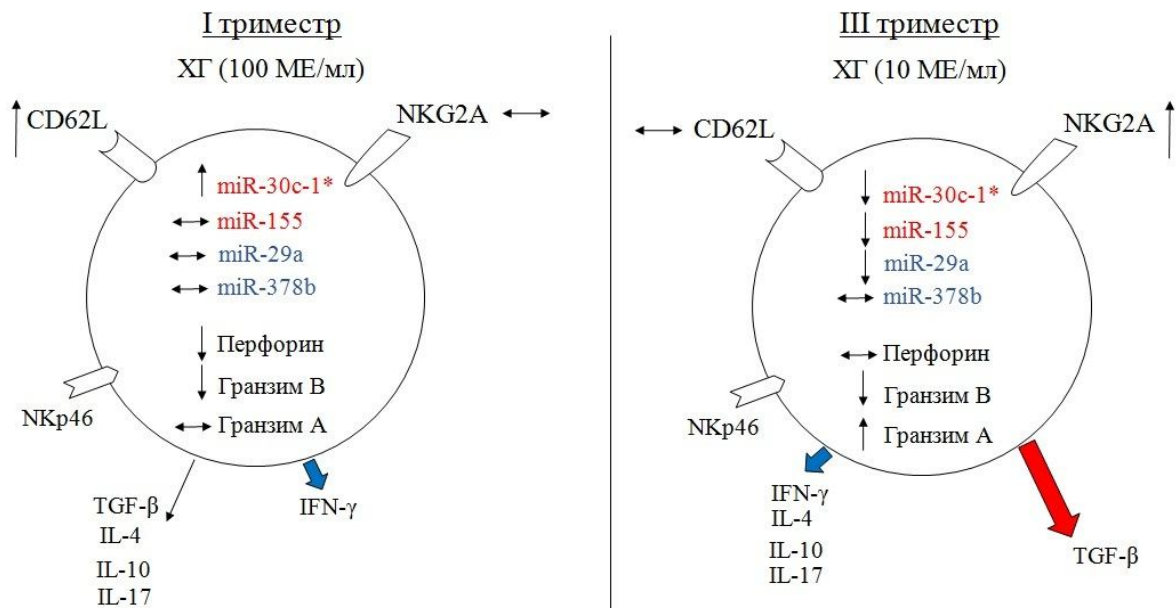


Рис. 2. Влияние ХГ на функциональную активность НК-клеток в разные периоды беременности

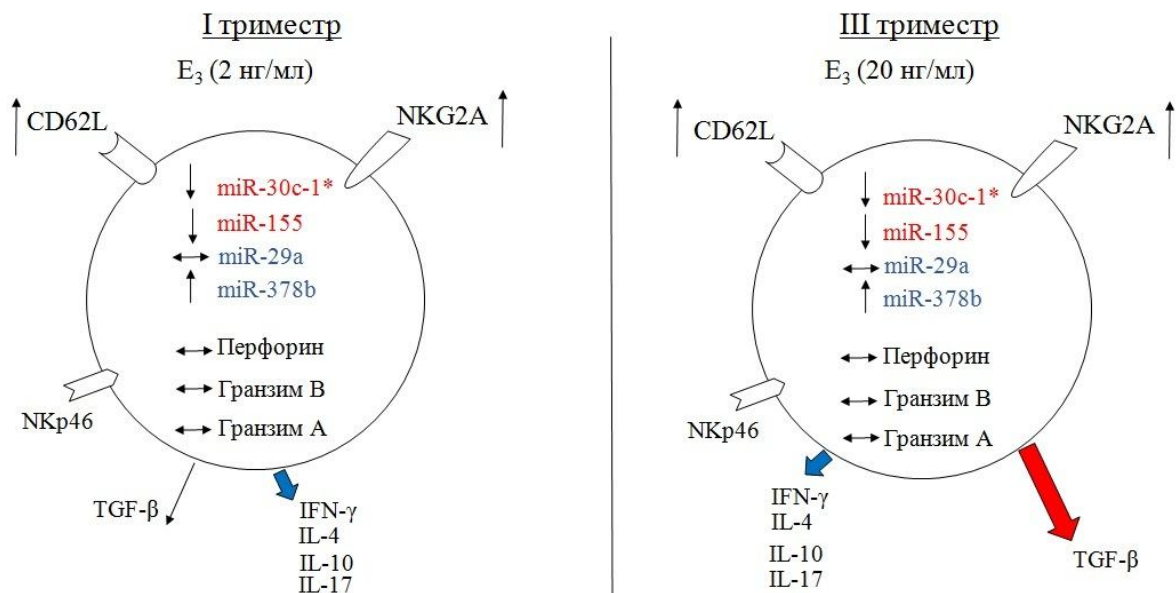


Рис. 3. Влияние Е3 на функциональную активность НК-клеток в разные периоды беременности

показало, что гормон в концентрации 4,6 пМ (I триместр беременности) увеличивает количество НК-клеток, экспрессирующих молекулу CD62L, что существенно именно для этого периода, и угнетает продукцию изучаемых цитокинов за исключением TGF-β. Оценка влияния ксипептина на микроРНК показала зависимость действия гормона от данного механизма регуляции. В III триместре ксипептин потенциально способен реализовать аналогичные эффекты, которые ему

присущи в I триместре, дополнительно усиливая продукцию супрессорного цитокина – TGF-β. При этом прослеживается четкая зависимость регуляторного действия на уровне микроРНК (рис. 6).

Известно, что НК-клетки CD56^{bright} способны продуцировать значительные количества цитокинов. В периферической крови небеременных женщин преобладают клетки NK1, продуцирующие IFN-γ [11]. В период беременности повышается количество клеток NK1, секретирующих

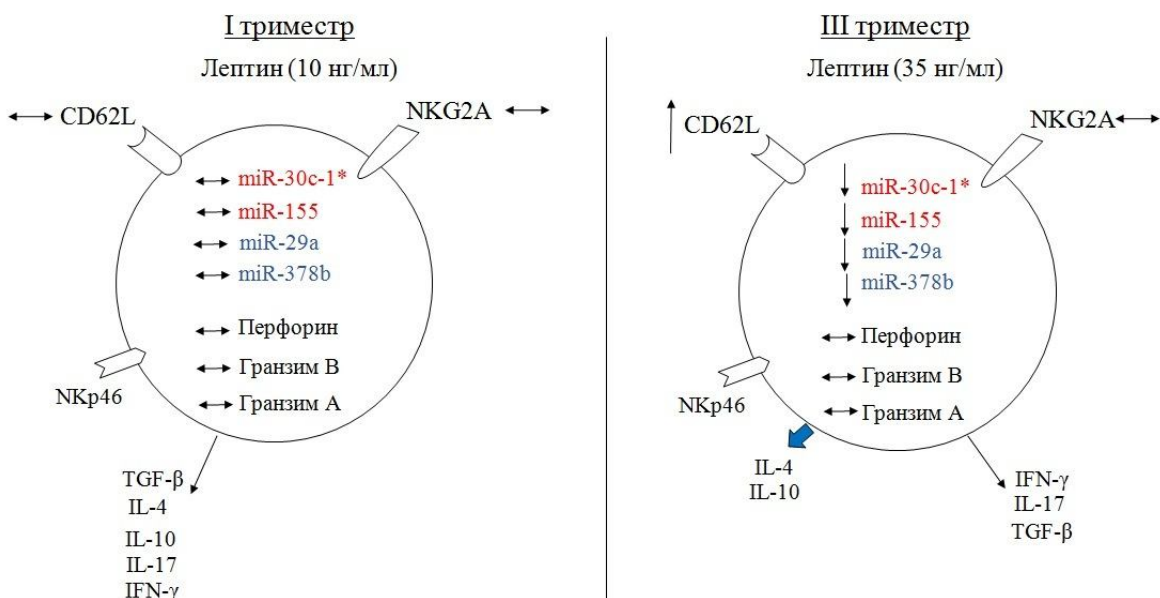


Рис. 4. Влияние лептина на функциональную активность НК-клеток в разные периоды беременности

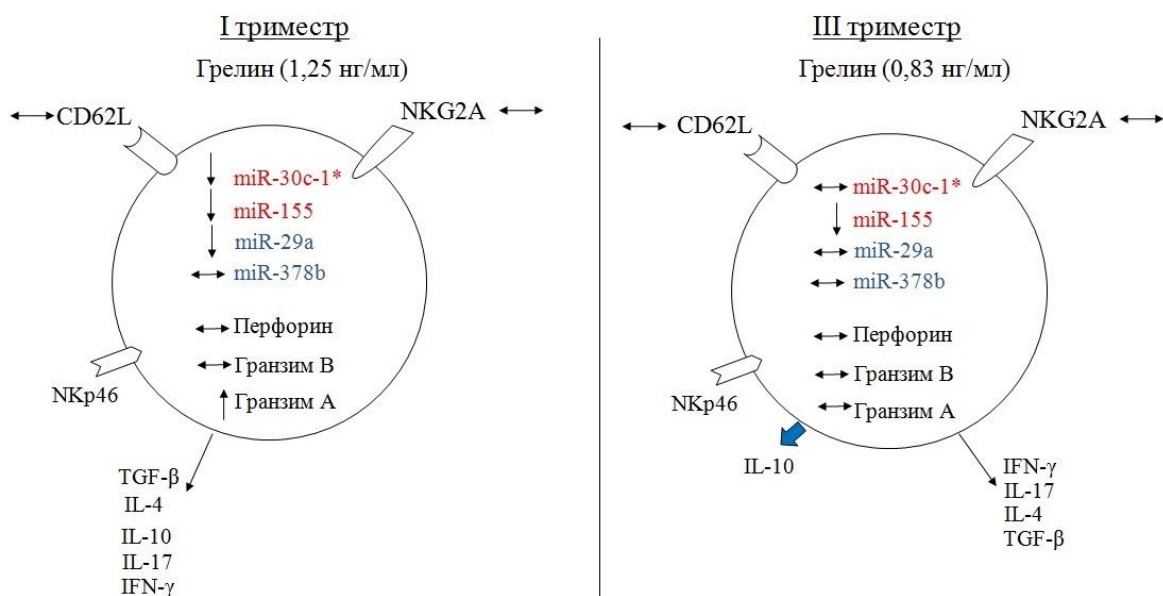


Рис. 5. Влияние грелина на функциональную активность НК-клеток в разные периоды беременности

IL-10. Децидуальные НК-клетки представлены в основном TGF-β1-продуцирующими НК3 лимфоцитами, что определяет их иммуносупрессорное действие на многие популяции лимфоцитов [11]. Учитывая это, можно утверждать, что в первой половине беременности гормоны, принимающие активное участие в гестационном процессе, блокируют все функциональные типы НК-клеток, за исключением НК3. В то же время в более поздний период они, сохраняя свое негативное действие, усиливают функционирование

НК3 субпопуляции (рис. 7).

Таким образом, можно утверждать, что исследуемые гормоны являются значимыми регуляторами функциональной активности НК-клеток иммунной системы матери в разные периоды беременности. Благодаря этому НК-клетки не только формируют пул маточных НК-лимфоцитов (CD62L⁺), но и трансформируются в регуляторный субтип НК3 с пониженным цитолитическим потенциалом. Все это создает предпосылки успешного развития физиологически протекающей беременности.

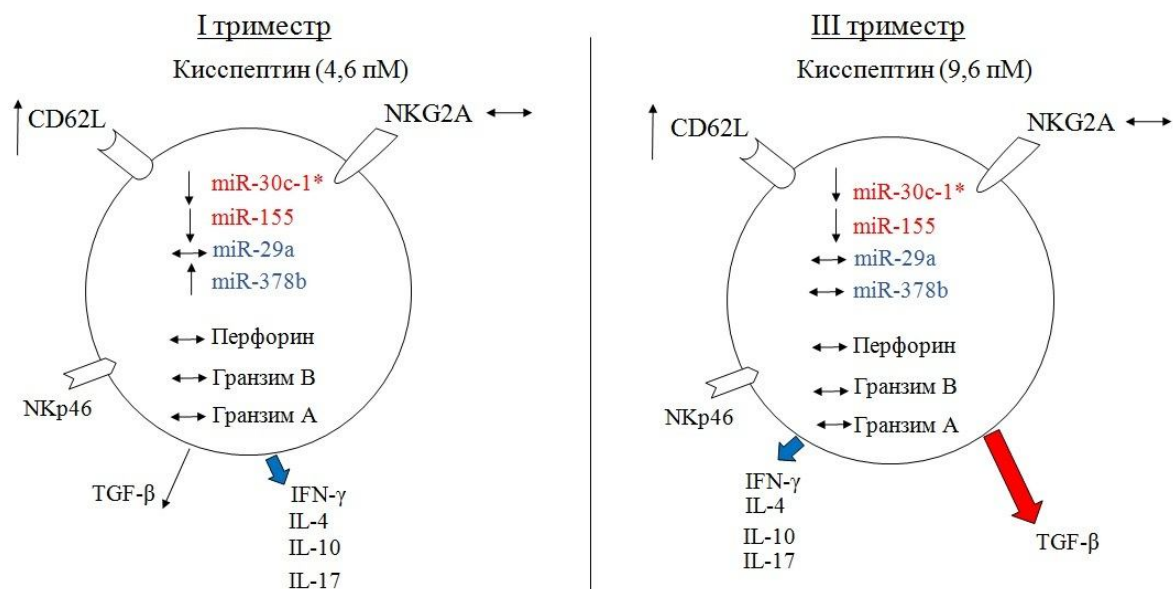


Рис. 6. Влияние кисспептина на функциональную активность НК-клеток в разные периоды беременности

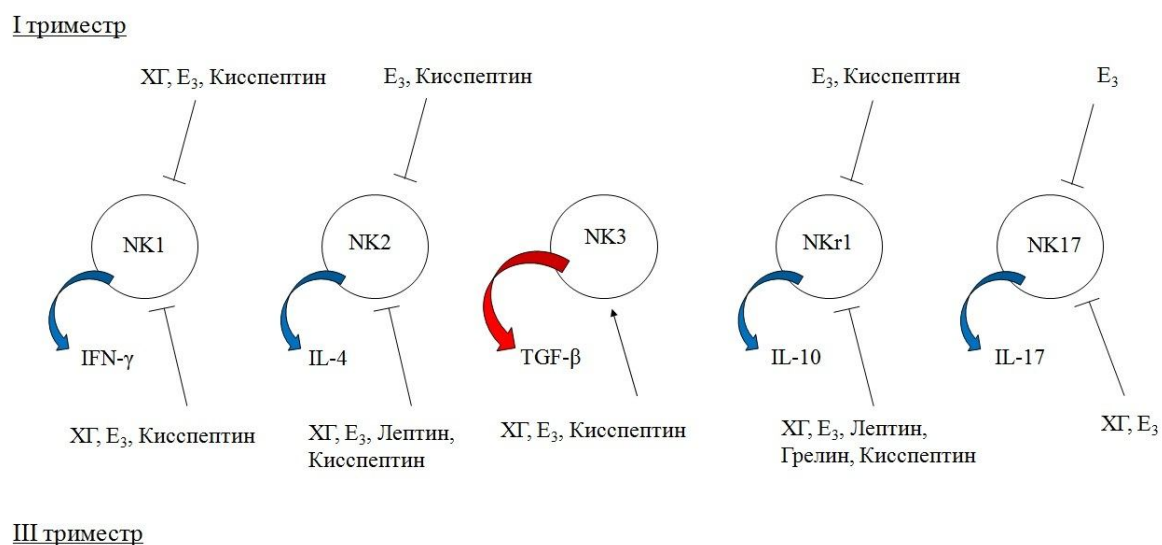


Рис. 7. Модуляция гормонами репродукции цитокинового профиля НК-клеток

Библиографический список

1. Ширишев С.В. Иммунология материнско-фетальных взаимодействий. – Екатеринбург: УрО РАН, 2009. – 582 с.
2. Hardie L., Trayhurn P., Abramovich D., Fowler P. Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy // Clin. Endocrinol. – 1997. – Vol. 47. – P. 101–106.
3. Fuglsang J., Skjaerbaek C., Espelund U., Frystyk J., Fisker S., Flyvbjerg A., Ovesen P. Ghrelin and its relationship to growth hormones during normal pregnancy // Clin. Endocrinol. – 2005. – Vol. 62. – P. 554–559.
4. Horikoshi Y., Matsumoto H., Takatsu Y., Ohtaki T., Kitada C., Usuki S., Fujino M. Dramatic elevation of plasma metastin concentrations in human pregnancy: metastin as a novel placenta-derived hormone in humans // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2003. – Vol. 2. – P. 914–919.
5. Bulmer J.M., Johnson P.M. T cell apoptosis at the maternal–fetal interface in early human pregnancy, involvement of galectin-1 // Immunology. – 1985. – Vol. 55. – P. 35–44.
6. Ashkar A.A., Di Santo J.P., Croy B.A. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy // J. Exp. Med. – 2000. – Vol. 192. – P. 259–270.

7. Gong J., Liu R., Zhuang R. et al. miR-30c-1* promotes natural killer cell cytotoxicity against human hepatoma cells by targeting the transcription factor HMBOX1 // *Cancer Sci.* – 2012. – Vol. 103(4). – P. 645–652.
8. Trotta R., Chen L., Ciarlariello D. [et al.] miR-155 regulates IFN- γ production in natural killer cells // *Blood.* – 2012. – Vol. 119(15). – P. 3478–3485.
9. Elemam N.M., Mekky R.Y., El-Ekiaby N.M. [et al.] Repressing PU.1 by miR-29a in NK cells of HCV patients, diminishes its cytolytic effect on HCV infected cell models // *Hum. Immunol.* – 2015. – Vol. 76. – P. 687–694.
10. Wang P., Gu Y., Zhang Q. [et al.] Identification of resting and type I IFN-activated human NK cell miRNomes reveals microRNA-378 and microRNA-30e as negative regulators of NK cell cytotoxicity // *J. Immunol.* – 2012. – Vol. 189. – P. 211–221.
11. Higuma-Myojo S., Sasaki Y., Miyazaki S. [et al.] Cytokine profile of natural killer cells in early human pregnancy // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2005. – Vol. 54. – P. 21–29.

MECHANISMS OF HORMONE-DRIVEN TRANSFORMATION OF NK CELLS IN PREGNANCY

S.V. Shirshhev, I.V. Nekrasova, O.L. Gorbunova, E.G. Orlova, I.L. Maslennikova

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS

The influence of reproductive hormones (HCG, estriol, kisspeptin, leptin, ghrelin) on phenotypic characteristics, cytokine production and the level of lytic activity of natural killer (NK) cells was studied. The role of miRNAs in the hormonal mechanisms of the formation of regulatory and cytotoxic subpopulations of NK cells during pregnancy was investigated.

It was established that the reproductive hormones shift the balance of NK cells from cytotoxic subpopulation to the regulatory one. Herewith, the expression of the inhibitory molecule NKG2A and L-selectin was increased. The hormones at concentrations, corresponding to their levels during pregnancy, modulate cytokine spectrum, which is characteristic of regulatory NK3 subpopulation. The revealed action of hormones, manifested in the decrease of cytotoxic potential in the separated NK cells, in some cases was realized through the regulation of the level of the specific microRNAs.

As a result of this work new physiological mechanisms of endocrine control of NK cells of the mother's immune system were identified, which could be implemented in different periods of pregnancy.

Keywords: hormones of pregnancy, NK cells, microRNA, granzymes, perforin, cytokines, inhibitory receptors.

Сведения об авторах

Ширшев Сергей Викторович, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией иммунорегуляции, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (ИЭГМ УрО РАН), 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13; e-mail: shirshhev@iegm.ru

Некрасова Ирина Валерьевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: nirina5@mail.ru

Горбунова Ольга Леонидовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: olia15_77@mail.ru

Орлова Екатерина Григорьевна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: orlova_katy@mail.ru

Масленникова Ирина Леонидовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: i.maslennikova@rambler.ru

Материал поступил в редакцию 21.10.2016 г.