

МЕХАНИЗМЫ ГОРМОНАЛЬНОГО КОНТРОЛЯ ПРОЦЕССОВ ТИМИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В АСПЕКТЕ БЕРЕМЕННОСТИ *

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

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

О.А. Логинова, *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*

Изучено влияние гормонов (хорионического гонадотропина, эстриола, лептина, грелина, киспептина) в концентрациях, сопоставимых с их содержанием в периферической крови при беременности, в регуляции процессов клеточной дифференцировки в тимусе. Установлено, что исследуемые гормоны разнонаправленно регулируют функциональную активность миелоидных и плазматоцитодных дендритных клеток тимуса, опосредуя, таким образом, регуляторные эффекты на дифференцировку контактирующих с ними тимоцитов. Гормоны модулируют экспрессию костимулирующих, активационных и ингибиторных молекул миелоидными и плазматоцитодными дендритными клетками тимуса, а также активность фермента индоламин-2,3-диоксигеназы, в целом, повышая толерогенный потенциал дендритных клеток тимуса. Премированные гормонами миелоидные и плазматоцитодные дендритные клетки тимуса оказывают оппозитные эффекты на формирование естественных регуляторных субпопуляций тимоцитов (iNKT, nTreg, Th17), способствуя успешному развитию физиологически протекающей беременности. Эффекты изучаемых гормонов на дифференцировку $\alpha\beta$ - и $\gamma\delta$ T-клеток в тимусе опосредованы влиянием на оба типа дендритных клеток тимуса, что дополняет представления о механизмах регуляции стероид-индуцированной инволюции тимуса при беременности.

Таким образом, гормоны, продуцируемые плацентой при беременности, регулируют созревание и функциональную активность дендритных клеток тимуса, модулируя их способность влиять на дифференцировку регуляторных и эффекторных популяций тимоцитов. Полученные результаты раскрывают новые механизмы гормональной регуляции тимической дифференцировки клеток иммунной системы, которые могут реализовываться в разные периоды беременности.

* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 16-44-590631-р «Гормональная регуляция тимического этапа дифференцировки лимфоцитов в аспекте беременности».

Ключевые слова: эстриол, хорионический гонадотропин, лептин, грелин, киспептин, тимоциты, дендритные клетки, субпопуляции Т-лимфоцитов ($\alpha\beta$ Т-клетки, $\gamma\delta$ Т-клетки, nTreg, nTh17, iNKT), беременность.

Введение

Беременность является физиологическим феноменом невосприимчивости клеток иммунной системы матери к полужеродным клеткам плода, заимствующим часть генетического материала от отца. В период беременности плацента в дополнение к основным репродуктивным гормонам, таким как хорионический гонадотропин (ХГ), (регулирует развитие плода и плаценты), эстриол (E_3) (регулирует рост матки и молочных желез); начинает продуцировать большое количество гормонов, в том числе пептидные гормоны лептин и грелин (оппозитные регуляторы энергетического гомеостаза), киспептин (контролирует гонадостат), которые обладают мощной иммунорегуляторной активностью [1, 6–8, 10]. Несмотря на то, что еще в 80-х годах были выявлены существенные изменения структуры и функции тимуса при различных физиологических и патологических состояниях, механизмы этих изменений в настоящее время практически не изучены, а анализ гормонального влияния на тимус ограничивается, главным образом, оценкой его массы, клеточности или секреторной функции и не затрагивает собственно процессов дифференцировки. В наших предыдущих исследованиях показано, что гормоны, продуцируемые плацентой при беременности, играют значимую роль в регуляции формирования и функциональной активности регуляторных и эффекторных популяций лимфоцитов периферической крови, в том числе опосредуя свои эффекты модуляцией функций дендритных клеток (ДК) периферической крови. В тимусе присутствуют миелоидные (м) и плазмоцитоподобные (п) ДК, которые, контактируя с тимоцитами, осуществляют отрицательную селекцию аутореактивных тимоцитов и регулируют направленность их дифференцировки, играя главную роль в под-

держании толерантности к антигенам собственного организма. Поэтому изучение роли ДК тимуса в реализации эффектов гормонов, а также действия самих гормонов на дифференцировку основных эффекторных ($\alpha\beta$ - и $\gamma\delta$ Т-клетки) и регуляторных субпопуляций (Treg – Т-регуляторные клетки – супрессоры иммунного ответа, которые помогают плоду; Th17 – Т-лимфоциты-хелперы, продуцирующие интерлейкин-17, стимулирующие воспалительные реакции; iNKT-клетки – инвариантные Т-клетки с функциями натуральных киллеров – активаторы иммунных реакций) в тимусе является актуальной проблемой фундаментальной биологии и различных областей медицины, что определяется широким использованием гормонов в терапии и репродуктивных технологиях.

Цель настоящей работы – изучение механизмов гормонального контроля процессов клеточной дифференцировки в тимусе в аспекте беременности.

Материалы и методы исследования

Гормоны исследовали в физиологических концентрациях, сопоставимых с их уровнем в периферической крови по триместрам беременности. Объектом исследования являлись тимоциты и ДК тимуса, которые выделяли из фрагментов тимуса, удаляемых в ходе сердечно-сосудистых операций при коррекции врожденных пороков сердца в соответствии с существующей хирургической практикой.

Действие гормонов на созревание и функциональную активность мДК и пДК тимуса, а также основных субпопуляций лимфоцитов в тимусе ($\alpha\beta$ Т-клеток, $\gamma\delta$ Т-клеток, nTreg, Th17, iNKT) изучали по экспрессии соответствующих мембранных и внутриклеточных маркеров в суспензии тимоцитов после 72 ч инкубации с гормонами. В супернатантах клеточных культур оценивались актив-

ность фермента индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), продукция IL-10, отражающих толерогенный потенциал ДК.

Для изучения роли тимических ДК в реализации эффектов гормонов, созревшие в присутствии гормонов сепарированные мДК и пДК культивировали 72 ч с интактными аутологичными тимоцитами, а затем оценивали количество $\alpha\beta$ T-клеток, $\gamma\delta$ T-клеток, nTreg, Th17, iNKT по экспрессии соответствующих поверхностных и внутриклеточных маркеров методом проточной цитометрии.

Результаты исследования

Установлено, что оба типа ДК тимуса чувствительны к модулирующим эффектам гормонов, продуцируемых плацентой при беременности. Исследуемые гормоны разнонаправленно регулируют созревание и экспрессию костимулирующих (CD86), ингибиторных (CD276), регуляторных (TSLP-R) мембранных молекул мДК (CD11c, CD11c) и пДК (CD303), активность IDO (рис. 1).

Эстриол в течение всей беременности оказывает модулирующие эффекты на мДК тимуса. В первой половине беременности гормон повышает количество

CD11c⁺-timoцитов, что характеризует общий пул мДК тимуса, и снижает на них экспрессию рецептора к тимусному стромальному лимфопоэтину (CD11c⁺TSLP-R⁺) и ингибиторной молекулы CD276 (CD11c⁺CD276⁺). По данным литературы, TSLP, действуя на мДК, активирует экспрессию антиген-презентирующих и костимулирующих молекул, и, индуцируя продукцию провоспалительных цитокинов, стимулируют пролиферацию и дифференцировку CD4⁺ T-лимфоцитов в Th1, а также CD4⁺CD25⁻ тимоцитов в nTreg [13]. Молекула CD276 является маркером зрелости ДК и отражает их супрессорную функцию, участвуя в трансдукции сигнала на угнетение пролиферации T-лимфоцитов [12]. Первая половина беременности наиболее уязвима для иммунной атаки плода, поэтому действие эстриола может быть одним из звеньев в цепи стероид-индуцируемой инволюции тимуса в этот период.

Во второй половине беременности эстриол увеличивает экспрессию молекулы CD86 на мДК (CD11c⁺) тимуса, что отражает антиген-презентирующую функцию мДК тимуса. Киспептин, напротив, снижает общее количество мДК (CD11c⁺) и мДК, экспрессирующих

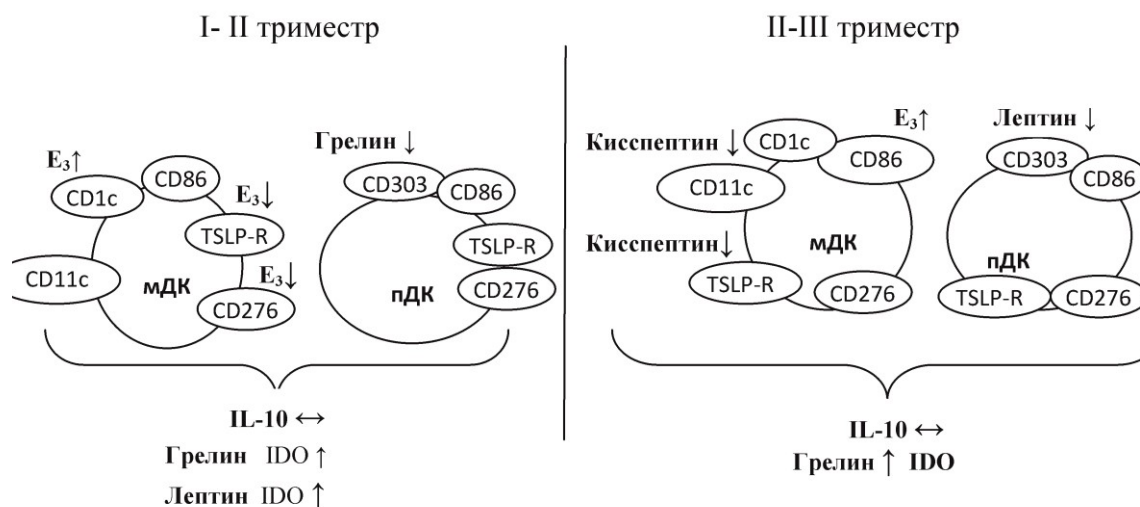


Рис. 1. Влияние гормонов, продуцируемых плацентой при беременности, на экспрессию мембранных молекул, характеризующих созревание и функциональную активность миелоидных и плазмоцитоподобных дендритных клеток тимуса в разные триместры беременности

TSLP-R ($CD11c^+TSLP-R^+$). Следует отметить, что эффекты кисспептина на дифференцировку тимоцитов до настоящего времени не изучены. Ранее в наших работах показано, что кисспептин в концентрациях второй половины беременности усиливает формирование адаптивных (a) Treg и снижает количество Th17 периферической крови, что способствует индукции и/или поддержанию периферической толерантности в период физиологической беременности [1]. Полученные результаты позволяют рассматривать эстриол и кисспептин как факторы регуляции дифференцировки тимоцитов с участием мДК тимуса при беременности.

пДК тимуса испытывают, главным образом, угнетающее влияние со стороны исследуемых гормонов, продуцируемых плацентой. Так, в первой половине беременности грелин снижает общее количество $CD303^+$ -timoцитов, а во второй половине беременности лептин оказывает аналогичное действие (см. рис. 1).

Исследуемые гормоны стимулируют активность IDO в ДК тимуса (см. рис. 1). Так, лептин в концентрации первой половины беременности, а грелин в течение всей беременности усиливают активность IDO в ДК тимуса, но не влияют на продукцию IL-10, что является важнейшей характеристикой толерогенного потенциала ДК. В целом, можно заключить, что беременность сопровождается гормонозависимой модуляцией функций ДК тимуса, направленной на повышение их толерогенного потенциала, что отражается в способности ДК индуцировать формирование регуляторных и эффекторных субпопуляций тимоцитов.

Оба типа ДК тимуса участвуют в реализации регуляторных эффектов гормонов в индукции дифференцировки эффекторных ($\alpha\beta$ - и $\gamma\delta$ Т-клетки) и регуляторных субпопуляций (Treg, Th17, iNKT) (рис. 2). Гормоны разнонаправленно модулируют способность мДК и пДК индуцировать формирования изучаемых популяций лимфоцитов при совместном культивировании с аутологичными тимоцитами. Так,

преинкубация мДК с эстриолом угнетает их способность индуцировать формирование nTreg и Th17, но способствует увеличению количества $CD8^+\alpha\beta$ Т-клеток. Премированные эстриолом пДК модулируют формирование $CD4^+\alpha\beta$ Т-клеток в тимусе, а также усиливают способность пДК индуцировать формирование Th17. Выявленные разнонаправленные эффекты эстриола на мДК и пДК, по-видимому, могут объясняться тем, что гормон снижает экспрессию TSLP-R и ингибиторной молекулы B7-H3 ($CD276^+$) на мДК (см. рис. 1). По данным литературы, TSLP, действуя на мДК, усиливает их способность индуцировать формирование nTreg [13]. Учитывая, что мДК чувствительны к эффектам эстриола в течение всей беременности, действие гормона будет способствовать угнетению дифференцировки Th17 на уровне тимуса в этот период.

Эффекты кисспептина мДК угнетает их способность индуцировать формирование Th17. Тогда как, действуя на пДК, гормон усиливает их способность индуцировать формирование Th17 и nTreg, а также способствует увеличению количества $CD4^+CD8^+\alpha\beta$ Т-клеток и $CD8^+\alpha\beta$ Т-клеток, снижая количество $CD4^+\alpha\beta$ Т-клеток. Выявленные особенности действия гормона также можно объяснить модуляцией экспрессии поверхностных маркеров TSLP-R и CD276, главным образом, на тимических мДК. Учитывая, что мДК наиболее чувствительны к эффектам кисспептина во второй половине беременности, действие гормона будет способствовать угнетению дифференцировки Th17 на уровне тимуса в этот период. Полученные результаты позволяют рассматривать эстриол и кисспептин значимыми регуляторами дифференцировки Th17 с участием мДК и пДК тимуса в период беременности.

Несмотря на то, что лептин, главным образом, не влиял на экспрессию изученных маркеров созревания и функциональной активности мДК, но снижал количество пДК, премированные лептином пДК способствуют увеличению количества $CD4^+CD8^+\alpha\beta$ Т-клеток и $CD4^+\gamma\delta$ Т-клеток

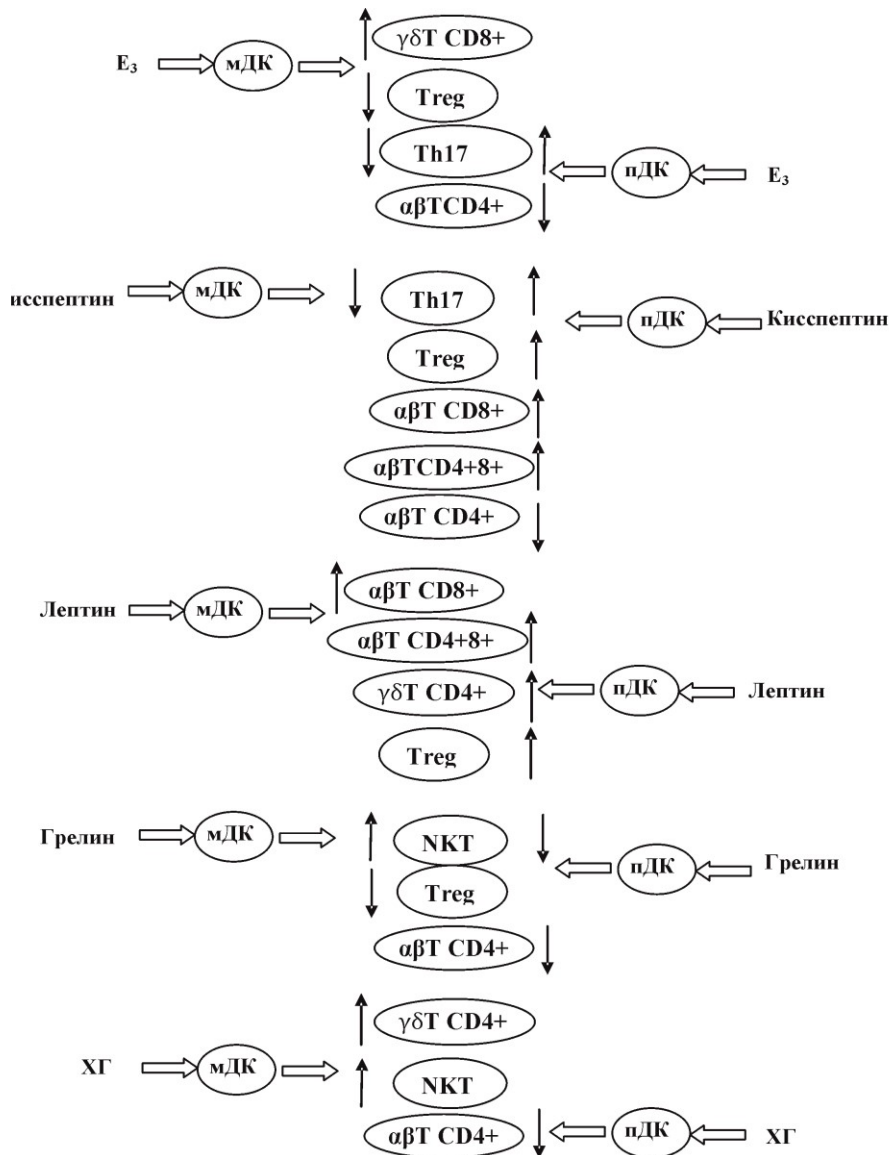


Рис. 2. Эффекты премированных гормонами миелоидных и плазмоцитоподобных дендритных клеток тимуса на формирование эффекторных ($\alpha\beta$ и $\gamma\delta T$ -клетки) и регуляторных субпопуляций (nTreg, Th17, iNKT) лимфоцитов

и преимущественному формированию nTreg. Действие лептина на мДК тимуса стимулирует их способность индуцировать формирование $CD8^+ \alpha\beta T$ -клеток. Учитывая, что гормон в исследуемых концентрациях усиливает активность IDO в ДК тимуса, можно полагать, что этот механизм оказывает стимулирующий эффект на их способность усиливать формирование nTreg. Тогда как, действуя на клетки периферической крови, лептин в концентрациях, характерных для беременности, препятствует формированию адаптивных Treg из наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитов [5].

Предварительная инкубация мДК и пДК с грелином оказывает значимые эффекты на способность ДК модулировать формирование разных субпопуляций лимфоцитов в тимусе. Так, премированные грелином мДК угнетают формирование nTreg, но усиливают формирование iNKT, а премированные грелином пДК препятствуют формированию iNKT. Ранее в наших исследованиях показано, что грелин не оказывал значимого влияния на экспрессию маркерных молекул созревания и функциональной активности ДК, но снижал количество пДК и усиливал

активность IDO, что может объяснять выявленные эффекты гормона. Инкубация интактных тимоцитов с грелином в той же концентрации снижает количество iNKT-клеток и Th17 [8, 9] в культуре тимоцитов. Учитывая, что количество пДК практически в 2 раза превосходит уровень мДК тимуса [11], можно полагать, что угнетение грелином формирования iNKT-клеток в тимусе объясняется эффектами гормона на тимические пДК. Полученные результаты позволяют рассматривать грелин как фактор регуляции дифференцировки iNKT-клеток с участием мДК и пДК тимуса при беременности.

Премированные ХГ мДК способствуют преимущественному формированию iNKT в тимусе и увеличению количества $CD4^+ \gamma\delta T$ -клеток, не оказывая значимых эффектов на другие изучаемые популяции тимоцитов. Премированные ХГ пДК угнетают формирование $CD4^+ \alpha\beta T$ -клеток.

Следует отметить, что большинство изучаемых гормонов (грелин, киспептин, эстриол, ХГ) в концентрациях, характерных для беременности, действуя на пДК, способствуют снижению количества $CD4^+ \alpha\beta T$ -клеток, а влияние киспептина на пДК еще и индуцирует увеличение количества $CD4^+ CD8^+ \alpha\beta T$ -клеток и $CD8^+ \alpha\beta T$ -клеток. Поскольку количество пДК практически в 2 раза превосходит уровень мДК тимуса, полученные результаты можно рассматривать как угнетающий эффект гормонов плаценты на тимический этап дифференцировки Т-хелперов, опосредованный влиянием на пДК тимуса, что дополняет существующие представления о стероид-зависимой инволюции тимуса в период физиологически протекающей беременности.

В целом, можно заключить, что гормоны, продуцируемые плацентой (хорионический гонадотропин, эстриол, лептин, грелин, киспептин) в концентрациях, сопоставимых с их содержи-

ем в периферической крови при беременности, эффективно регулируют созревание и функциональную активность мДК, пДК тимуса, участвуя в регуляции тимической дифференцировки основных эффекторных ($\alpha\beta$ - и $\gamma\delta T$ -клеток) и регуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов (Treg, Th17, iNKT). Таким образом, выявлен новый механизм регуляции гормонами, продуцируемыми плацентой, тимопоэза в аспекте беременности. Полученные результаты раскрывают новый ранее неизвестный механизм гормонального контроля в период физиологически протекающей беременности, позволяющий поддерживать системную толерантность иммунокомпетентных клеток матери в отношении полуаллогенных антигенов плода, что, в конечном счете, определяет благоприятный исход беременности. Полученные результаты существенно дополняют уже имеющиеся данные о модулирующих эффектах вышеупомянутых гормонов на функциональную активность разных субпопуляций лимфоцитов периферической крови и тимуса [1, 8–10], ДК периферической крови [2, 3] и формирование адаптивных регуляторных субпопуляций Th17/Treg периферической крови при беременности [3, 5, 10], а также гормональных механизмах формирования центральной и периферической иммунной толерантности при беременности.

Таким образом, гормоны, продуцируемые плацентой при беременности, не только определяют инволюцию тимуса, но и регулируют созревание дендритных клеток тимуса и, непосредственно действуя на тимоциты либо опосредованно влияя на дендритные клетки, направляют дифференцировку основных регуляторных и эффекторных субпопуляций лимфоцитов, способствуя формированию периферической толерантности иммунной системы матери к антигенам плода.

Библиографический список

1. Горбунова О.Л., Ширшев С.В. Молекулярные механизмы регуляции ксиспептином формирования и функциональной активности Treg и Th17 // Биологические мембраны. – 2016. – Т. 33. – № 3. – С.223–231.
2. Орлова Е.Г., Ширшев С.В., Логинова О.А. Механизмы влияния лептина и грелина на созревание и функциональную активность дендритных клеток // Биохимия. – 2019. – Т. 84. – № 1. – С. 63–73.
3. Орлова Е.Г., Ширшев С.В., Логинова О.А. Лептин и грелин регулируют созревание дендритных клеток, индуцирующих формирование регуляторных Т-лимфоцитов // Доклады академии наук. – 2015. – Т. 462. – № 6. – С. 723–726.
4. Орлова Е.Г., Ширшев С.В. Роль лептина и грелина в индукции дифференцировки ИЛ17-продуцирующих и Т-регуляторных лимфоцитов // БЭБИМ. – 2013. – Т. 156. – № 12. – С. 786–791.
5. Орлова Е.Г., Ширшев С.В. Роль РКА и Р13К в регуляции лептином и грелином формирования адаптивных субпопуляций регуляторных CD4+Т-лимфоцитов // Биохимия. – 2017. – Т.82. – № 9. – С. 1361–1373.
6. Ширшев С.В. Иммунология материнско-фетальных взаимодействий: монография. – Екатеринбург, 2009. – 582 с.
7. Ширшев С.В., Орлова Е.Г., Заморина С.А., Некрасова И.В. Влияние гормонов репродукции на индукцию CD4+CD25+brighFохp3+ Т регуляторных лимфоцитов // Доклады академии наук. – 2011. – Т. 440. – № 1. – С. 132–135.
8. Ширшев С.В., Орлова Е.Г., Заморина С.А., Некрасова И.В. Гормональная регуляция тимического этапа дифференцировки инвариантных НКТ-клеток // Доклады академии наук. – 2012. – Т. 446. – С. 587–589.
9. Ширшев С.В., Орлова Е.Г., Заморина С.А., Некрасова И.В. Гормональная регуляция тимического этапа дифференцировки ИЛ-17-продуцирующих и Т-регуляторных лимфоцитов // Доклады академии наук. – 2014. – Т. 454. – С. 103–106.
10. Ширшев С.В., Орлова Е.Г., Логинова О.А., Некрасова И.В., Горбунова О.Л., Масленникова И.Л. Гормональная регуляция дифференцировки дендритных клеток тимуса // БЭБИМ. – 2018. – Т. 165. – № 2. – С. 193–198.
11. Huang H., Chen P., Ou C.Y. [et al.] Characteristics of distribution and quantity of dendritic cells subtypes in hyperplastic thymus in patients with myasthenia gravis // Zhonghua Yi Xue Za Zhi – 2017. – Vol. 97. – № 19. – P. 1463–1468.
12. Mahnke K., Ring S., Johnson T.S. [et al.] Induction of immunosuppressive functions of dendritic cells in vivo by CD4+CD25+ regulatory T cells: Role of B7-H3 expression and antigen presentation // Eur. J. Immunol. – 2007. – Vol. 37. – P. 2117–2126.
13. Watanabe N., Wang Y.H., Lee H.K. [et al.] Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus // Nature. – 2005. – Vol. 25. – P. 1181–1185.

**MECHANISMS OF HORMONAL CONTROL OF THYMIC DIFFERENTIATION
PROCESS IN THE ASPECT OF PREGNANCY**

S.V. Shirshv, E.G. Orlova, O.A. Loginova, I.V. Nekrasova, O.L. Gorbunova

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS

The effect of hormones (chorionic gonadotropin, estriol, leptin, ghrelin, kisspeptin) in the regulation of cell differentiation in the thymus was studied, in concentrations being comparable with the content in peripheral blood during pregnancy. It was established that the studied hormones regulate the functional activity of myeloid and plasmacytoid thymic dendritic cells in different directions, thus mediating the regulatory effects on the differentiation of thymocytes in contact with them. Hormones modulate the expression of the co-stimulatory activation and inhibitory molecules on myeloid and plasmacytoid thymic dendritic cells, as well as the activity of the enzyme indolamine-2,3-dioxigenase in general, increasing the tolerogenic potential of thymus dendritic cells. Hormone-influenced myeloid and plasmacytoid dendritic cells of the thymus have opposite effects on the formation of natural regulatory subpopulations of thymocytes (iNKT, nTreg, Th17), contributing to the successful development of physiological pregnancy. The effects of the studied hormones on the differentiation of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in the thymus are mediated by the influence of hormones on both types of thymus dendritic cells, which complements the understanding of the regulatory mechanisms of steroid-induced thymus involution during pregnancy.

Thus, the hormones produced by the placenta during pregnancy regulate the maturation and functional activity of thymus dendritic cells, modulating their ability to influence the differentiation of regulatory and effector populations of thymocytes. The obtained results reveal new mechanisms of hormonal regulation of the thymic differentiation of cells of the immune system which can be realized at different periods of pregnancy.

Keywords: estriol, chorionic gonadotropin, leptin, ghrelin, kisspeptin, thymocytes, dendritic cells, subset of T lymphocytes ($\alpha\beta$ T cells, $\gamma\delta$ T cells, Treg, Th17, iNKT), pregnancy.

Сведения об авторах

Ширшев Сергей Викторович, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующий лабораторией иммунорегуляции, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН (ИЭГМ УрО РАН), 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13; e-mail: shirshev@iegm.ru

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

Логина Ольга Александровна, кандидат биологических наук, инженер, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: jallorukki@ya.ru

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

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

Материал поступил в редакцию 20.11.2019 г.