

УДК 618.2:577.218

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-3-87-95>

Экспрессия ингибиторных рецепторов PD-1, CTLA-4 и Tim-3 периферическими Т-клетками при беременности

Сметаненко Е.А.¹, Хонина Н.А.^{1,2}, Леплина О.Ю.¹, Тихонова М.А.¹, Баторов Е.В., Пасман Н.М.², Черных Е.Р.¹

¹ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ) Россия, 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

² Новосибирский государственный университет (НГУ) Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Ингибиторные рецепторы и их лиганды (чек-поинт молекулы) являются негативными регуляторами иммунного ответа. Однако их роль в иммунной адаптации при беременности остается малоизученной.

Цель исследования – оценить уровень экспрессии чек-поинт молекул (PD-1, CTLA-4, Tim-3) на периферических Т-клетках у беременных в сравнении с фертильными небеременными женщинами.

Материалы и методы. В исследование были включены 36 женщин во второй половине беременности без гестационных осложнений, у 12 из которых имелась экстрагенитальная патология. Контрольную группу составили 28 сопоставимых по возрасту фертильных небеременных. Относительное содержание CD8⁺PD-1⁺, CD8⁺TIM-3⁺, CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁺, CD4⁺PD-1⁺, CD4⁺TIM-3⁺, CD4⁺PD-1⁺TIM-3⁺ Т-клеток крови оценивали методом проточной цитометрии с использованием соответствующих моноклональных антител (BDBiosciences, США).

Результаты. Относительное содержание CD4⁺Tim-3⁺ и CD8⁺PD-1⁺ Т-клеток, а также CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, коэкспрессирующих PD-1 и Tim-3 в периферической крови беременных, статистически значимо превышало аналогичные показатели у небеременных. Возрастная CD4⁺Tim-3⁺ и CD8⁺PD-1⁺ Т-клеток регистрировалось как у беременных с наличием, так и отсутствием экстрагенитальной патологии. Однако беременные с экстрагенитальной патологией отличались более высоким содержанием CD8⁺PD-1⁺ и меньшим количеством CD8⁺Tim-3⁺ клеток, а также отсутствием (характерного для беременных) возрастания PD-1⁺Tim-3⁺ Т-клеток. Количество сопутствующих патологий прямо коррелировало с долей CD8⁺PD-1⁺ лимфоцитов и обратно – с долей CD8⁺Tim-3⁺ и CD4⁺PD-1⁺Tim-3⁺ клеток. Кроме того, экспрессия чек-поинт молекул ассоциировалась со сроком гестации (прямая корреляция выявлялась с содержанием CD8⁺Tim-3⁺, CD4⁺PD-1⁺Tim-3⁺ и CD8⁺PD-1⁺Tim-3⁺ клеток) и в меньшей степени с возрастом беременных (обратная зависимость с долей CD8⁺Tim-3⁺ клеток).

Заключение. Беременные во второй половине гестации характеризуются повышенной экспрессией молекул PD-1 и Tim-3 на периферических Т-клетках. При этом сопутствующая экстрагенитальная патология влияет на характер экспрессии указанных молекул.

Ключевые слова: Т-клетки, беременность, ингибиторные PD-1, TIM-3, CTLA-4 чек-поинт молекулы

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Исследование выполнено в рамках научной работы НИИФКИ (тема № 122011800353-4).

✉ Хонина Наталья Алексеевна, nkhonina@mail.ru

Соответствие принципам этики. Все участники исследования подписали информированное согласие. Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИФКИ (протокол № 107 от 15.06.2018).

Для цитирования: Сметаненко Е.А., Хонина Н.А., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Баторов Е.В., Пасман Н.М., Черных Е.Р. Экспрессия ингибиторных рецепторов PD-1, CTLA-4 и Tim-3 периферическими Т-клетками при беременности. *Бюллетень сибирской медицины*. 2022;21(3):87–95. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-3-87-95>.

Expression of inhibitory receptors PD-1, CTLA-4, and Tim-3 by peripheral T cells during pregnancy

Smetanenko E. A.¹, Khonina N.A.¹, Leplina O.Yu.¹, Tikhonova M.A.¹, Batorov E.V., Pasman N.M.², Chernykh E.R.¹

¹ *Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
14, Yadrintsevskaya Str., Novosibirsk, 630099, Russian Federation*

² *Institute of Medicine and Psychology, Novosibirsk National Research State University
2, Pirogova Str., Novosibirsk, 630090, Russian Federation*

ABSTRACT

Background. Inhibitory receptors and their ligands (also called checkpoint molecules) are important feedback regulators of the immune response. However, their role in immunological adaptation during pregnancy remains poorly understood.

The aim of the study was to evaluate the level of checkpoint molecule (PD-1, CTLA-4, Tim-3) expression in peripheral T cells in pregnant women compared with fertile non-pregnant women.

Materials and methods. The study included 36 women in the second half of pregnancy without pregnancy complications, 12 of whom had extragenital pathology. The control group consisted of 28 age-matched fertile non-pregnant women. The proportion of CD8⁺PD-1⁺, CD8⁺TIM-3⁺, CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁺, CD4⁺PD-1⁺, CD4⁺TIM-3⁺, and CD4⁺PD-1⁺TIM-3⁺ was evaluated by flow cytometry using the corresponding monoclonal antibodies (BD Biosciences, USA).

Results. The proportion of CD4⁺Tim-3⁺ and CD8⁺PD-1⁺ T cells and CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes co-expressing PD-1 and Tim-3 in the peripheral blood of pregnant women was statistically significantly higher than in non-pregnant women. An increase in CD4⁺Tim-3⁺ and CD8⁺PD-1⁺ T cells was observed both in pregnant women with and without extragenital pathology. However, pregnant women with extragenital pathology were characterized by a higher CD8⁺PD-1⁺ count and a smaller number of CD8⁺Tim-3⁺ cells, as well as by a lack of an increase in PD-1⁺Tim-3⁺ T cells typical of pregnant women. The number of comorbidities was directly correlated with the proportion of CD8⁺PD-1⁺ lymphocytes and inversely correlated with the proportion of CD8⁺Tim-3⁺ and CD4⁺PD-1⁺Tim-3⁺ cells. In addition, the expression of checkpoint molecules was associated with gestational age (a direct correlation was found with the proportion of CD8⁺Tim-3⁺, CD4⁺PD-1⁺Tim-3⁺, and CD8⁺PD-1⁺Tim-3⁺ cells) and to a lesser extent – with the age of pregnant women (an inverse relationship was found with the proportion of CD8⁺Tim-3⁺ cells).

Conclusion. Pregnant women in the second half of pregnancy are characterized by increased expression of PD-1 and Tim-3 molecules in peripheral T cells. At the same time, concomitant extragenital pathology affects the expression of these molecules.

Keywords: T cells, pregnancy, inhibitory PD-1, TIM-3, CTLA-4 checkpoint molecules

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious or potential conflict of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was carried out within the research project of the Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (topic No.122011800353-4).

Conformity with the principles of ethics. All study participants signed an informed consent. The study was approved by the local Ethics Committee at the Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (Protocol No.107 of 15.06.2018).

For citation: Smetanenکو E.A., Khonina N.A., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Batorov E.V., Pasman N.M., Chernykh E.R. Expression of inhibitory receptors PD-1, CTLA-4, and Tim-3 by peripheral T cells during pregnancy. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2022;21(3):87–95. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-3-87-95>.

ВВЕДЕНИЕ

Ингибиторные рецепторы и их лиганды, объединенные термином «ингибиторные чек-пойнт молекулы», относятся к категории сигнальных молекул. Они опосредуют различные иммуносупрессорные механизмы и играют важную роль в ограничении иммунного ответа и формировании толерантности к аутоантигенам, а при патологии подавляют противоопухолевый и противоинокционный иммунный ответ [1]. Наиболее изученными ингибиторными рецепторами на Т-клетках являются молекулы CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4), PD-1 (programmed cell death protein-1) и TIM-3 (T cell immunoglobulin and mucin domain containing-3). Запуск сигнальных путей при взаимодействии указанных рецепторов с соответствующими лигандами (CD80/86, PD-L1, Gal-9) приводит, с одной стороны, к подавлению функций эффекторных Т-клеток и смещению баланса в сторону Th2 ответа [2, 3], а с другой – к экспансии и усилению активности регуляторных Т-клеток (Трег) [4]. Кроме того, повышенная экспрессия и коэкспрессия чек-пойнт молекул характеризует дисфункциональное состояние (Т-клеточное «истощение»), отражающее прогрессирующее снижение функциональной активности Т-лимфоцитов при переходе эффекторных Т-клеток в клетки памяти [5, 6].

Исследование экспрессии чек-пойнт молекул при беременности представляет особый интерес, поскольку успешное вынашивание полуаллогенного плода требует существенной перестройки иммунной системы, направленной на индукцию толерантности к фетальным антигенам [7]. Молекулярные механизмы такой перестройки остаются недостаточно исследованными. Тем не менее динамическое изменение Th1/Th2 баланса, ограничение цитотоксического потенциала CD8+ Т-клеток, индукция Трег и недавно описанные признаки Т-клеточного истощения при неосложненной беременности позволили сделать предположение о важной роли чек-пойнт молекул в адаптации иммунной системы при гестации [8]. Недавние исследования на экспериментальных животных и у человека показали, что децидуальные Т-клетки при беременности характеризуются повышенной экспрессией и коэкспрессией CTLA-4, PD-1 и Tim-3, а локализованные в децидуальной ткани антигенпрезентирующие и стромальные клетки высоко экспрессируют лиганды этих рецепторов [8].

При этом показано, что усиление экспрессии децидуальными Т-клетками ингибиторных рецепторов может индуцироваться присутствующими на клетках трофобласта молекулами HLA-C и HLA-G [9]. В то же время данные по экспрессии ингибиторных молекул на периферических Т-клетках и их роли при беременности остаются малоизученными и неоднозначными. Между тем следует отметить, что фетальные антигены, попадающие с током крови в лимфоузлы и селезенку, могут активировать Т-клетки, поэтому состояние толерантности должно поддерживаться не только на локальном, но и системном уровне.

Индукторами экспрессии ингибиторных рецепторов на циркулирующих Т-клетках могут быть интерлейкин-10, прогестерон и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) [3, 10]. Проведенные нами исследования также показали, что одним из модуляторов функций активированных Т-клеток, способных, в том числе, усиливать экспрессию чек-пойнт молекул, является плацентарный фактор роста (PIGF), концентрация которого при беременности резко возрастает [11].

Учитывая эти факты, мы предположили, что экспрессия чек-пойнт молекул на периферических Т-клетках при беременности может также меняться, являясь отражением перестройки иммунной системы на системном уровне. Проверка этой гипотезы явилась целью настоящего исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 36 беременных женщин без гестационных осложнений, проходивших обследование в ГБУЗ ГКБ № 1, и 28 фертильных небеременных женщин (табл. 1). Исследование выполнено в соответствии с этическими стандартами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками в 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденной приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Возраст женщин в группе с неосложненной беременностью варьировал от 18 до 45 лет ($Me = 27$ лет) и достоверно не отличался от такового в группе фертильных небеременных (22–45 лет, $Me = 31$ год; $p_U = 0,11$). Срок гестации 26–40 нед, $Me = 36$ нед.

У 20 (55,6%) женщин беременность была первой, у 16 (44,4%) – повторной.

Наличие сопутствующей экстрагенитальной патологии (артериальная гипертензия, в том числе гестационная; отеки беременных; сахарный диабет, в том числе гестационный; ожирение; патология гемостаза; заболевания щитовидной железы, гипотиреоз в анамнезе; хронические заболевания почек вне обострений) выявлялось у 12 из 36 (33,3%) беременных. Сахарный диабет регистрировался в 58,3% (7/12) случаев, артериальная гипертензия и ожирение отмечались у 33,3% (4/12) женщин, патология гемостаза – 25% (3/12) и заболевания щитовидной железы в анамнезе – 16,6% (3/12). Отеки беременных наблюдались у 33,3% (4/12) и хронический пиелонефрит у 8,3% (1/12) женщин. Наличие одновременно четырех патологий регистрировалось у одной беременной (8,3%), трех патологий – четырех пациенток (33,3%) и двух патологий – двух беременных (16,7%). В остальных пяти случаях отмечалось наличие одной экстрагенитальной патологии. На момент обследования сопутствующие хронические заболевания были в стадии компенсации. Все беременности у женщин в данном исследовании были одноплодными. Ни у одной из беременных не регистрировалось наступление активной родовой деятельности во время обследования и забора крови.

Мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови выделяли стандартным методом центрифугирования цельной гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фикола – верографина ($\rho = 1,078$). Лизис эритроцитов проводили раствором VersaLyse (Beckman Coulter, Франция) в соответствии с инструкцией. Методом проточной цитометрии оценивали относительное содержание CD8+CTLA-4+, CD8+PD-1+, CD8+TIM-3+, CD8+PD-1+TIM-3+, CD4+CTLA-4+, CD4+PD-1+, CD4+TIM-3+, CD4+PD-1+TIM-3+ Т-клеток крови, используя анти-CD8 (FITC), анти-CD4 (FITC, PerCP), анти-CTLA-4 (PE), анти-PD-1 (APC), анти-TIM-3 (PE, PerCP/Cy 5.5) моноклональные антитела (BDBiosciences, США). Исследование проводили по общепринятой методике с использованием параметров прямого и бокового светорассеяния и флуоресценции по каналам FL-1 (FITC), FL-2 (PE), FL-3 (PerCP, PerCP/Cy 5.5, PE-Cy 5), FL-4 (APC) (BD FACSCalibur, Cell Quest Software, США). Основное внимание было уделено оценке PD-1 – экспрессирующих Т-клеток, содержание которых в субпопуляциях CD4+ и CD8+ клеток исследовали у всех 36 беременных и 28 фертильных небеременных контрольной группы. Кроме того, у значительной части обследуемых была проанализирована экспрессия молекул CTLA-4 (18 беременных

и 20 небеременных) и Tim-3 (19 беременных и 26 небеременных), а также коэкспрессия молекул PD-1 и Tim-3 (14 беременных и 16 небеременных).

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США) и GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., США). Для оценки значимости различий между двумя независимыми группами использовали *U*-критерий Манна – Уитни. Для выявления значимых различий в парных выборках использовали *W*-критерий Вилкоксона парных выборок. Для оценки корреляционных взаимосвязей использовали коэффициент корреляции Спирмена (R_s). Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона $Me (Q_1-Q_3)$. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ (двустороннем).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнительный анализ относительного содержания PD-1+ клеток в субпопуляции CD4+ лимфоцитов не выявил значимых различий между группой беременных и фертильных небеременных (рис.). В то же время процентное содержание PD-1+ клеток в субпопуляции CD8+ лимфоцитов беременных в 2,4 раза превышало аналогичный показатель в группе небеременных. При этом доля PD-1+ клеток в субпопуляции CD4+ лимфоцитов была существенно выше, чем в популяции CD8+ лимфоцитов. Это проявлялось в виде выраженной тенденции в группе небеременных ($p_w = 0,09$) и статистически значимых различий в группе беременных ($p_w = 0,004$). Исследование экспрессии CTLA-4 не выявило различий в содержании CD4+CTLA-4+ и CD8+CTLA-4+ лимфоцитов в сравниваемых группах ($p_w = 0,16$ и $p_w = 0,19$ соответственно). В то же время оценка Tim-3+ клеток выявила 5-кратное возрастание доли Tim-3+ клеток в популяции CD4+ лимфоцитов беременных по сравнению с группой небеременных.

Содержание Tim-3+ клеток среди CD8+ лимфоцитов в сравниваемых группах не различалось (см. рис.). Учитывая возрастание экспрессии PD-1+ и Tim-3+ на Т-клетках, представлялось важным исследовать коэкспрессию данных молекул. Доля PD-1+Tim-3+ клеток в субпопуляции CD4+ лимфоцитов у беременных в 5 раз превышала аналогичный показатель в контрольной группе. Аналогично, относительное количество CD8+ клеток, ко-экспрессирующих PD-1 и Tim-3 у беременных, было в 2,3 раза выше, чем у небеременных.

Следует отметить, что, несмотря на отсутствие поздних гестационных осложнений и, в первую очередь преэклампсии, женщины с неосложнен-

ной гестацией различались по наличию сопутствующих экстрагенитальных заболеваний, которые выявлялись у трети беременных (см. материалы и методы). Чтобы выяснить, насколько усиление экспрессии ингибиторных рецепторов на Т-клетках

связано с коморбидностью, на следующем этапе сравнили содержание Т-клеток, экспрессирующих чек-поинт молекулы, в группах беременных с наличием и отсутствием экстрагенитальной патологии (табл. 1).

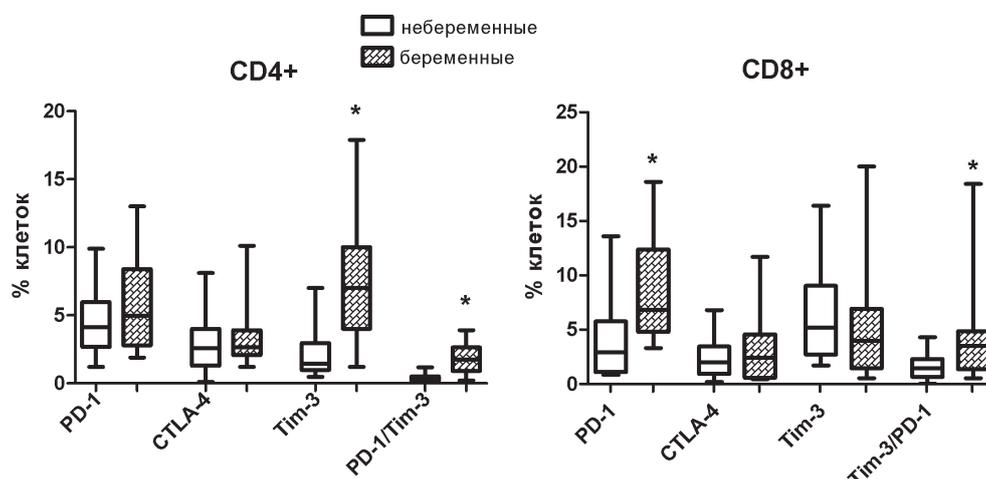


Рисунок. Содержание Т-клеток, несущих чек-поинт молекулы среди CD4+ и CD8+ лимфоцитов, экспрессирующих ингибиторные рецепторы, у беременных с неосложненной гестацией и фертильных небеременных, Me (Q₁-Q₃)

Таблица 1

Экспрессия ингибиторных рецепторов в субпопуляциях Т-клеток у беременных с наличием и (или) отсутствием коморбидных состояний, Me (Q ₁ -Q ₃)			
Параметр	Фертильные небеременные	Беременные с отсутствием экстрагенитальной патологии	Беременные с наличием экстрагенитальной патологии
<i>Клинические параметры</i>			
		<i>n</i> = 24	
Возраст, лет		26 (20–32)	
Срок гестации, нед		34 (32–37)	
Гравидность, кол-во раз		1 (1–3)	
Паритет родов, кол-во раз		1 (1–1)	
		<i>n</i> = 12	
<i>Субпопуляции Т-клеток, %</i>			
CD4 ⁺ PD-1 ⁺	4,1 (3,0–5,9) <i>n</i> = 28	4,8 (3,0–7,4) <i>n</i> = 24	6,6 (2,5–9,6) <i>n</i> = 12
CD4 ⁺ CTLA-4 ⁺	2,6 (1,3–4,0) <i>n</i> = 20	3,8 (2,0–4,0) <i>n</i> = 10	2,4 (2,1–2,8) <i>n</i> = 8
CD4 ⁺ Tim-3 ⁺	1,4 (1,0–2,9) <i>n</i> = 24	6,5 (1,6–8,6)* <i>n</i> = 14	9,7 (6,9–13)* <i>n</i> = 5
CD8 ⁺ PD-1 ⁺	2,9 (1,1–5,9) <i>n</i> = 26	5,8 (4,7–8,3)* <i>n</i> = 24	10 (6,9–15)** <i>n</i> = 12
CD8 ⁺ CTLA4 ⁺	2,0 (0,9–3,4) <i>n</i> = 20	1,2 (0,5–4,0) <i>n</i> = 10	3,4 (1,3–5,5) <i>n</i> = 8
CD8 ⁺ Tim-3 ⁺	5,3 (2,5–9,2) <i>n</i> = 26	5,8 (2,3–19) <i>n</i> = 14	1,1 (0,6–1,9)** <i>n</i> = 5
CD4 ⁺ PD1 ⁺ Tim3 ⁺	0,35 (0,19–0,5) <i>n</i> = 16	2,1 (1,6–2,8)* <i>n</i> = 10	0,27 (0,18–1,5) <i>n</i> = 4
CD8 ⁺ PD1 ⁺ Tim3 ⁺	1,5 (0,7–2,3) <i>n</i> = 16	3,9 (2,2–4,5)* <i>n</i> = 10	0,8 (0,6–3,5) <i>n</i> = 4

* $p_U < 0,05$ – статистическая значимость различий с небеременными; # $p_U < 0,05$ – статистическая значимость различий между беременными с наличием и отсутствием экстрагенитальной патологии.

Анализ клинических параметров не выявил статистически значимых различий между беременными сравниваемых групп по возрасту, срокам гестации, гравидности и паритету родов. Показано, что характерное для беременности возрастание CD4+Tim3+ и CD8+PD-1+ клеток выявлялось в обеих группах, однако в группе с экстрагенитальной патологией

было более выраженным, на что указывало более высокое содержание CD8+PD-1+ клеток ($p_U = 0,03$) и тенденция к большему содержанию CD4+Tim-3+ клеток ($p_U = 0,1$) по сравнению с беременными без сопутствующей патологии. В то же время возрастание CD4+ и CD8+Т-клеток, коэкспрессирующих PD-1 и Tim3, наблюдалось только у беременных без

сопутствующей патологии, а в группе с коморбидностью не выявлялось. Другой особенностью беременных с экстрагенитальной патологией было снижение CD4+Tim-3+ клеток как в сравнении с небеременными, так и группой беременных без сопутствующей патологии.

Учитывая, что количество экстрагенитальных патологий у различных женщин варьировало от 0 до 4, также исследовали зависимость между экспрессией Т-клетками чек-пойнт молекул и количеством сопутствующих патологий, приходящихся на одну беременную (табл. 2).

Таблица 2

Корреляционная зависимость (Rs) экспрессии чек-пойнт молекул с количеством сопутствующих заболеваний, возрастом и сроком гестации			
Субпопуляция	Количество коморбидностей	Возраст	Срок гестации
CD4+PD-1+, n = 36	0,25 (0,14)	-0,08 (0,64)	0,19 (0,26)
CD4+CTLA-4+, n = 18	-0,19 (0,44)	0,04 (0,86)	0,06 (0,81)
CD4+Tim-3+, n = 19	34 (0,15)	-0,23 (0,33)	-0,34 (0,14)
CD8+PD-1+, n = 36	0,37 (0,02)	-0,004 (0,86)	-0,23 (0,18)
CD8+CTLA-4+, n = 18	0,2 (0,42)	-0,04 (0,86)	-0,01 (0,95)
CD8+Tim-3+, n = 19	-0,58 (0,01)	-0,43 (0,06)	0,5 (0,03)
CD4+ PD-1+Tim-3+, n = 14	-0,57 (0,03)	0,05 (0,87)	0,54 (0,04)
CD8+ PD-1+Tim-3+, n = 14	0,51 (0,06)	-0,42 (0,10)	0,61 (0,02)

Примечание. В скобках указана достоверность корреляционной связи.

Относительное содержание CD8+PD-1+ клеток находилось в прямой корреляционной связи с количеством экстрагенитальных заболеваний, тогда как доля CD8+Tim-3+ клеток обратно коррелировала с количеством коморбидностей. Между содержанием PD-1+Tim-3+Т-клеток и количеством экстрагенитальных заболеваний также выявлялась обратная зависимость, которая достигала статистической значимости в отношении CD4+PD-1+Tim-3+ клеток и проявлялась в виде выраженной тенденции в отношении CD8+PD-1+Tim-3+ клеток.

Поскольку включенные в исследование беременные характеризовались достаточно широким возрастным диапазоном (18–45 лет) и сроком гестации 26–40 нед, мы также исследовали сопряженность указанных факторов с экспрессией Т-клетками чек-пойнт молекул. Как видно из данных табл. 2, достоверных корреляционных связей между относительным содержанием Т-клеток, экспрессирующих молекулы PD-1, CTLA-4 и Tim-3, и возрастом не выявлялось. Тем не менее отмечалась выраженная тенденция к обратной зависимости между возрастом и экспрессией Tim-3, а также коэкспрессией PD-1 и Tim-3 на цитотоксических CD8+ клетках. В то же время относительное содержание CD8+Tim-3+ клеток и CD4+ и CD8+ клеток, коэкспрессирующих PD-1 и Tim-3, прямо коррелировало со сроком гестации.

ОБСУЖДЕНИЕ

Активация иммуносупрессорных механизмов прослеживается с момента имплантации эмбриона и на протяжении всего гестационного периода. Одна-

ко участие ингибиторных рецепторов в реализации указанных механизмов при беременности, особенно на системном уровне, остается малоизученным.

Проведенные исследования показали, что женщины во второй половине неосложненной гестации характеризуются повышенным содержанием в циркуляции CD4+Tim-3+ и CD8+PD-1+ Т-клеток, а также CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, коэкспрессирующих PD-1 и Tim-3 по сравнению с фертильными небеременными, что свидетельствует об усилении экспрессии ингибиторных рецепторов на периферических Т-клетках при беременности. Повышенная экспрессия ингибиторных рецепторов при беременности описана на децидуальных Т-клетках. При этом показано, что CD4+PD-1+TIM-3+ Т-лимфоциты обладают Th2 фенотипом [12], и активация PD-1/PD-L1 сигнального пути подавляет продукцию Th1 цитокинов [13]. В свою очередь, повышенная экспрессия чек-пойнт молекул на децидуальных CD8+ Т-клетках обсуждается в качестве одного из механизмов снижения цитотоксического потенциала CD8+ лимфоцитов [12, 14–16]. Так, в исследованиях *in vitro* взаимодействие TIM-3– и PD-1 с соответствующими лигандами подавляет цитотоксическую активность CD8+Т-клеток, что может обеспечивать толерантность к фетальным антигенам [17, 18]. Так было описано присутствие в децидуальной ткани беременных CD4+ и CD8+ Т-клеток с фенотипом эффекторных Т-клеток памяти, коэкспрессирующих PD-1 и Tim-3, и впервые идентифицировали их как Т-клетки в состоянии истощения [4]. Однако ранее Т-клетки с аналогичным фенотипом на начальных

сроках беременности были описаны рядом авторов как Т-клетки с регуляторной (Th2) активностью [2].

Данные об экспрессии чек-поинт молекул на периферических Т-клетках представлены единичными публикациями. J. Zhao и соавт. не выявили возрастания Tim-3 на CD3+ Т-лимфоцитах беременных [19]. M. Meggyes и соавт. в своих исследованиях также не обнаружили различий между содержанием CD8+Tim-3+ у беременных и небеременных, однако CD8+TIM-3+ клетки беременных во всех триместрах продуцировали меньше провоспалительных цитокинов (TNF α , IFN γ) в сравнении с CD8+TIM-3 – клетками небеременных [20].

Позднее было показано, что содержание CD4+ и CD8+ Т-клеток, экспрессирующих молекулу PD-1 в III триместре беременности, также не отличалось от такового у небеременных [21]. Эти результаты совпадают с нашими данными об отсутствии различий в содержании CD4+PD-1+ и CD8+TIM-3+ клеток между беременными и небеременными, однако, расходятся в отношении CD4+TIM-3+ и CD8+PD-1+ Т-клеток, содержание которых, по нашим данным, при беременности возрастает. При этом нами впервые исследованы Т-клетки, ко-экспрессирующие TIM-3 и PD-1, и показано возрастание их относительного количества в субпопуляциях CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов при беременности. Имеющиеся расхождения с данными зарубежных авторов могут быть обусловлены различиями в когортах обследуемых беременных, а также проведением цитометрического анализа в зарубежных исследованиях в популяциях криоконсервированных клеток.

Вторым важным выводом настоящего исследования являются результаты анализа экспрессии чек-поинт молекул на Т-клетках беременных в зависимости от наличия или отсутствия сопутствующей экстрагенитальной патологии. Возрастание Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и Tim-3, в обеих группах свидетельствует о том, что усиление экспрессии ингибиторных рецепторов на периферических Т-клетках является следствием гестации, а не коморбидности. С одной стороны, данный фрагмент исследований показал, что наличие коморбидной патологии влияет на характер экспрессии ингибиторных молекул и ассоциировано с более выраженным увеличением CD8+PD-1+ клеток (в сравнении с беременными без сопутствующей патологии). С другой стороны, коморбидность связана с меньшим содержанием CD8+Tim-3+ и отсутствием (характерного для беременных без коморбидности) возрастания Т-клеток, коэкспрессирующих молекулы PD-1 и Tim-3. Дополнительным подтверждением сопряженности между коморбидностью и экспрессией чек-поинт молекул являются выявленные корреля-

ции между количеством сопутствующих патологий и экспрессией PD-1 и Tim-3 (прямая корреляция с долей CD8+PD-1+ и обратная – с долей CD8+Tim-3+ и CD4+PD-1+Tim-3+ клеток).

Согласно данным литературы, сопутствующие экстрагенитальные заболевания, многие из которых связаны с хроническим воспалением, могут значительно осложнять течение гестации и в ряде случаев приводить к материнской смертности [22, 23]. Полученные нами результаты демонстрируют, что сопутствующая экстрагенитальная патология приносит свой вклад, оказывая влияние на экспрессию Т-клетками чек-поинт молекул. При этом разнонаправленная зависимость между количеством сопутствующих патологий с субпопуляциями CD8+PD1+ клеток (положительная связь) и CD8+Tim3+ клеток (отрицательная связь) может свидетельствовать о различной роли молекул PD-1 и Tim-3 в регуляции функций CD8+ клеток при беременности.

Также в настоящей работе впервые показано, что экспрессия ингибиторных рецепторов на циркулирующих Т-клетках беременных ассоциирована с возрастом женщин и сроком гестации. Причем из трех анализируемых ингибиторных рецепторов сопряженность с возрастом и гестационным сроком выявлялась только для молекулы Tim-3 и была наиболее выраженной в отношении экспрессии Tim-3+ на CD8+ клетках. Согласно полученным данным, более высокое содержание Tim-3+ Т-клеток регистрировалось у более молодых беременных и на больших сроках гестации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о повышенной экспрессии ряда ингибиторных рецепторов на периферических Т-клетках при беременности и обосновывают целесообразность дальнейшего исследования чек-поинт молекул в качестве потенциальных биомаркеров при осложненной гестации.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Schnell A., Bod L., Madi A. et al. The yin and yang of co-inhibitory receptors: toward anti-tumor immunity without autoimmunity. *Cell Res.* 2020;30:285–299. DOI: 10.1038/s41422-020-0277-x.
2. Wang S., Chen C., Sun F., Li M., Du M., Li X. et al. Involvement of the Tim-3 pathway in the pathogenesis of pre-eclampsia. *Reprod. Sci.* 2021; 28(12):333–13340. DOI: 10.1007/s43032-021-00675-3.
3. Li W.X., Xu X.H., Jin L.P.J. Regulation of the innate immune cells during pregnancy: an immune checkpoint perspective. *Cell Mol. Med.* 2021;25(22):10362–10375. DOI: 10.1111/jcmm.17022.

4. Mittelberger J., Seefried M., Franitz M., Garrido F., Ditsch N., Jeschke U. et al. The role of the immune checkpoint molecules PD-1/PD-L1 and TIM-3/Gal-9 in the pathogenesis of preeclampsia. *Medicina (Kaunas)*. 2022;58(2):157. DOI: 10.3390/medicina58020157.
5. Slutsky R., Romero R., Xu Y., Galaz J., Miller D., Done B. et al. Exhausted and senescent T cells at the maternal-fetal interface in preterm and term labor. *J. Immunol. Res.* 2019;2019:3128010. DOI: 10.1155/2019/3128010.
6. Verdon D.J., Mulazzani M., Jenkins M.R. Cellular and molecular mechanisms of CD8+ T cell differentiation, dysfunction and exhaustion. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(19):7357. DOI: 10.3390/ijms 21197357.
7. Abu-Raya B., Michalski C., Sadarangani M., Lavoie P.M. Maternal immunological adaptation during normal pregnancy. *Front. Immunol.* 2020;11:575197. DOI: 10.3389/fimmu.
8. Miko E., Meggyes M., Doba K., Barakonyi A., Szereday L. Immune checkpoint molecules in reproductive immunology. *Front. Immunol.* 2019;18(10):846. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00846.
9. Papúchová H., Meissner T.B., Li Q., Strominger J.L., Tilburgs T. The dual role of HLA-C in tolerance and immunity at the maternal-fetal interface. *Front. Immunol.* 2019;10:2730. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02730.
10. Wherry E.J., Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat. Rev. Immunol.* 2015;15(8):486–499.
11. Сметаненко Е.А., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Пасман Н.М., Останин А.А., Черных Е.Р. Фактор роста плаценты модулирует ответ активированных *in vitro* Т-клеток. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020;19(4):158–166. DOI: 10.20538/1682-0363-2020-4-158-166.
12. Wang S., Zhu X., Xu Y., Zhang D., Li Y., Tao Y. et al. Programmed cell death-1 (PD-1) and T-cell immunoglobulin mucin-3 (Tim-3) regulate CD4+ T cells to induce Type 2 helper T cell (Th2) bias at the maternal-fetal interface. *Hum. Reprod.* 2016;31(4):700–711. DOI: 10.1093/humrep/dew019.
13. Taglauer E.S., Trikhacheva A.S., Slusser J.G., Petroff M.G. Expression and function of PDCD1 at the human maternal-fetal interface. *Biol. Reprod.* 2008;79:562–569. DOI: 10.1095/biolreprod.107.066324.
14. Powell R.M., Lissauer D., Tamblyn J., Beggs A., Cox P., Moss P. et al. Decidual T cells exhibit a highly differentiated phenotype and demonstrate potential fetal specificity and a strong transcriptional response to IFN. *J. Immunol.* 2017;199(10):3406–3417. DOI: 10.4049/jimmunol.1700114.
15. Morita K., Tsuda S., Kobayashi E., Hamana H., Tsuda K., Shima T. et al. Analysis of TCR repertoire and PD-1 expression in decidual and peripheral CD8+ T cells reveals distinct immune mechanisms in miscarriage and preeclampsia. *Front. Immunol.* 2020;11:1082. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01082.
16. Van der Zwan A., Bi K., Norwitz E.R., Crespo A.C., Claas F.H.J., Strominger J.L. et al. Mixed signature of activation and dysfunction allows human decidual CD8(+) T cells to provide both tolerance and immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2018;115(2):385–390. DOI: 10.1073/pnas.1713957115.
17. Meggyes M., Miko E., Szigeti B., Farkas N., Szereday L. The importance of the PD-1/PD-L1 pathway at the maternal-fetal interface. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2019;19(74). DOI: 10.1186/s12884-019-2218-6.
18. Meggyes M., Miko E., Lajko A., Csiszar B., Sandor B., Matrai P. et al. Involvement of the PD-1/PD-L1 co-inhibitory pathway in the pathogenesis of the inflammatory stage of early-onset preeclampsia. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(3):583. DOI: 10.3390/ijms 20030583.
19. Zhao J., Lei Z., Liu Y., Li B., Zhang D., Fang H. et al. Human pregnancy up-regulates Tim-3 in innate immune cells for systemic immunity. *J. Immunol.* 2009;182(10):6618–6624. DOI: 10.4049/jimmunol.0803876.
20. Meggyes M., Miko E., Polgar B., Bogar B., Farkas B., Illes Z. et al. Peripheral blood TIM-3 Positive NK and CD8+ T cells throughout pregnancy: TIM-3/Galectin-9 interaction and its possible role during pregnancy. *PLoS One.* 2014;9(3):e92371. DOI: 10.1371/journal.pone.0092371.
21. Meggyes M., Nagy D.U., Szereday L. Investigation of the PD-1 and PD-L1 immune checkpoint molecules throughout healthy human pregnancy and in nonpregnant women. *J. Clin. Med.* 2020;9(8):2536. DOI: 10.3390/jcm9082536.
22. Lewandowska M., Więckowska B., Sajdak S., Lubiński J. Pre-pregnancy obesity vs. other risk factors in probability models of preeclampsia and gestational hypertension. *Nutrients.* 2020;12(9):2681. DOI: 10.3390/nu12092681.
23. Kilpatrick S.J., Abreo A., Greene N., Melsop K., Peterson N., Shields L.E. et al. Severe maternal morbidity in a large cohort of women with acute severe intrapartum hypertension. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2016;215(1):91.e1–7. DOI: 10.1016/j.ajog.2016.01.176.

Вклад авторов

Сметаненко Е.А. – отбор пациентов, анализ клинических данных, подготовка текста статьи. Баторов Е.В., Тихонова М.А. – пробоподготовка и анализ экспрессии чек-поинт молекул на проточном цитометре. Леплина О.Ю. – анализ и интерпретация данных. Хонина Н.А. – проверка критически важного интеллектуального содержания, подготовка текста статьи. Пасман Н.М. – разработка концепции, подготовка текста статьи. Черных Е.Р. – окончательное утверждение для публикации рукописи.

Информация об авторах

Сметаненко Екатерина Александровна – аспирант, НИИФКИ, г. Новосибирск, alekta5@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6585-3213>

Хонина Наталья Алексеевна – д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФКИ; профессор, Институт медицины и психологии В. Зельмана, НГУ, г. Новосибирск, nkhonina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6757-3896>

Леплина Ольга Юрьевна – д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск, oleplina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3169-8643>

Тихонова Марина Александровна – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск, martix59@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2366-1667>

Баторов Егор Васильевич – канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск, ebatorov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2902-9336>

Пасман Наталья Михайловна – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой акушерства и гинекологии, Институт медицины и психологии В. Зельмана, НГУ, г. Новосибирск, nmpasman@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6095-1954>

Черных Елена Рэмовна – д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, зав. лабораторией клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск, ct_lab@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2346-6279>

(✉) **Хонина Наталья Алексеевна**, nkhonina@mail.ru

Поступила в редакцию 16.05.2022;
одобрена после рецензирования 07.06.2022;
принята к публикации 16.06.2022