

ЭКСПРЕССИЯ ИНГИБИТОРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ Т-КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БЕРЕМЕННЫХ С ПРЕЭКЛАМПСИЕЙ

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

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия

² ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»,
г. Новосибирск, Россия

Резюме. Перестройка иммунной системы матери, направленная на ограничение иммунного ответа против фетальных антигенов, является условием успешной беременности и осуществляется с вовлечением различных механизмов (Th1/Th2-переключения, экспансии Treg, индукции анергии и апоптоза Т-лимфоцитов, развития Т-клеточного истощения), запуск которых осуществляется с участием ингибиторных рецепторов. Соответственно, экспрессия ингибиторных рецепторов на Т-клетках, включая молекулы PD-1, CTLA-4 и Tim-3, может отражать эффективность иммунной адаптации и ее нарушения при патологии беременности. Преэклампсия (ПЭ), патогенез которой связывают с ослаблением иммунологической толерантности, является грозным осложнением гестации. Соответственно, изменения в экспрессии ингибиторных рецепторов на Т-клетках могут являться биомаркерами патологической гестации и потенциальными терапевтическими мишенями. Целью работы явилось изучение экспрессии ингибиторных молекул на Т-клетках периферической крови при ПЭ. В исследование рекрутировали 29 беременных с ПЭ и 36 женщин с отсутствием гестационных осложнений во второй половине беременности. Беременные исследуемых групп были сопоставимы по срокам гестации, количеству беременностей и паритету родов. Контрольную группу составили 28 фертильных женщин, имеющих детей. Относительное содержание CD8⁺PD-1⁺, CD8⁺CTLA-4⁺, CD8⁺TIM-3⁺, CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁺, CD4⁺PD-1⁺, CD4⁺CTLA-4⁺, CD4⁺TIM-3⁺, CD4⁺PD-1⁺TIM-3⁺ Т-клеток крови оценивали методом проточной цитометрии. Показано, что неосложненная беременность ассоциирована с усилением экспрессии Т-клетками PD-1 и Tim-3, что проявляется возрастанием относительного содержания CD4⁺Tim-3⁺, CD8⁺PD-1⁺ и PD-1⁺Tim-3⁺ Т-лимфоцитов. При ПЭ, напротив, отмечается снижение экспрессии Т-клетками PD-1 и Tim-3, в частности уменьшение доли CD4⁺Tim-3⁺ и CD8⁺PD-1⁺ клеток; отсутствие возрастания PD-1⁺Tim-3⁺ клеток (при сравнении с неосложненной гестацией) и увеличение CTLA-4⁺ клеток в популяции CD4⁺ лимфоцитов. Изменения экспрессии

Адрес для переписки:

Леплина Ольга Юрьевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 236-03-29.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: oleplina@mail.ru, ct_lab@mail.ru

Address for correspondence:

Olga Yu. Leplina
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
14 Yadrintsevskaia St
Novosibirsk
630099 Russian Federation
Phone: +7 (383) 236-03-29.
Fax: +7 (383) 222-70-28.
E-mail: oleplina@mail.ru, ct_lab@mail.ru

Образец цитирования:

Е.А. Сметаненко, Н.А. Хонина, О.Ю. Леплина,
М.А. Тихонова, Е.В. Баторов, Н.М. Пасман,
Е.Р. Черных «Экспрессия ингибиторных рецепторов
Т-клетками периферической крови у беременных с
преэклампсией» // Медицинская иммунология, 2023.
Т. 25, № 6. С. 1353-1362.
doi: 10.15789/1563-0625-EOI-2601

© Сметаненко Е.А. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.A. Smetanenko, N.A. Khonina, O.Yu. Leplina,
M.A. Tikhonova, E.V. Batorov, N.M. Pasman, E.R. Chernykh
“Expression of inhibitory receptors on peripheral blood T cells
in pregnant women with preeclampsia”, Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2023, Vol. 25, no. 6,
pp. 1353-1362. doi: 10.15789/1563-0625-EOI-2601

© Smetanenko E.A. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-EOI-2601

ингибиторных рецепторов ассоциированы с тяжестью ПЭ. Снижение CD4⁺Tim-3⁺ и CD8⁺PD-1⁺T-клеток наиболее характерно для пациенток с умеренной ПЭ, а возрастание CD4⁺CTLA-4 T-клеток для беременных с тяжелой ПЭ. Также продемонстрирована сопряженность изменений в экспрессии ингибиторных молекул и сроками манифестации ПЭ. Отличительной особенностью ранней ПЭ является снижение доли CD8⁺CTLA-4⁺ клеток и более выраженное возрастание CD4⁺CTLA-4⁺ клеток, а поздней ПЭ – уменьшение CD4⁺PD-1⁺ клеток и более выраженное снижение CD4⁺Tim-3⁺ клеток. Полученные результаты свидетельствуют об изменении экспрессии молекул CTLA-4, PD-1 и Tim-3 на T-клетках у беременных с ПЭ и сопряженности этих изменений с тяжестью и сроками манифестации ПЭ.

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

EXPRESSION OF INHIBITORY RECEPTORS ON PERIPHERAL BLOOD T CELLS IN PREGNANT WOMEN WITH PREECLAMPSIA

Smetanenکو E.A.^a, Khonina N.A.^a, Leplina O.Yu.^a, Tikhonova M.A.^a, Batorov E.V.^a, Pasmaп N.M.^b, Chernykh E.R.^a

^a Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

^b Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Maternal adaptation of the immune system aimed at limiting the immune response to fetal antigens is a necessary condition for a successful pregnancy. It involves various mechanisms (Th1/Th2 switching, Treg expansion, induction of anergy and apoptosis of T lymphocytes, development of T cell depletion) that are induced through the ligation of inhibitory receptors. Accordingly, the expression of inhibitory receptors on T cells, including PD-1, CTLA-4, and Tim-3 molecules, may reflect the effectiveness of immune adaptation and its impairment in pregnancy pathology. Preeclampsia (PE), the pathogenesis of which is associated with the impairments of immunological tolerance is a major complication of pregnancy. Accordingly, changes in the expression of inhibitory receptors on T cells may be biomarkers of abnormal gestation and potential therapeutic targets. The aim of this work was to study the expression of inhibitory molecules on peripheral blood T cells in women with PE. The study recruited 29 pregnant women with PE and 36 women with uncomplicated pregnancies in the second half of pregnancy. Pregnant women of the study groups were comparable in terms of gestational age, number of pregnancies and parity of childbirth. The control group consisted of 28 fertile women with children. Relative content of CD8⁺PD-1⁺, CD8⁺CTLA-4⁺, CD8⁺TIM-3⁺, CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁺, CD4⁺PD-1⁺, CD4⁺CTLA-4⁺, CD4⁺TIM-3⁺, CD4⁺PD-1⁺TIM-3⁺T cells in blood were analyzed by flow cytometry. It has been shown that uncomplicated pregnancy is associated with increased expression of PD-1 and Tim-3 T cells, which is manifested by an increase in the relative content of CD4⁺Tim-3⁺, CD8⁺PD-1⁺ and PD-1⁺Tim-3⁺T lymphocytes. In PE, on the contrary, there is a reduction in the expression of PD-1 and Tim-3 by T cells, in particular, a decrease in the proportion of CD4⁺Tim-3⁺ and CD8⁺PD-1⁺ cells; the absence of elevated levels in PD-1⁺Tim-3⁺ cells (compared to uncomplicated gestation) and an increase in CTLA-4⁺ cells within CD4⁺ lymphocytes. Changes in the expression of inhibitory receptors are associated with the severity of PE. A decrease in CD4⁺Tim-3⁺ and CD8⁺PD-1⁺T cells is most typical for patients with moderate PE, and an increase in CD4⁺CTLA-4T cells for pregnant women with severe PE. The relationship between changes in the expression of inhibitory molecules and the onset of PE has also been demonstrated. A distinctive feature of early PE is a decrease in the proportion of CD8⁺CTLA-4⁺ cells and a more pronounced increase in CD4⁺CTLA-4⁺ cells, while late PE is associated with a decrease in CD4⁺PD-1⁺ cells and a more pronounced decrease in CD4⁺Tim-3⁺ cells. The results obtained indicate a changes in the expression of CTLA-4, PD-1 and Tim-3 molecules on circulating T cells in pregnant women with PE and the association of these changes with the severity and the onset of PE manifestation.

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

Введение

Успешное вынашивание полуаллогенного плода требует адаптации иммунной системы матери, которая направлена на ограничение иммунного ответа против фетальных антигенов (при сохранении способности распознавать и уничтожать инфекционные патогены) и осуществляется с вовлечением различных механизмов — Th1/Th2 переключения, экспансии регуляторных Т-клеток (Treg), индукции анергии и апоптоза Т-лимфоцитов, развития Т-клеточного истощения [1]. Важнейшую роль в запуске указанных механизмов отводится ингибиторным рецепторам, которые представляют костимуляторные молекулы, проводящие сигналы негативной регуляции [12, 17]. Наиболее хорошо изученными ингибиторными рецепторами на Т-клетках являются молекулы PD-1 (молекула программированной клеточной смерти — 1, CD279), CTLA-4 (ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами антиген 4, CD152) и Tim-3 (Т-клеточный иммуноглобулин муцин 3, CD366). Активация указанных рецепторов на эффекторных Т-лимфоцитах вызывает подавление пролиферации, продукции Th1- и Th17-цитокинов, цитотоксической активности и выживаемости лимфоцитов [14]. Повышенная экспрессия и особенно коэкспрессия ингибиторных рецепторов на этапе формирования Т-клеток памяти отражает также дисфункциональное состояние Т-лимфоцитов (Т-клеточное истощение), которое является еще одним механизмом ограничения эффекторных функций Т-клеток [18, 26]. Кроме того, связывание этих рецепторов с лигандами на Treg приводит к усилению пролиферации и супрессорной активности последних [31].

Участие ингибиторных рецепторов в иммунной перестройке при беременности подтверждается данными о повышенной экспрессии и коэкспрессии CTLA-4, PD-1 и Tim-3 децидуальными Т-клетками при нормальной гестации [14], снижении экспрессии указанных молекул при привычном невынашивании [28], а также экспериментальными данными о прерывании аллогенной беременности у мышей при блокировании сигнальных путей с указанных рецепторов [30].

Следует отметить, что основное внимание при исследовании ингибиторных рецепторов уделено децидуальным Т-клеткам, поскольку взаимодействие иммунных клеток матери с фетальными антигенами происходит в первую очередь на границе мать-плод. Однако состояние толерантности должно поддерживаться не только на локальном, но и системном уровне, поскольку антигены трофобласта присутствуют в циркуляции и могут активировать периферические Т-клетки [21]. Соответственно, изменения в экспрессии ингиби-

торных рецепторов на циркулирующих Т-клетках могут являться маркерами иммунной адаптации, а при патологии — отражать нарушения иммунных взаимоотношений между матерью и плодом.

Особый интерес в этом плане представляет исследование экспрессии ингибиторных молекул на Т-клетках периферической крови у беременных с преэклампсией (ПЭ). ПЭ является наиболее грозным осложнением гестации, которое связывают со срывом иммунологической толерантности и активацией иммунной системы [25] и может быть обусловлено изменением экспрессии ингибиторных рецепторов. При этом, учитывая, что ПЭ развивается во второй половине беременности, когда забор децидуальной ткани представляет высокий риск для матери и плода, исследование периферических Т-клеток для скрининга беременных с отягощенным анамнезом представляется более предпочтительным.

Ранее нами было показано, что женщины с неосложненной гестацией характеризуются во второй половине беременности повышенной экспрессией PD-1 и Tim-3 на периферических Т-клетках по сравнению с фертильными небеременными [1]. При этом вопрос о том, как меняется экспрессия указанных молекул при ПЭ, остается открытым, поскольку данные на этот счет немногочисленны и противоречивы. Учитывая вышесказанное, настоящая работа была посвящена изучению экспрессии CTLA-4, PD-1 и TIM-3 на Т-клетках периферической крови у беременных с ПЭ.

Материалы и методы

Для проведения исследований были сформированы три группы. Основную группу составили беременные с преэклампсией (ПЭ), группу сравнения — беременные с неосложненной гестацией, контрольную группу — фертильные небеременные. Рекрутирование беременных в исследование проводилось из числа женщин, проходивших обследование в родильном доме ГБУЗ ГKB № 1. Критериями отбора являлись возраст от 18 до 45 лет, срок гестации более 20 недель, однополая беременность и отсутствие признаков активной родовой деятельности во время обследования и забора крови. Диагноз ПЭ базировался на основании выявления клинических и лабораторных критериев ПЭ — повышенного систолического артериального давления (АД) > 140 мм рт. ст. и/или диастолического АД > 90 мм рт. ст. и протеинурии (> 0,3 г/л в суточной моче). Критерием тяжелой ПЭ являлось появление одного из нижеперечисленных признаков — систолическое артериальное давление выше 160 мм рт. ст. или диастолическое артериальное давление выше 110 мм рт. ст. при двух измере-

ниях, произведенных в течение 6 часов; протеинурия — более 5 г/сут; олигурия — менее 500 мл/сут; отеки III-IV степени; неврологические или зрительные нарушения; отек легких; цианоз; боли в эпигастрии или правом подреберье; нарушение работы печени (повышение активности АСТ, АЛТ более 70 МЕ/л); выраженная гипопро-теинемия менее 50 г/л; тромбоцитопения менее $100 \times 10^9/\text{л}$; ухудшение состояния плода по данным кардиотокограммы. В контрольную группу отбирали сопоставимых по возрасту фертильных небеременных, у которых в анамнезе были беременности и роды. Иммунологическое исследование проводилось после получения письменного информированного добровольного согласия.

Экспрессию ингибиторных рецепторов (PD-1, CTLA-4, Tim-3) на Т-клетках исследовали цитофлюориметрически путем окрашивания клеток анти-CD4 (Рe), анти-CD8 (FITC), анти-CTLA-4 (Рe-Cy5), анти-PD-1 (APC), анти-TIM-3 (РeСР/Cy5.5) и соответствующими контрольными изотип-специфическими моноклональными антителами (все антитела BD PharMingen). Относительное содержание и среднюю интенсивность флюоресценции (MIF) PD-1, CTLA-4, Tim-3 оценивали в гейтах CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток, используя программное обеспечение CellQuest (BD Biosciences, США).

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft) и GraphPadPrism 5 (GraphPadSoftware, Inc.). 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. Данные в тексте и в таблице представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Характеристика пациенток

Группы с ПЭ и неосложненной гестацией были представлены соответственно 29 и 36 беременными (табл. 1). Пациентки этих групп были схожи по срокам гестации, gravidности, паритету родов и частоте встречаемости сопутствующей экстрагенитальной патологии. Относительное содержание беременных в возрасте 40 и более лет в обеих группах также не различалась. Умеренная форма ПЭ диагностировалась у 14 беременных, тяжелая — у 15 беременных. Пациентки указанных подгрупп не различались по анализируемым показателям. Ранняя манифестация ПЭ (< 34 не-

дель) отмечалась у 17 беременных, поздняя (≥ 34 недели) — в 12 случаях. Беременные с ранней и поздней ПЭ также не различались по возрасту, коморбидному статусу и количеству беременностей/родов. В контрольную группу вошли 28 небеременных в возрасте от 18 до 41 года, имеющих как минимум одни роды в анамнезе.

Оценка Т-клеток, экспрессирующих ингибиторные рецепторы (рис. 1), выявила усиление экспрессии Tim-3 и PD-1 на Т-клетках беременных по сравнению с фертильными небеременными, что проявлялось 5-кратным возрастанием Tim-3⁺ клеток в популяции CD4-лимфоцитов и более чем 2-кратным увеличением PD-1⁺ клеток в популяции CD8Т-лимфоцитов. В обеих субпопуляциях Т-лимфоцитов также отмечалось достоверное возрастание клеток, коэкспрессирующих PD-1 и Tim-3. Доля CD4⁺PD-1⁺Tim-3⁺ клеток у беременных в 5 раз, а CD8⁺PD-1⁺Tim-3⁺ клеток — в 2,3 раза превышала аналогичный показатель у небеременных. При этом содержание клеток, коэкспрессирующих PD-1⁺Tim-3⁺ молекулы, в популяции CD8⁺ лимфоцитов было достоверно выше, чем среди CD4⁺ клеток ($p_w = 0,005$).

По сравнению с неосложненной гестацией у беременных с ПЭ регистрировалось снижение экспрессии Tim-3 и PD-1. В частности, доля CD4⁺Tim-3⁺ и CD8⁺PD1⁺ клеток в группе с ПЭ была достоверно ниже, чем при неосложненной беременности. Причем, если относительное количество CD4⁺Tim-3⁺ клеток по сравнению с небеременными оставалось повышенным, то содержание CD8⁺PD1⁺ клеток соответствовало уровню небеременных. Другой особенностью ПЭ было отсутствие (характерного для неосложненной гестации) возрастания CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток, коэкспрессирующих PD-1 и Tim-3. Вместе с тем у женщин с ПЭ отмечалось более высокое содержание CD4⁺CTLA4⁺ клеток.

Поскольку беременные с ПЭ в исследуемой группе различались по тяжести, следующий этап был посвящен исследованию возможной сопряженности между экспрессией ингибиторных рецепторов и тяжестью ПЭ (рис. 2А). Сравнительный анализ экспрессии ингибиторных молекул на Т-клетках беременных с умеренной и тяжелой формами ПЭ показал, что характерное для ПЭ снижение экспрессии PD-1 и Tim-3, в частности уменьшение доли CD4⁺Tim-3⁺, CD8⁺PD-1⁺ и CD4⁺PD-1⁺Tim-3⁺Т-клеток, было характерно именно для умеренной ПЭ, а у беременных с тяжелой ПЭ проявлялось в виде тенденции. В то же время возрастание CD4⁺CTLA-4 клеток было более выраженным при тяжелой ПЭ. При этом доля CD4⁺CTLA-4 клеток в группе с тяжелой ПЭ была достоверно выше, чем при умеренной ПЭ. Т. е.

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕРЕМЕННЫХ С ПЭ И НЕОСЛОЖНЕННОЙ БЕРЕМЕННОСТЬЮ

TABLE 1. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF PREGNANT WOMEN WITH PE AND UNCOMPLICATED PREGNANCY

Группы Groups	Количество (n) Amount (n)	≥ 40 лет n (%) ≥ 40 years old n (%)	Срок гестации Gestational age	Количество беременностей Number of pregnancy	Паритет родов Childbirth parity	Экстра- генитальная патология n (%) Extragenital pathology n (%)
Неосложненная беременность Uncomplicated pregnancy	36	2 (6)	34 (31-37)	1 (1,0-2,5)	1 (1,0-1,5)	12 (33,3%)
Преэклампсия (ПЭ) Preeclampsia (PE)	29	4 (14)	33 (30-36)	2 (1-3)	1 (1,0-2,0)	14 (48,3%)
p		p_{ТКФ} = 0,48 p _{FET} = 0.48	p _U = 0,62	p _U = 0,19	p _U = 0,28	p_{ТКФ} = 0,33 p _{FET} = 0.33
Умеренная ПЭ Moderate PE	14	1 (7)	31 (30-38)	2,0 (2,0-3,0)	1,5 (1,0-2,0)	8 (42,9%)
Тяжелая ПЭ Heavy PE	15	3 (20)	30 (30-36)	1,5 (1,0-2,0)	1,0 (1,0-2,0)	8 (53,3%)
p			p _U = 0,37	p _U = 0,15	p _U = 0,4	p_{ТКФ} = 0,85 p _{FET} = 0.85
Ранняя ПЭ Early PE	17	3 (17)	30 (30-32)	2,0 (1,0-3,0)	1,0 (1,0-2,0)	8 (47%)
Поздняя ПЭ Late PE	12	1 (8)	37 (35-38)	1,5 (1,0-2,5)	1,0 (1,0-1,5)	6 (50%)
p			p _U = 0,0004	p_{ТКФ} = 0,81 p _{FET} = 0.81	p _U = 0,28	p_{ТКФ} = 0,83 p _{FET} = 0.83

Примечание. Данные представлены в виде медиан и интерквартильных диапазонов или частот (%). p – достоверность различий; U – критерий Манна–Уитни; ТКФ – точный критерий Фишера.

Note. Data are presented as medians and interquartile ranges or frequencies (%). p, significance of differences; U, Mann–Whitney test; TKF, Fisher's exact test.

характер изменений экспрессии ингибиторных рецепторов ассоциировался с тяжестью ПЭ.

Изменения в экспрессии ингибиторных рецепторов также ассоциировались со сроками манифестации ПЭ. При сравнении беременных в подгруппах с ранним и поздним дебютом ПЭ (рис. 2Б) достоверное снижение CD4⁺Tim-3⁺ клеток отмечалось только у беременных с поздней ПЭ. В силу этого содержание CD4⁺Tim-3⁺ клеток в группе с поздней ПЭ было достоверно ниже, чем в группе с ранней ПЭ. Характерное для ПЭ снижение CD8⁺PD-1⁺ клеток наблюдалось в обеих группах, но было более выражено у беременных с поздней ПЭ. В свою очередь, достоверное возрастание CD4⁺CTLA-4⁺ клеток выявлялось только при ранней ПЭ. Анализ экспрессии

ингибиторных рецепторов в группах с ранней и поздней ПЭ позволил также выявить ряд отличительных особенностей, которые не регистрировались в общей группе беременных с ПЭ. Так, особенностью ранней ПЭ являлось дополнительно снижение доли CD8⁺CTLA-4⁺ клеток, а поздней ПЭ – уменьшение CD4⁺PD-1⁺ клеток и более выраженное снижение CD4⁺Tim-3⁺ клеток.

Таким образом, наиболее выраженное снижение экспрессии молекул PD-1 и Tim-3 ассоциировано с поздней ПЭ, тогда как ранняя ПЭ была сопряжена в большей степени с разнонаправленным изменением экспрессии CTLA-4, в частности возрастанием CD4⁺CTLA-4⁺ и снижением CD8⁺CTLA-4⁺ клеток.

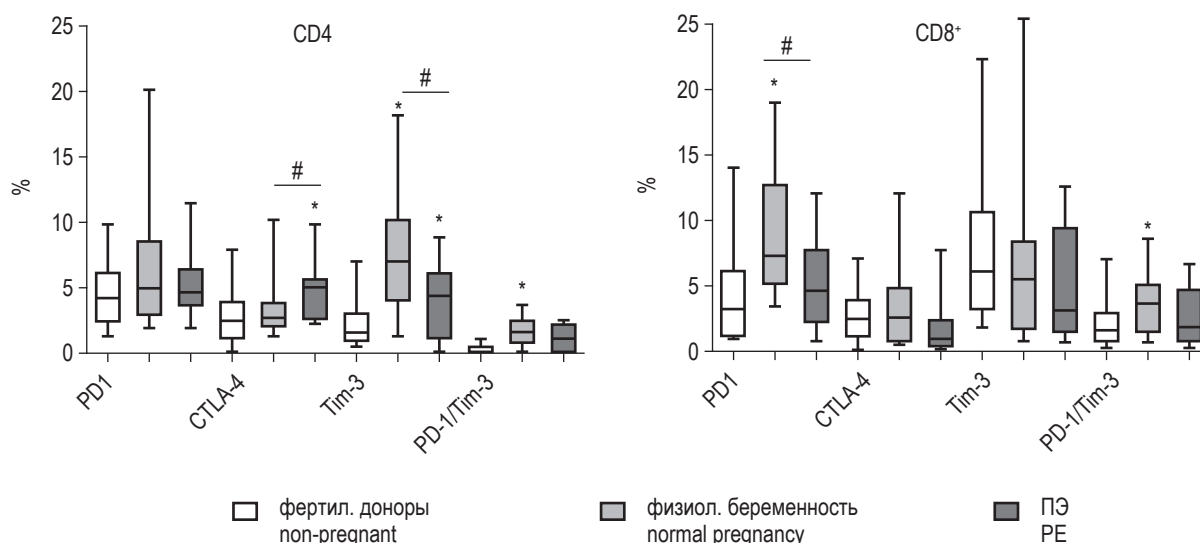


Рисунок 1. Экспрессия ингибиторных рецепторов на периферических Т-клетках беременных с неосложненной гестацией и ПЭ в сравнении с небеременными

Примечание. Представлено относительное содержание CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов, несущих PD-1, CTLA-4 и Tim-3, в популяции мононуклеарных клеток периферической крови беременных с неосложненной гестацией и ПЭ в сравнении с фертильными небеременными (* – $p < 0,05$: достоверность различий с небеременными; # – $p < 0,05$: различия между неосложненной беременностью и ПЭ).

Figure 1. Expression of inhibitory receptors on peripheral blood T cells in pregnant women with uncomplicated pregnancies and PE compared with fertile non-pregnant

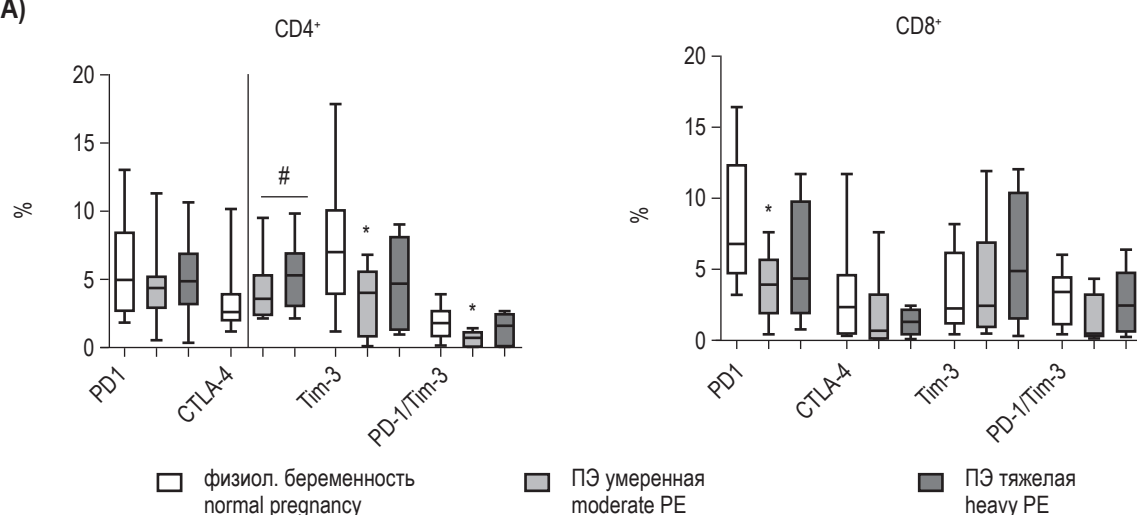
Note. The numbers of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes expressing PD-1, CTLA-4 and Tim-3 and co-expressing PD-1 and Tim-3 are presented (*, $p < 0.05$: significant differences with non-pregnant women; #, $p < 0.05$: differences between uncomplicated gestation and PE).

Обсуждение

Полученные в целом результаты свидетельствуют, что беременные во второй половине неосложненной гестации характеризуются повышенным содержанием циркулирующих CD4⁺Tim-3⁺ и CD8⁺PD-1⁺Т-лимфоцитов, в том числе CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток, коэкспрессирующих PD-1 и Tim-3 по сравнению с фертильными небеременными. Развитие ПЭ сопряжено с существенными изменениями в экспрессии ингибиторных рецепторов, в частности снижением CD4⁺Tim-3⁺ и CD8⁺PD-1⁺ клеток и отсутствием характерного для неосложненной гестации возрастания PD-1⁺Tim-3⁺Т-клеток в сочетании с увеличением CTLA-4-экспрессирующих CD4⁺ клеток. При этом характер изменений в экспрессии ингибиторных рецепторов сопряжен с тяжестью и сроками манифестации ПЭ. Так, умеренная ПЭ в большей степени ассоциирована со снижением экспрессии PD-1 и Tim-3, а тяжелая ПЭ – с возрастанием экспрессии CTLA-4 (в популяции CD4⁺ клеток). Также показано, что снижение экспрессии PD-1 и Tim-3, особенно в популяции CD4⁺Т-клеток, наиболее характерно для поздней манифестации ПЭ, тогда как изменения в экспрессии CTLA-4 – для ранней ПЭ.

Интерес к изучению экспрессии ингибиторных рецепторов на Т-клетках при беременности обусловлен тем фактом, что указанные молекулы вовлечены в регуляцию баланса Th1/Th2 и Th17/Treg клеток, т. е. опосредование механизмов иммунной адаптации [24]. Поскольку патогенез ПЭ связывают с ослаблением иммунологической толерантности [24], различные ингибиторные рецепторы на Т-клетках могут являться биомаркерами патологической гестации и потенциальными терапевтическими мишенями. Действительно, при нормальной беременности Т-клетки децидуальной ткани характеризуются повышенной экспрессией и коэкспрессией молекул PD-1 и Tim-3, что ассоциировано с Th2-фенотипом [29]. Причем активация PD-1/PD-L1 сигнального пути в исследованиях *in vitro* приводит к угнетению продукции Th1-цитокинов [22]. В свою очередь, повышенная экспрессия ингибиторных рецепторов на децидуальных CD8⁺Т-клетках ассоциирована с их более низким цитотоксическим потенциалом [15, 30], что может быть обусловлено подавлением цитотоксической активности CD8⁺Т-клеток при взаимодействии Tim-3⁺ и PD-1 с соответствующими лигандами [10, 11].

A (A)



Б (B)

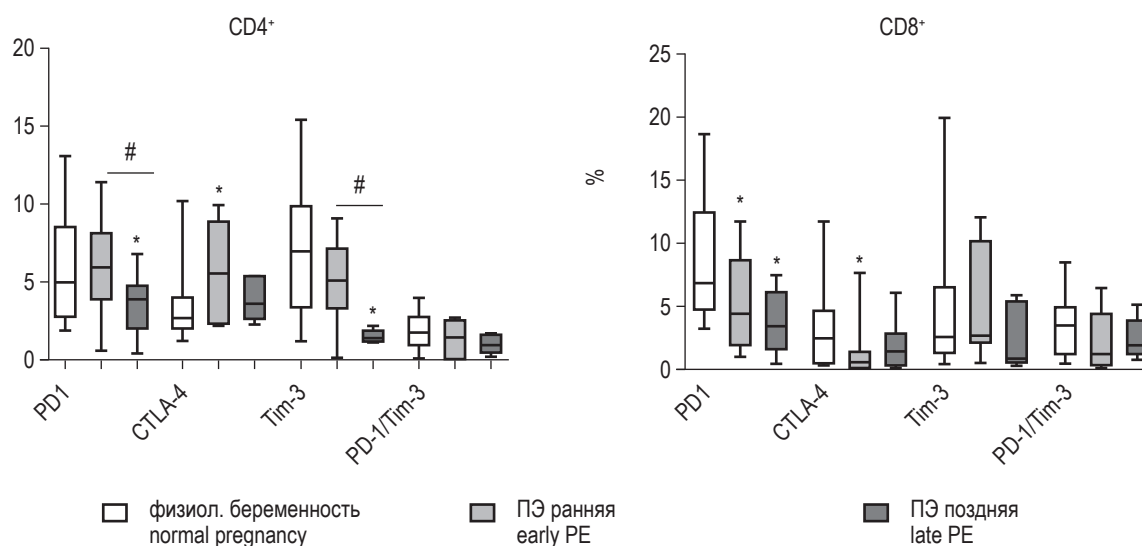


Рисунок 2. Экспрессия ингибиторных рецепторов на периферических Т-клетках у беременных с различной тяжестью и сроками манифестации ПЭ

Примечание. А – экспрессия ингибиторных рецепторов у пациенток с умеренной и тяжелой ПЭ (* – $p < 0,05$: различия с неосложненной беременностью; # – $p < 0,05$: между группами с умеренной и тяжелой ПЭ). Б – экспрессия ингибиторных рецепторов у пациенток с ранней и поздней ПЭ (* – $p < 0,05$: различия с неосложненной беременностью; # – $p < 0,05$: между группами с ранней и поздней ПЭ).

Figure 2. Expression of inhibitory receptors on peripheral T cells in pregnant women with different severity and onset of PE

Note. A, Expression of inhibitory receptors in patients with moderate and severe PE (*, $p < 0.05$: differences with uncomplicated pregnancy; #, $p < 0.05$: differences between groups with moderate and severe PE). B, Expression of inhibitory receptors in patients with early and late PE (*, $p < 0.05$: differences with uncomplicated pregnancy; #, $p < 0.05$: differences between groups with early and late PE).

Сведения об экспрессии ингибиторных рецепторов периферическими Т-клетками представлены единичными сообщениями, согласно которым авторы не выявили возрастания Tim-3⁺ и PD-1⁺Т-клеток при нормальной беременности [9, 11, 32]. Расхождения с нашими результатами могут быть связаны с различиями анализируемых когорт, а также образцов клеток, в частности предварительной криоконсервацией клеток в зарубежных исследованиях.

Относительно экспрессии ингибиторных рецепторов Т-клетками беременных с ПЭ, Wang S. и соавт. недавно описали снижение экспрессии Tim-3 на децидуальных и периферических CD8⁺Т-лимфоцитах [27]. Данные о функциональной активности таких CD8⁺Tim-3⁺ клеток неоднозначны. С одной стороны показано, что децидуальные CD8⁺Tim-3⁺Т-клетки характеризуются высокой секрецией IL-4 и IL-10, а блокирование Tim-3 сигнального пути подавляет продукцию противовоспалительных цитокинов и усиливает продук-

цию IFN γ [7], с другой — что CD8⁺Tim-3⁺ клетки беременных с ПЭ отличаются более высоким цитотоксическим потенциалом по сравнению с CD8⁺Tim-3⁺Т-клетками, а также с CD8⁺Tim-3⁺Т-лимфоцитами беременных с неосложненной гестацией [13]. Полученные нами результаты также выявили снижение CD8⁺Tim-3⁺ клеток, однако в виде тенденции и преимущественно у беременных с поздней ПЭ. В то же время нами впервые показано снижение CD4⁺Tim-3-клеток у беременных с ПЭ. Поскольку Tim-3 играет важную роль в негативной регуляции Th1 и Th17 [4] и экспрессия Tim-3 дифференцированными Th1 клетками необходима для подавления реакции отторжения аллотрансплантата [8], обнаруженное нами уменьшение CD4⁺Tim-3⁺ клеток может косвенно указывать на смещение баланса в сторону доминирования провоспалительных субпопуляций Т-хелперных клеток.

Данные литературы об особенностях экспрессии PD-1 на Т-клетках беременных с ПЭ также малочисленны и неоднозначны. Meggyes M. и соавт. выявили возрастание относительного количества децидуальных CD8⁺PD-1⁺Т-клеток с повышенным цитотоксическим потенциалом при ранней ПЭ (в сравнении с неосложненной беременностью), что позволило сделать заключение о несостоятельности PD-1/PD-L1 сигнального пути как механизма ингибции Т-клеток при ПЭ [14]. Напротив, Morita K. и соавт. описали снижение экспрессии PD-1 на антигенспецифических децидуальных эффекторных Т-клетках памяти [15]. Снижение экспрессии PD-1 может быть связано с отщеплением мембранной формы рецептора [6], способного оказывать стимулирующий эффект на Т-клетки через блокирование PD-L1:PD-1 и PD-L2:PD-1 сигнальных путей [20].

Полученные нами данные в целом согласуются с результатами Morita K. и при этом впервые демонстрируют уменьшение CD8⁺PD-1⁺ клеток в периферической крови. Учитывая, что аналогичные изменения регистрируются при активации иммунной системы у беременных с воспалением плаценты или в родах [18], можно предположить, что снижение CD8⁺PD-1⁺ клеток в периферической крови является отражением преодоления Т-клеточного истощения и активации иммунной системы.

Снижение PD-1⁺ клеток в нашем исследовании наблюдалось не только в популяции CD8⁺, но и CD4⁺ лимфоцитов (в подгруппе с поздней ПЭ), что в целом согласуется с данными Tian M. и соавт., которые описали снижение экспрессии PD-1 в субпопуляции Th17 и впервые связали нарушение PD-1/PD-L1 сигнального пути в периферических CD4⁺ клетках беременных с ПЭ с дисбалансом Treg/Th17 [23]. Учитывая, что активация PD-1 на CD4Т-клетках способствует

Th2 переключению [8], уменьшение CD4⁺PD-1⁺ клеток у беременных с ПЭ может также predisполагать к активации Th1 ответа.

Наряду со снижением экспрессии PD-1 и Tim-3 популяция CD4-лимфоцитов у беременных с ПЭ отличалась повышенной экспрессией CTLA-4. Разнонаправленные изменения в экспрессии разных ингибиторных рецепторов в этом случае могут объясняться гетерогенностью CD4-клеток (включающих различные субпопуляции Т-хелперов и Treg) и наиболее высокой экспрессией CTLA-4 на Treg. Полученные данные согласуются с результатами Voij R. и соавт., которые выявили возрастание CTLA-4⁺Treg при ранней и тяжелой ПЭ [5] и позволяют предположить, что увеличение CD4⁺CTLA-4 клеток обусловлено субпопуляцией Treg.

Важным результатом настоящего исследования является обнаруженная сопряженность между характером изменений в экспрессии ингибиторных рецепторов и тяжестью/сроками манифестации ПЭ. Согласно данным литературы наибольшее возрастание провоспалительных цитокинов наблюдается у беременных с умеренной тяжестью ПЭ [7]. Уменьшение CD4⁺Tim-3⁺ и CD8⁺PD-1⁺Т-клеток именно у этой категории пациенток косвенно подтверждает предположение о том, что снижение экспрессии Tim-3 и PD-1 на Т-клетках при ПЭ сопряжено со смещением баланса в сторону доминирования провоспалительной активности.

Результаты настоящего исследования также показали, что периферические Т-клетки беременных с ранним и поздним дебютом ПЭ различаются по экспрессии ингибиторных рецепторов. Так, если при ранней ПЭ выявляются разнонаправленные изменения в экспрессии CTLA-4 (возрастание CTLA-4⁺CD4⁺ и снижение CTLA-4⁺CD8⁺ клеток), то при поздней ПЭ — снижение экспрессии PD-1 и Tim-3 (особенно в субпопуляции CD4⁺ клеток). Согласно данным литературы, считается, что ранняя ПЭ ассоциирована с более выраженной активацией врожденного иммунитета [3] и дисфункциями регуляторных Т-клеток [16], а поздняя — с нарушениями метаболизма, включая ожирение и диабет [19]. Полученные нами результаты свидетельствуют, что обе формы ПЭ сопряжены с изменениями экспрессии ингибиторных молекул на Т-клетках, причем различия в характере изменений указанных молекул при ранней и поздней ПЭ могут являться аргументом в пользу иммунопатогенетической разнородности указанных форм ПЭ.

Заключение

В отличие от неосложненной беременности, ассоциированной с усилением экспрессии PD-1

и Tim-3 на периферических Т-клетках, ПЭ характеризуются сниженной экспрессией указанных молекул в субпопуляциях CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов в сочетании с усилением экспрессии CTLA-4 в субпопуляции CD4⁺Т-клеток. При этом

выявленные особенности в экспрессии указанных ингибиторных рецепторов в зависимости от тяжести и сроков манифестации ПЭ свидетельствуют о патогенетической значимости указанных молекул в развитии ПЭ.

Список литературы / References

1. 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. Т. 21, № 3. С. 87-96. [Smetanenko 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. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2022, Vol. 21, no. 3, pp. 87-96. (In Russ.)]
2. Abu-Raya B., Michalski C., Sadarangani M., Lavoie P.M. Maternal immunological adaptation during normal pregnancy. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 575197. doi: 10.3389/fimmu.2020.575197.
3. Aneman I., Pienaar D., Suvakov S., Simic T.P., Garovic V.D., McClements L. Mechanisms of key innate immune cells in early- and late-onset preeclampsia. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 1864. doi: 10.3389/fimmu.2020.01864.
4. Banerjee H., Kane L.P. Immune regulation by Tim-3. *F1000Res.*, 2018, Vol. 7, 316. doi: 10.12688/f1000research.13446.1.
5. Boij R., Mjøsberg J., Svensson-Arvelund J., Hjorth M., Berg G., Matthiesen L., Jenmalm M.C., Ernerudh J. Regulatory T-cell subpopulations in severe or early-onset preeclampsia. *Am J Reprod. Immunol.*, 2015, Vol. 74, no. 4, pp. 368-378.
6. Gu Y., Morgan J., Lewis D.F., Cooper D.B., McCathran C.E., Wang Y. Maternal soluble PD-1 levels are significantly increased in women with preeclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2020, Vol. 83, no. 1 e13193. doi: 10.1111/aji.13193.
7. Daneva A.M., Hadhi-Lega M., Stefanovic M. Correlation of the system of cytokines in moderate and severe preeclampsia. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.*, 2016, Vol. 43, no. 2, pp. 220-224.
8. Hu X.H., Tang M.X., Mor G., Liao A.H. Tim-3: Expression on immune cells and roles at the maternal-fetal interface. *J. Reprod. Immunol.*, 2016, Vol. 18, pp. 92-99.
9. 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, Vol. 9, no. 8, 2536. doi: 10.3390/jcm9082536.
10. Meggyes M., Miko E., Lajko A., Csiszar B., Sandor B., Matrai P., Tamas P., Szereday L. 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, Vol. 20, no. 3, 583. doi:10.3390/ijms 20030583.
11. Meggyes M., Miko E., Polgar B., Bogar B., Farkas B., Illes Z., Szereday L. 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, Vol. 9, no. 3, e92371. doi:10.1371/journal.pone.0092371.
12. 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, Vol. 19, no. 1, 74. doi: 10.1186/s12884-019-2218-6.
13. Miko E., Meggyes M., Bogar B., Schmitz N., Barakonyi A., Varnagy A., Farkas B., Tamas P., Bodis J., Szekeres-Bartho J., Illes Z., Szereday L. Involvement of Galectin-9/TIM-3 pathway in the systemic inflammatory response in early-onset preeclampsia. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 8, e71811. doi: 10.1371/journal.pone.0071811.
14. Miko E., Meggyes M., Doba K., Barakonyi A., Szereday L. Immune checkpoint molecules in reproductive immunology. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 18, no. 10, 846. doi: 10.3389/fimmu.2019.00846.
15. Morita K., Tsuda S., Kobayashi E., Hamana H., Tsuda K., Shima T., Nakashima A., Ushijima A., Kishi H., Saito S. 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, Vol. 11, 1082. doi: 10.3389/fimmu.2020.01082.
16. Sasaki Y., Darmochwal-Kolarz D., Suzuki D., Sakai M., Ito M., Shima T. Proportion of peripheral blood and decidual Cd4(+) CD25(bright) regulatory T Cells in pre-eclampsia. *Clin. Exp. Immunol.*, 2007, Vol. 149, no. 1, pp. 139-145.
17. Schnell A., Bod L., Madi A., Kuchroo V.K. The yin and yang of co-inhibitory receptors: toward anti-tumor immunity without autoimmunity. *Cell Res.*, 2020, Vol. 30, no. 4, pp. 285-299.
18. Slutsky R., Romero R., Xu Y., Galaz J., Miller D., Done B., Tarca A.L., Gregor S., Hassan S.S., Leng Y., Gomez-Lopez N. Exhausted and senescent T cells at the maternal-fetal interface in preterm and term labor. *J. Immunol. Res.*, 2019, Vol. 2019, 3128010. doi: 10.1155/2019/3128010.
19. Raymond D., Peterson E. A critical review of early-onset and late-onset preeclampsia. *Obstet. Gynecol. Surv.*, 2011, Vol. 66, no. 8, pp. 497-506.
20. Song M.Y., Park S.H., Nam H.J., Choi D.H., Sung Y.C. Enhancement of vaccine-induced primary and memory CD8(+) T-cell responses by soluble PD-1. *J. Immunother.*, 2011, Vol. 34, no. 3, pp. 297-306.

21. Taglauer E.S., Adams Waldorf K.M., Petroff M.G. The hidden maternal-fetal interface: events involving the lymphoid organs in maternal-fetal tolerance. *Int. J. Dev. Biol.*, 2010, Vol. 54, no. 2-3, pp. 421-430.
22. Taglauer E.S., Trikhacheva A.S., Slusser J.G., Petroff M.G. Expression and function of PD CD1 at the human maternal-fetal interface. *Biol. Reprod.*, 2008, Vol. 79, no. 3, pp. 562-569.
23. Tian M., Zhang Y., Liu Z., Sun G., Mor G., Liao A. The PD-1/PD-L1 inhibitory pathway is altered in pre-eclampsia and regulates T cell responses in pre-eclamptic rats. *Sci Rep.*, 2016, Vol. 6, 27683. doi:10.1038/srep27683
24. Toldi G., Rigby J., Orbán C., Tamássy Z., Bajnok A., Shima T., Saito S., Molvarec A. Prevalence of regulatory T-cell subtypes in preeclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2015, Vol. 74, no. 2, pp. 110-115.
25. Valencia-Ortega J., Saucedo R., Peña-Cano M.I., Hernández-Valencia M., Cruz-Durán J.G. Immune tolerance at the maternal-placental interface in healthy pregnancy and pre-eclampsia. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, 2020, Vol. 46, no. 7, pp. 1067-1076.
26. 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, Vol. 21, no. 19, 7357. doi: 10.3390/ijms 21197357
27. Wang S., Chen C., Sun F., Li M., Du M., Li X., Zhang Y. Involvement of the Tim-3 Pathway in the Pathogenesis of Pre-Eclampsia. *Reprod. Sci.*, 2021, Vol. 28, no. 12, pp. 3331-3340.
28. Wang S., Sun F., Li M., Qian J., Chen C., Wang M., Zang X., Li D., Yu M., Du M. The appropriate frequency and function of decidual Tim-3⁺CTLA-4⁺CD8⁺ T cells are important in maintaining normal pregnancy. *Cell Death Dis.*, 2019, Vol. 10, no. 6, 407. doi:10.1038/s41419-019-1642-x.
29. Wang S., Zhu X., Xu Y., Zhang D., Li Y., Tao Y., Piao H., Li D., Du M. 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, Vol. 31, no. 4, pp. 700-711.
30. Wang S.-C., Li Y.-H., Piao H.-L., Hong X.-W., Zhang D., Xu Y.-Y. PD-1 and Tim-3 pathways are associated with regulatory CD8⁺ T-cell function in decidua and maintenance of normal pregnancy. *Cell Death Dis.*, 2015, Vol. 6, no. 5, 1738. doi: 10.1038/cddis.2015.112.
31. Zhang Y.H., Sun H.X. Immune checkpoint molecules in pregnancy: Focus on regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.*, 2020, Vol. 50, no. 2, pp.160-169.
32. Zhao Si-J., Muayalo K.P., Jing Luo J., Huang D., Mor G., Liao A.H. Next generation of immune checkpoint molecules in maternal-fetal immunity. *Immunol. Rev.*, 2022, Vol. 308, no. 1, pp. 40-54.

Авторы:

Сметаненко Е.А. — аспирант ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Хонина Н.А. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Леплина О.Ю. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Тихонова М.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Баторов Е.В. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Пасман Н.М. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой акушерства и гинекологии медицинского факультета ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

Черных Е.Р. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Smetanencko E.A., Postgraduate Student, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Khonina N.A., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Leplina O.Yu., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Tikhonova M.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Batorov E.V., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Pasman N.M., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Obstetrics and Gynecology of Institute of Medicine and Psychology, Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russian Federation

Chernykh E.R., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 01.11.2022
Принята к печати 16.02.2023

Received 01.11.2022
Accepted 16.02.2023