

РЕГУЛЯЦИЯ ЖЕНСКИМИ ПОЛОВЫМИ СТЕРОИДАМИ ЭКСПРЕССИИ РЕКОМБИНАЗЫ RAG-1 В ЛИМФОЦИТАХ Treg И Th17. РОЛЬ ОНКОСТАТИНА М

С. В. Ширшев, И. В. Некрасова*, О. Л. Горбунова, Е. Г. Орлова

Представлено академиком РАН В.А. Черешневым 14.06.2018 г.

Поступило 25.06.2018 г.

Изучали влияние эстрадиола (E_2), прогестерона (P_4), онкостатина М (OSM) на процессы дифференцировки Т-клеток $CD4^+$ в Т-регуляторные (Treg) лимфоциты и в Т-хелперы 17 (Th17). Также исследовали возможность ревизии Т-клеточного рецептора в этих субпопуляциях с помощью оценки экспрессии рекомбиназы RAG-1. E_2 в концентрации, характерной для I триместра беременности, но не P_4 или OSM, повышал уровень Treg. Отдельные комбинации половых стероидов с OSM увеличивали содержание клеток $CD4^+FOXP3^+$ и усиливали экспрессию RAG-1 в этих клетках, тем самым способствуя формированию иммунологической толерантности при беременности. При исследовании Th17 подобного влияния гормонов и OSM не зарегистрировали.

Ключевые слова: рекомбинация, Treg, Th17, эстрадиол, прогестерон, онкостатин М, RAG-1.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524845641-644>

Беременность представляет собой феномен полуаллогенной трансплантации, механизмы которой до сих пор не изучены. Важную роль в процессах формирования толерантности материнской иммунной системы к полуаллогенному плоду играют половые стероидные гормоны — эстрадиол (E_2) и прогестерон (P_4) [1]. Плацента на протяжении всей беременности продуцирует целый спектр цитокинов, влияющих как на рост и развитие фетоплацентарного комплекса, так и на формирование толерогенного микроокружения децидуальной оболочки и на изменения системных реакций лейкоцитов матери [1, 2]. Одним из ключевых медиаторов, определяющих процессы выживания имплантированной бластоцисты, является онкостатин М (OSM) [3]. Этот цитокин при разных условиях может обладать как про-, так и противовоспалительной активностью [4]. Не исключено, что гормоны репродукции могут быть факторами, которые поляризуют иммунорегуляторное действие OSM. Также показано [5], что данный цитокин способен индуцировать экстратимическую дифференцировку Т-лимфоцитов. Известно, что процессы экстратимической дифференцировки Т-лимфоцитов

активируются во время физиологически протекающей беременности [6]. Поскольку считается, что ревизия Т-клеточного рецептора (TCR) представляет собой один из механизмов формирования толерантности на периферии [7], это может создать дополнительные условия для выживания полуаллогенного плода [2].

Цель настоящей работы — исследование влияния E_2 и P_4 на фоне действия OSM на дифференцировку Т-хелперов (Th) в Treg или Th17 и экспрессию рекомбиназы RAG-1 в данных клетках *in vitro*.

Использовали периферическую венозную кровь здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста ($n = 10$). Суспензию мононуклеаров периферической крови (МПК) получали центрифугированием в градиенте плотности фикола–верографина ($d = 1,077 \text{ г/см}^3$). Далее методом негативной иммуномагнитной сепарации с помощью набора “R&D Systems” (США) из суспензии МПК выделяли Т-лимфоциты $CD4^+$. Выделенные клетки ($5 \cdot 10^6/\text{мл}$) инкубировали в полной питательной среде RPMI 1640 (Gibco®, “ThermoFisher Scientific”, США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1 мМ HEPES, 2 мМ L-глутамин, 1 мг/мл гентамицина, в течение 48 ч при 37°C в условиях 5% CO_2 с OSM и гормонами. Онкостатин М (“R&D Systems”) использовали в концентрации 2 нг/мл,

Институт экологии и генетики микроорганизмов —
филиал Пермского федерального исследовательского
центра Уральского отделения Российской Академии наук

* E-mail: nirina5@mail.ru

экстраполируя уровень его секреции децидуальной тканью [8]. Гормоны применяли в концентрациях, отражающих их концентрации в крови соответственно в I и III триместрах беременности [9]: E_2 ("Sigma-Aldrich", США) — 1 и 10 нг/мл, P_4 ("Sigma-Aldrich") — 20 и 100 нг/мл. В качестве контроля использовали официальные растворители гормонов.

Через 48 ч инкубации Т-клеток $CD4^+$ с гормонами и (или) OSM оценивали фенотип Т-лимфоцитов методом проточной цитометрии ("Becton Dickinson", США). Клетки Treg определили как $CD4^+FOXP3^+$ ("Novus Biologicals", США) клетки, Th17 — $CD4^+ROR\gamma t^+$ ("Novus Biologicals"). Маркёром реаранжировки генов антигенного рецептора является рекомбиназа RAG-1 (Recombination Activating Gene 1) [10], внутриклеточную экспрессию которой определяли в Treg и клетках Th17 ("Cell Signaling Technology", США).

При исследовании влияния E_2 на индукцию Treg ($FOXP3^+$) в Т-лимфоцитах $CD4^+$ выявили достоверное увеличение содержания Т-лимфоцитов $CD4^+FOXP3^+$ (iTreg) только при использовании концентрации гормона, соответствующей I триместру беременности. Поскольку дополнительной стимуляции клеток Treg поляризующими цитокинами не проводили, можно говорить о том, что E_2 является самостоятельным фактором дифференцировки Т-лимфоцитов $CD4^+$ в направлении iTreg. Цитокин OSM и P_4 вне зависимости от концентрации не влияли на процесс дифференцировки. Совместное влияние на Т-клетки $CD4^+$ OSM, E_2 и P_4 в концентрациях, экстраполированных с уровня гормонов в I триместре, также привело к достоверному увеличению доли

Т-лимфоцитов $CD4^+FOXP3^+$. Комбинации OSM с гормонами в концентрациях, характерных для III триместра беременности, такой способностью не обладали (рис. 1). Известно, что I–II триместр беременности является наиболее уязвимым для иммуноопосредованных аборт [11], поэтому реализация толерогенного потенциала E_2 и комбинации гормонов и цитокина именно в этот период биологически оправдана.

Функциональная активность iTreg определяется способностью распознавать антигенные структуры в комплексе с молекулами гистосовместимости (МНС) [12], и возможность ревизии $\alpha\beta TCR$ данных клеток может усиливать их супрессорные функции в отношении фетальных антигенных структур. Поэтому мы исследовали влияние упомянутых гормонов и их комбинации с OSM, который индуцирует экстратимическую дифференцировку во время беременности [2], на экспрессию рекомбиназы RAG-1 в Т-клетках $CD4^+FOXP3^+$. Результаты этой серии опытов представлены на рис. 2. Как видно из рисунка, гормоны *per se* не влияли на исследуемый показатель. Однако при добавлении OSM экспрессия RAG-1 в лимфоцитах Treg повысилась под влиянием обеих концентраций P_4 и концентрации E_2 , соответствующей III триместру беременности.

Таким образом, E_2 в I триместре усиливал генерацию iTreg, повышая толерогенный потенциал в отношении фетальных антигенов, но не активировал экспрессию RAG-1. Напротив, в III триместре E_2 не влиял на индукцию Treg, но осуществлял функции коактиватора OSM, что привело к повышению экспрессии RAG-1. В отличие от E_2 , P_4 на протяжении всей беременности не

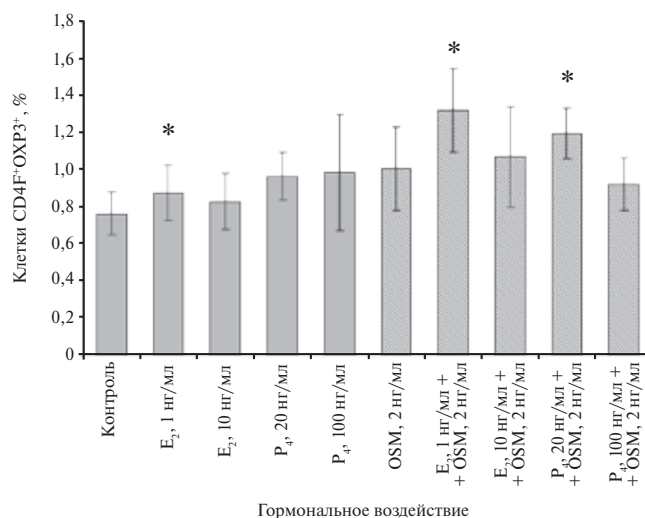


Рис. 1. Влияние E_2 , P_4 и OSM на содержание Т-клеток $CD4^+FOXP3^+$. Здесь и на рис. 2 — $M \pm 95\%$ CI, $n = 10$, * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

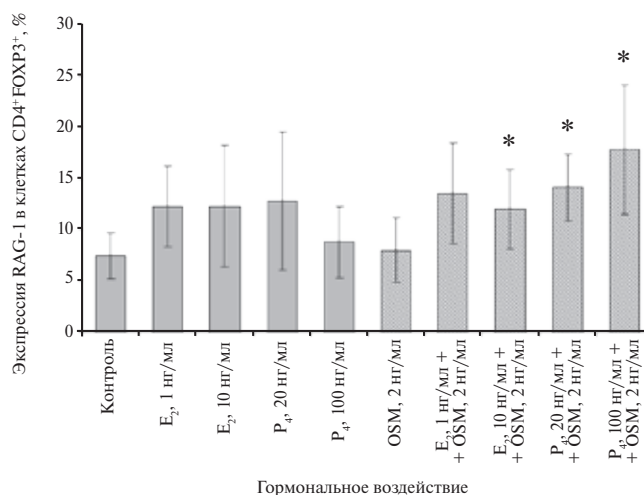


Рис. 2. Влияние E_2 , P_4 и OSM на экспрессию RAG-1 в Т-клетках $CD4^+FOXP3^+$.

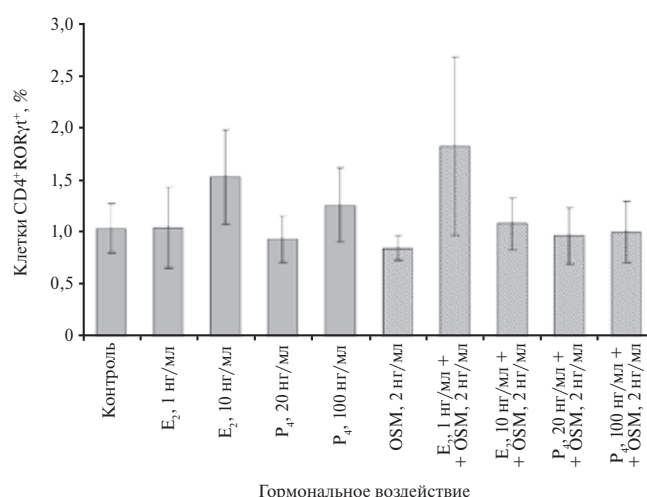


Рис. 3. Влияние E₂, P₄ и OSM на содержание Т-клеток CD4⁺RORγt⁺.

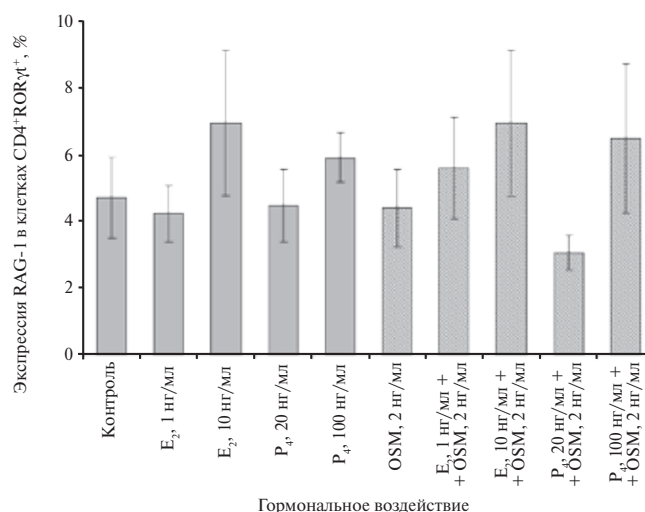


Рис. 4. Влияние E₂, P₄ и OSM на экспрессию RAG-1 в Т-клетках CD4⁺RORγt⁺.

индуцировал Treg, но усиливал влияние OSM на процессы реаранжировки αβTCR Treg, выступая необходимым кофактором, без которого сам OSM не в состоянии повышать экспрессию RAG-1.

Исследуемые гормоны и их комбинация с OSM достоверно не изменили при сравнении с контрольной группой процентного содержания Т-лимфоцитов CD4⁺RORγt⁺ (Th17) и уровня экспрессии в них RAG-1 (рис. 3 и 4). Таким образом, E₂ и P₄ могут быть физиологическими регуляторами направленности действия OSM в сторону противовоспалительных влияний, усиливая супрессорное звено иммунной системы матери во время беременности.

Поскольку беременность сопровождается атрофией тимуса, усиление экстралимфической дифференцировки в данный период может носить компенсаторный характер и представлять собою механизм коррекции антигенраспознающего репертуара CD4⁺αβ Т-лимфоцитов [13]. По-видимому, одновременное действие гормонов и OSM способствует реверсии αβTCR уже зрелых Treg в фетоплацентарной зоне, что может быть основой для развития локальной сети Treg CD4⁺. Изменение антигенраспознающей способности данных клеток может служить условием для появления принципиально новых механизмов иммунологической толерантности к фетальным антигенам при физиологически развивающейся беременности и, в частности, механизма формирования пула лимфоцитов, распознающих фетальные молекулы как аутоантигены.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках проекта, поддержанного Комплексной программой Уральского отделения Российской

академии наук. Номер Государственной регистрации темы АААА-А18-118030790046-9.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ширшев С.В.* // Биол. мембраны. 2014. Т. 31. № 5. С. 303–322.
2. *Ширшев С.В.* Иммунология материнско-фетальных взаимодействий. Екатеринбург: УрО РАН, 2009. 582 с.
3. *Eddie S.L., Childs A.J., Jabbour H.N., Anderson R.A.* // Mol. Hum. Reprod. 2012. V. 18. № 2. P. 88–95.
4. *Pelletier J.-P., Martel-Pelletier J.* // Arthritis Rheum. 2003. V. 48. № 12. P. 3301–3303.
5. *Boileau C., Houde M., Dulude G., et al.* // J. Immunol. 2000. V. 164. P. 5713–5720.
6. *Kimura M., Hanawa H., Watanabe H., et al.* // Annu. Rev. Cell Develop. Biol. 1995. V. 162. P. 16–25.
7. *Куклина Е.М.* // Биохимия. 2006. Т. 71. № 8. С. 1021–1033.
8. *Ogata I., Shimoya K., Moriyama A., et al.* // Mol. Hum. Reprod. 2000. V. 6. № 8. P. 750–757.
9. *Kase N.G., Reyniak J.V.* // Mount. Sinai J. Med. 1985. V. 52. P. 11–34.
10. *Turka L., Schatz D., Oettinger M., et al.* // Science. 1991. V. 16. P. 778–781.
11. *Mc Intyre J.A., Faulk W.P.* // Amer. J. Reprod. Immunol. 1986. V. 10. P. 121–126.
12. *Sakaguchi S.* // Annu. Rev. Immunol. 2004. V. 22. P. 531–562.
13. *Ширшев С.В., Куклина Е.М., Максимов А.Ю., Кравцова О.А., Паршакова Н. С.* // Биохимия. 2007. Т. 72. № 9. С. 1207–1213.

REGULATION OF RECOMBINASE RAG-1 EXPRESSION BY FEMALE SEX STEROIDS IN Treg AND Th17 LYMPHOCYTES. ROLE OF ONCOSTATIN M

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

Perm Federal Research Center Ural Branch Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Presented by Academician of the RAS V.A. Chereshev June 14, 2018

Received June 25, 2018

The effect of estradiol (E_2), progesterone (P_4), and oncostatin M (OSM) on the differentiation of $CD4^+$ T cells to T regulatory (Treg) lymphocytes and T helpers 17 (Th17) was investigated. The possibility of revision of the T cell receptor in these subpopulations by evaluating the expression of RAG-1 recombinase was also studied. E_2 at concentrations characteristic of pregnancy trimester I, but no P_4 or OSM, increased the Treg level. Combination of sex steroids with OSM increased the percent of $CD4^+FOXP4^+$ cells and enhanced RAG-1 expression in these cells, thus promoting the development of immune tolerance during pregnancy. In the study of Th17 such effect of the hormones and OSM was not detected.

Keywords: recombination, Treg, Th17, estradiol, progesterone, oncostatin M, RAG-1.