

# ВЛИЯНИЕ СЕКРЕТОРНЫХ ПРОДУКТОВ ТКАНИ ПЛАЦЕНТЫ НА ФЕНОТИП И АКТИВНОСТЬ ТРАНСЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ МИГРАЦИИ МОНОЦИТОПОДОБНЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ ТНР-1

Степанова О.И., Козонов Г.Р., Цицкарава Д.З., Кузьминых Т.У.,  
Кореньков Д.А., Сельков С.А., Соколов Д.И.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта»  
СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Пополнение пула макрофагов децидуальной ткани матки и ткани плаценты происходит в результате их трансэндотелиальной миграции из периферической крови. Тканевые макрофаги контролируют развитие плаценты, формирование иммунологической толерантности в системе мать-плод. Гестоз сопровождается повышенной миграцией мононуклеаров в децидуальную ткань и локальным воспалением. Механизмы регуляции привлечения моноцитов в децидуальную ткань и ткань плаценты недостаточно изучены. Целью исследования явилось изучение влияния факторов, секретируемых тканью плаценты при физиологической беременности и при беременности, осложненной гестозом, на фенотип и активность трансэндотелиальной миграции моноцитоподобных клеток линии ТНР-1. При физиологической беременности интенсивность трансмиграции в присутствии секреторных продуктов плацент первого триместра была выше, чем в присутствии секреторных продуктов плацент третьего триместра и сопровождалась сниженной экспрессией CD11a клетками линии ТНР-1. Интенсивность трансмиграции клеток линии ТНР-1 была выше в присутствии секреторных продуктов плацент женщин с беременностью, осложненной гестозом, по сравнению с таковой в присутствии секреторных продуктов плацент женщин с физиологической беременностью, и сопровождалась повышенной экспрессией CD11b клетками линии ТНР-1. Работа выполнена при поддержке ГК № 02.740.11.0711, грантов Президента РФ № НШ-3594.2010.7 и МД-150.2011.7, Правительства Санкт-Петербурга (34/05-07/12-МУ).

*Ключевые слова:* плацента, гестоз, трансэндотелиальная миграция, моноцитоподобные клетки линии ТНР-1

## **Адрес для переписки:**

Соколов Дмитрий Игоревич  
д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории  
иммунологии с группой по диагностике СПИД  
ФГБУ «НИИ акушерства и гинекологии»  
им. Д.О. Отта  
199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская  
линия, 3.  
Тел./факс: 8 (812) 328-98-50, 323-75-45.  
E-mail: Falcojuggler@yandex.ru

## **Авторы:**

Степанова О.И. — научный сотрудник лаборатории  
иммунологии с группой по диагностике СПИД ФГБУ «НИИ  
акушерства и гинекологии» им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург  
Козонов Г.Р. — ординатор лаборатории иммунологии с группой  
по диагностике СПИД ФГБУ «НИИ акушерства и гинекологии»  
им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург  
Цицкарава Д.З. — ординатор лаборатории иммунологии  
с группой по диагностике СПИД ФГБУ «НИИ акушерства  
и гинекологии» им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург  
Кузьминых Т.У. — д.м.н., заведующая родильным отделением  
ФГБУ «НИИ акушерства и гинекологии» им. Д.О. Отта,  
Санкт-Петербург  
Кореньков Д.А. — к.м.н., старший научный сотрудник  
лаборатории иммунологии с группой по диагностике СПИД  
ФГБУ «НИИ акушерства и гинекологии» им. Д.О. Отта,  
Санкт-Петербург  
Сельков С.А. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией  
иммунологии с группой по диагностике СПИД ФГБУ «НИИ  
акушерства и гинекологии» им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург  
Соколов Д.И. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории  
иммунологии с группой по диагностике СПИД ФГБУ «НИИ  
акушерства и гинекологии» им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург

Поступила 09.10.2012

Отправлена на доработку 29.10.2012

Принята к печати 15.11.2012

# PLACENTAL SECRETORY FACTORS INFLUENCE TO THP-1 CELLS PHENOTYPE AND THP-1 CELLS TRANSENDOTHELIAL MIGRATION

Stepanova O.I., Kozonov G.R., Tsitskarava D.Z., Kuzminykh T.U.,  
Korenkov D.A., Selkov S.A., Sokolov D.I.

*D. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, St. Petersburg, Russian Federation*

**Abstract.** Decidual and placental macrophage pools are renewed due to its transendothelial monocyte migration from peripheral blood. Tissue macrophages control placental development and provide fetomaternal immunological tolerance. Preeclamptic pregnancy is accompanied by increased monocyte migration to decidual tissue and local inflammatory events. Regulatory mechanisms of monocyte recruitment to placental and decidual tissues is still unclear. Therefore we investigated the influence soluble placental factors (SPFs) during the first- and third-trimester normal pregnancy, as compared to effects of these factors in preeclamptic pregnancy. We studied biological actions of SPF upon transendothelial migration of monocyte-like THP-1 cells and their phenotypic pattern. Transendothelial migration of THP-1 cells was more intensive with first-trimester SPFs from normal pregnancy, when compared with third-trimester samples, and it was accompanied by decreased CD11a expression. SPFs from pre-eclamptic pregnancy caused an increase in transendothelial migration of THP-1 cells, as compared to SPFs from normal pregnancies, being accompanied by increased CD11b expression. The present study was supported by grants ГК № 02.740.11.0711, III-3594.2010.7, МД-150.2011.7 and a grant from St.-Petersburg Government for young scientists. (*Med. Immunol.*, 2013, vol. 15, N 2, pp 131-140)

*Keywords: placenta, preeclampsia, transendothelial migration, THP-1 cells*

**Address for correspondence (contact person):**

Sokolov Dmitriy I.  
PhD, MD, Laboratory of Immunology with an AIDS  
Diagnostic Group, D. Ott Research Institute  
of Obstetrics and Gynecology  
199034, Russian Federation, St. Petersburg,  
Mendeleevskaya lane, 3.  
Phone/fax: 7 (812) 328-98-50, 323-75-45.  
E-mail: Falcojugger@yandex.ru

**Authors:**

Stepanova O.I., Research Associate, Laboratory  
of Immunology with an AIDS Diagnostic Group,  
D. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology,  
St. Petersburg  
Kozonov G.R., Resident Physician, Laboratory  
of Immunology with an AIDS Diagnostic Group,  
D. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology,  
St. Petersburg  
Zizkarava D.Z., Resident Physician, Laboratory  
of Immunology with an AIDS Diagnostic Group,  
D. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology,  
St. Petersburg  
Kuzminykh T.U., PhD, MD, Chief, Obstetrics Department,  
D. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology,  
St. Petersburg  
Korenkov D.A., PhD, Senior Research Associate,  
Laboratory of Immunology with an AIDS Diagnostic Group,  
D. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology,  
St. Petersburg  
Selkov S.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief,  
Laboratory of Immunology with an AIDS Diagnostic Group,  
D. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology,  
St. Petersburg  
Sokolov D.I., PhD, MD (Biology), Leading Researcher,  
Laboratory of Immunology with an AIDS Diagnostic Group,  
D. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology,  
St. Petersburg

Received 09.10.2012  
Revision received 29.10.2012  
Accepted 15.11.2012

## Введение

Мононуклеары, инфильтрирующие ткань плаценты, оказывают значительное влияние на ее развитие. Доля плацентарных макрофагов достигает 15% всех клеточных популяций ткани плаценты [26], Т- и В-клетки как в децидуальной части плаценты, так и в самой плаценте составляют минорную популяцию [10]. При физиологическом течении беременности децидуальные и плацентарные макрофаги участвуют в регуляции ангиогенеза, контролируют рост и дифференцировку трофобласта, обеспечивают формирование иммунологической толерантности. В плодовой части плаценты локализованы плацентарные макрофаги и лимфоциты плодового происхождения, в децидуальной – материнского. Количество макрофагов в эндометрии матки увеличивается перед имплантацией [23], что указывает на их роль в регуляции имплантации blastocysts. Децидуальные макрофаги обнаруживаются в децидуальной ткани вокруг спиральных артерий матки, подвергающихся ремоделированию [6], что свидетельствует об их участии в регуляции этого процесса. Децидуальные макрофаги обладают способностью к фагоцитозу, секретируют активных форм кислорода и таких цитокинов, как  $IFN\gamma$ , IL-10 [21], IL-1, IL-6 [14], VEGF, PlGF, ангиопоэтины, MMP [6]. Децидуальные макрофаги принимают участие в регуляции формирования сосудистого русла матки при беременности и удалении апоптотических клеток. Плацентарные макрофаги секретируют M-CSF, VEGF, IL-10, IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1 [10, 13], стимулируют рост и дифференцировку трофобласта, а также стимулируют ангиогенез в ткани плаценты [13, 17, 20]. Плацентарные макрофаги обладают фагоцитарной активностью [12] и принимают участие в удалении клеток, вошедших в апоптоз.

При беременности, осложненной гестозом, децидуальные макрофаги участвуют в развитии местного воспаления в ткани плаценты [1]. В настоящее время механизмы привлечения моноцитов в ткань плаценты и децидуальную ткань матки при физиологической беременности и механизмы развития воспаления в этих тканях при беременности, осложненной гестозом, остаются недостаточно изученными.

В регуляции миграции лимфоцитов и моноцитов в ткань плаценты и децидуальную ткань принимают участие цитокины IL-8, MCP-1 [8] и RANTES [2, 8], IL-15 [24], секретируемые децидуальными эндотелиальными клетками и трофобластом [11]. Кроме того миграция зависит от экспрессии эндотелиальными клетками, лимфоцитами и моноцитами поверхностных адгезионных молекул. Важную роль в процессе трансэндотелиальной миграции моноцитов играют молекулы  $\beta_2$ -интегринов CD18/CD11a, CD18/CD11b, которые связываются с молекулами ICAM-1(CD54) на поверхности ЭК [22].

Ранее нами было отмечено изменение экспрессии молекул CD31, CD62E, CD62P и CD54 эндотелиальными клетками под влиянием факторов, секретируемых тканью плаценты [4], однако остается неизученным изменение фенотипа моноцитов в условиях развития физиологической и патологической беременности. Поэтому **целью настоящего исследования** явилось изучение влияния факторов, секретируемых тканью плаценты в первом и третьем триместре физиологической беременности, а также при беременности, осложненной гестозом, на активность трансэндотелиальной миграции моноцитоподобных клеток линии ТНР-1 и фенотип этих клеток.

## Материалы и методы

Использовали плаценты, полученные при искусственном аборте у женщин с физиологическим течением беременности на сроке 9-11 недель ( $n = 19$ , группа 1); плаценты женщин, у которых беременность протекала без осложнений на сроке 38-39 недель ( $n = 32$ , группа 2); плаценты женщин с беременностью, осложненной гестозом на сроке 38-39 недель ( $n = 34$ , группа 3). Получено информированное согласие пациенток на обследование ткани плаценты. Все плаценты на сроке 38-39 недель получены при родоразрешении путем кесарева сечения. Диагноз гестоза установлен на основании ведущих клинических симптомов различной степени выраженности – наличия протеинурии, отеков, гипертензии. Кусочки плацентарной ткани из центральной части плаценты культивировали в питательной среде DMEM/F12 (Sigma, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Sigma, США) и в питательной среде DMEM/F12 без добавления ЭТС в течение 24 часов. Затем кондиционированные среды собирали и замораживали при температуре  $-20^{\circ}C$  до исследования.

Исследования проводили с использованием эндотелиальных клеток линии EA.hy926, воспроизводящих основные морфологические, фенотипические и функциональные характеристики, присущие эндотелиальным клеткам макрососудов [9]. Для культивирования использовали среду DMEM/F12 (Sigma, США) с добавлением 10% ЭТС, 100 Ед/мл пенициллина (Sigma, США) и 100 мкг/мл стрептомицина (Sigma, США), 2 мМ L-глутамин («ICN», США), НАТ (Sigma, США). Также в работе использовали моноцитоподобные клетки линии ТНР-1.

Накануне опыта пересевали клетки линии EA.hy926. Часть полученной клеточной суспензии ресуспендировали в культуральной среде и вносили во вставки для 24-луночных планшетов с поликарбонатным фильтром (размер пор 8 мкм, BD Falcon, США) в количестве 40000 клеток на вставку, инкубировали сутки до образования конфлюэнтного монослоя при  $37^{\circ}C$  во влаж-

ной атмосфере, 5% CO<sub>2</sub>. Затем в верхнюю камеру (вставка с эндотелиальными клетками на фильтре, рис. 1) вносили клетки линии ТНР-1 в количестве 1 × 10<sup>6</sup> клеток в 200 мкл среды DMEM/F12 с добавлением 10% ЭТС. В нижнюю камеру (лунка 24-луночного планшета, рис. 1) вносили 700 мкл кондиционированных сред, полученных после культивирования ткани плаценты, разведенных культуральной средой в соотношении 1:1. В качестве положительного контроля в нижнюю камеру вносили 50 Ед/мл TNFα («Рефнолин», Латвия специфическая активность препарата 1 Ед – 0,06 нг). Затем клетки инкубировали 24 часа при 37 °С во влажной атмосфере, 5% CO<sub>2</sub>, после чего оценивали количество мигрировавших в нижнюю камеру клеток линии ТНР-1 и их фенотип методом проточной цитофлуорометрии (FacsCantoII [BD, США]). Количество мигрировавших клеток оценивали в пробирках для подсчета абсолютного количества клеток True count («BD», США). При этом клетки линии ТНР-1 окрашивали моноклональными антителами против CD18, CD11a, CD11b и CD11c (BD, США) в соответствии с указаниями производителя. В качестве контроля неспецифического связывания антител использовали окрашивание клеток неспецифическими изотипическим антителами (BD, США). Статистическую обработку данных проводили в программе AtteStat 12.1.7, используя критерий Стьюдента, непараметрические критерии Манна–Уитни и Вилкоксона.

## Результаты

При спонтанной трансмиграции клеток линии ТНР-1 через монослой клеток линии EA.hy926 в присутствии культуральной среды DMEM/F12 с добавлением 10% ЭТС в нижней камере было 26213±473 клеток линии ТНР-1. Количество клеток линии ТНР-1 в нижней камере увеличивалось

после добавления в нее TNFα в концентрации 50 Ед/мл (53078±7244, p < 0,01) по сравнению со спонтанным уровнем. Количество клеток линии ТНР-1 в нижней камере увеличивалось после добавления в нее кондиционированных сред плацент женщин группы 1 по сравнению со спонтанным уровнем их миграции (рис. 2). Количество клеток, мигрировавших в нижнюю камеру после внесения в нее секреторных продуктов плацент женщин группы 2 или плацент женщин группы 3 было ниже по сравнению со спонтанным уровнем (рис. 2). Интенсивность трансмиграции в присутствии в нижней камере секреторных продуктов ткани плацент женщин группы 1 была выше, чем в присутствии секреторных продуктов ткани плацент женщин группы 2 (рис. 2). При внесении в нижнюю камеру секреторных продуктов плацент женщин группы 3 интенсивность трансмиграции клеток линии ТНР-1 была выше по сравнению с интенсивностью миграции при внесении в нижнюю камеру секреторных продуктов плацент женщин группы 2 (рис. 2).

Параллельно с оценкой интенсивности миграции клеток линии ТНР-1 через монослой эндотелиальных клеток линии EA.hy926 оценивали экспрессию адгезионных молекул клетками линии ТНР-1 до и после их миграции. До внесения в верхнюю камеру клетки линии ТНР-1 конститутивно экспрессировали CD18, CD11a, CD11b и CD11c (спонтанный уровень, рис. 2).

Анализ данных, полученных при спонтанной трансэндотелиальной миграции, показал, что в верхней и нижней камерах количество клеток линии ТНР-1, экспрессирующих CD18, CD11b (рис. 3А), и CD11a, CD11c (рис. 3В) было ниже по сравнению с базовым уровнем экспрессии этих молекул. Отмечено, что количество клеток линии ТНР-1, экспрессирующих CD11a и CD11b, в нижней камере было меньше, чем

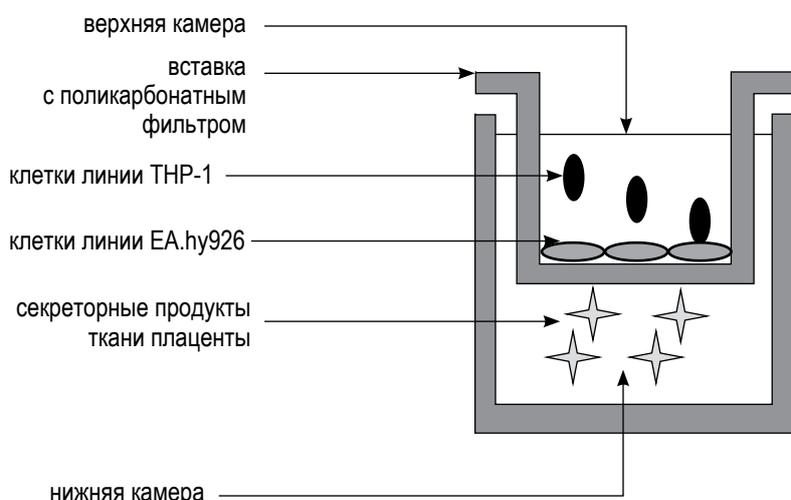


Рисунок 1. Схема внесения клеток и действующих факторов в экспериментах по трансэндотелиальной миграции моноцитоподобных клеток линии ТНР-1 через монослой эндотелиальных клеток линии EA.hy926

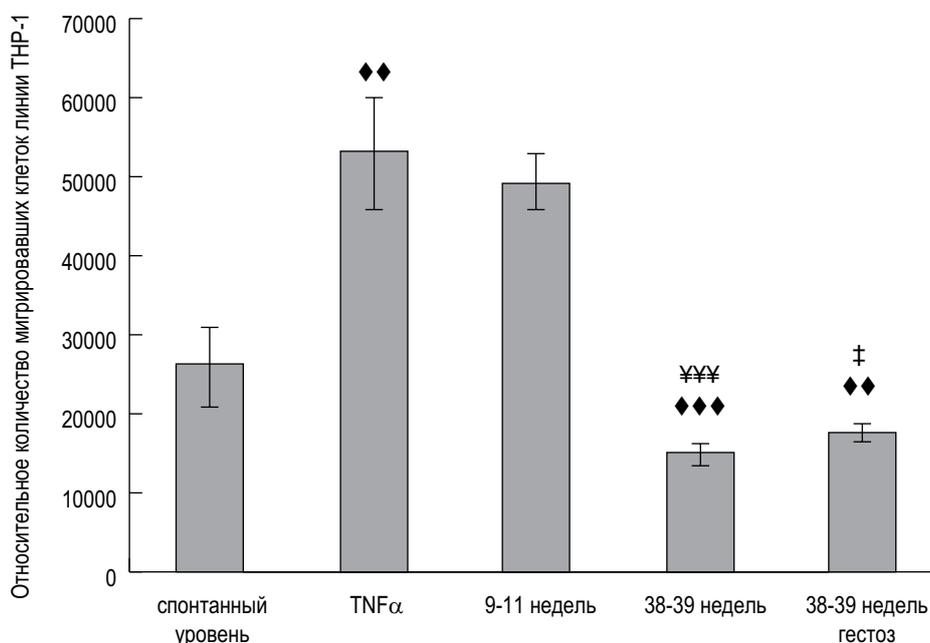
в верхней камере после спонтанной трансэндотелиальной миграции (рис. 3А, В). После спонтанной миграции из верхней камеры в нижнюю интенсивность экспрессии CD18 и CD11a клетками линии ТНР-1 снижалась (рис. 3Б, Г).

При анализе экспрессии молекул CD18, CD11a немигрировавшими клетками линии ТНР-1 в верхней камере было показано, что внесение в нижнюю камеру TNF $\alpha$  (50 Ед/мл) приводило к снижению количества клеток в верхней камере, экспрессирующих CD18 и CD11a, по сравнению со спонтанным уровнем (табл. 1). При анализе экспрессии CD18, CD11a мигрировавшими клетками линии ТНР-1 в нижней камере установлено, что внесение в нижнюю камеру TNF $\alpha$  приводило к снижению количества клеток, экспрессирующих CD18 и CD11a, по сравнению со спонтанным уровнем. Одновременно количество клеток линии ТНР-1, экспрессирующих CD11b, при добавлении TNF $\alpha$  в нижнюю камеру было выше по сравнению со спонтанным уровнем. При этом в присутствии TNF $\alpha$  интенсивность экспрессии клетками линии ТНР-1 молекул CD18, CD11a была ниже, а интенсивность экспрессии CD11b была выше по сравнению со спонтанным уровнем экспрессии клетками в нижней камере (табл. 1). Индуцированная TNF $\alpha$  трансэндотелиальная миграция сопровождалась снижением количества клеток линии ТНР-1, экспрессирующих CD18 и CD11a, а также снижением интенсивности экспрессии этих

молекул клетками в нижней камере по сравнению с верхней (табл. 1).

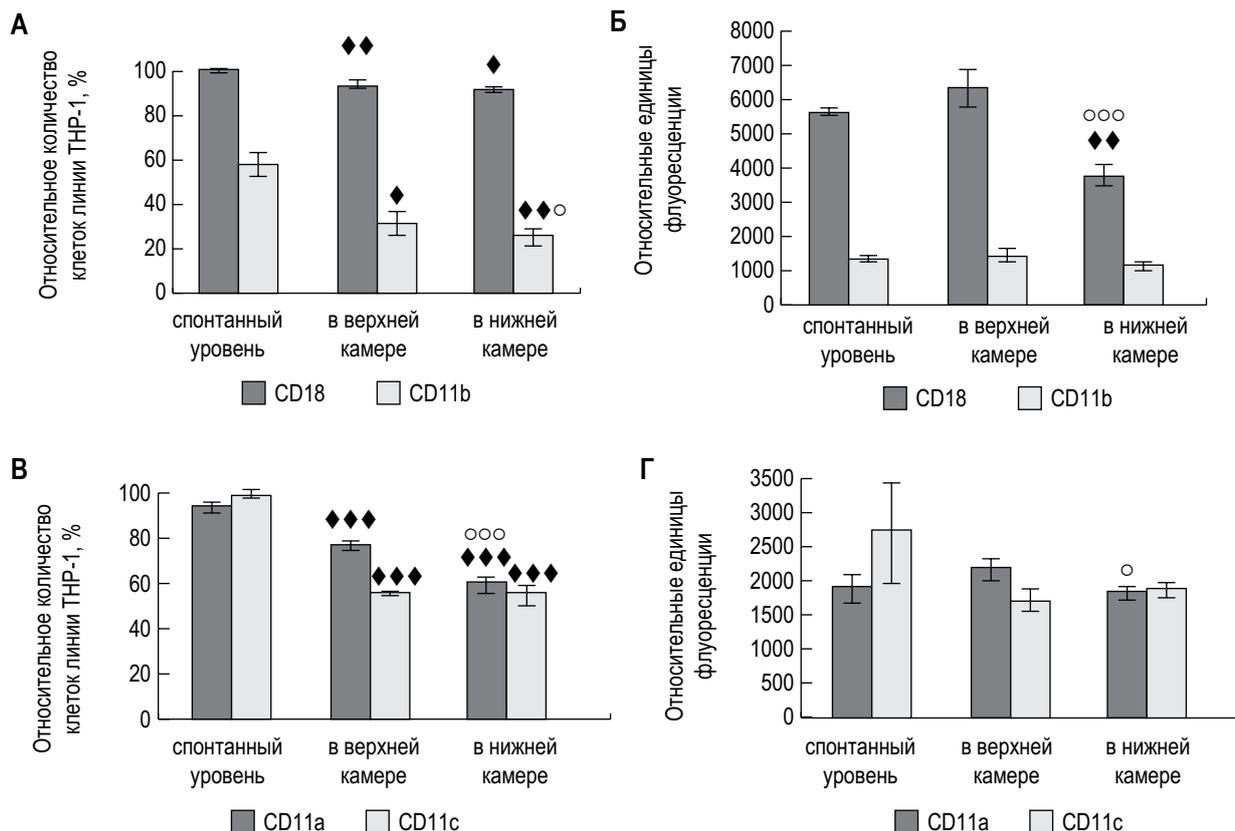
Анализ экспрессии CD18, CD11a, CD11b немигрировавшими клетками линии ТНР-1 в верхней камере показал, что внесение в нижнюю камеру кондиционированных сред, полученных после культивирования ткани плацент женщин всех исследованных групп, приводило к снижению относительного количества клеток, экспрессирующих эти адгезионные молекулы, по сравнению со спонтанным уровнем (среда DMEM/F12 с добавлением 10% ЭТС) (табл. 2). При этом количество клеток, экспрессирующих CD11c, было снижено только при внесении кондиционированных сред плацент женщин группы 2 и группы 3 по сравнению со спонтанным уровнем. Внесение в нижнюю камеру кондиционированных сред ткани плацент всех исследованных групп приводило также к снижению интенсивности экспрессии адгезионных молекул CD18, CD11a немигрировавшими клетками линии ТНР-1 в верхней камере по сравнению со спонтанным уровнем (табл. 3). При этом по сравнению со спонтанным уровнем интенсивность экспрессии CD11b была ниже при внесении кондиционированных сред плацент женщин группы 1 (физиологическая беременность, 9-11 недель) и группы 3, а интенсивность экспрессии CD11c была ниже при внесении кондиционированных сред групп 2 и 3 (табл. 3).

Межгрупповой сравнительный анализ показал, что количество немигрировавших клеток



**Рисунок 2.** Относительное количество клеток линии ТНР-1, мигрировавших через монослой эндотелиальных клеток EA.hu926 в нижнюю камеру после внесения в нее культуральной среды (спонтанный уровень) или секреторных продуктов плацент исследованных групп беременных женщин

**Примечание.** Достоверность различий между группами: группы «9-11 недель», «38-39 недель» и «38-39 недель гестоз» отличаются от спонтанного уровня миграции в нижнюю камеру ◆◆ –  $p < 0,01$ ; ◆◆◆ –  $p < 0,001$ , группа «9-11 недель» отличается от группы «38-39 недель» ¥¥¥ –  $p < 0,001$ ; группа «38-39 недель» отличается от группы «38-39 недель гестоз» ‡ –  $p < 0,05$ .



**Рисунок 3.** Изменение экспрессии CD18, CD11a, CD11b, CD11c клетками линии ТНР-1 в процессе спонтанной миграции через монослой эндотелиальных клеток линии EA.hy926

**Примечание.** А – относительное количество клеток линии ТНР-1, экспрессирующих адгезионные молекулы CD18 и CD11b; Б – интенсивность экспрессии адгезионных молекул CD18 и CD11b на клетках линии ТНР-1; В – относительное количество клеток линии ТНР-1, экспрессирующих адгезионные молекулы CD11a и CD11c; Г – интенсивность экспрессии адгезионных молекул CD11a и CD11c клетками линии ТНР-1. Достоверность различий между группами: группы «экспрессия в верхней камере» и «экспрессия в нижней камере» отличаются от базового уровня экспрессии адгезионных молекул клетками линии ТНР-1 ♦ –  $p < 0,05$ ; ♦♦ –  $p < 0,01$ , ♦♦♦ –  $p < 0,001$ ; экспрессия клетками в нижней камере отличается от экспрессии клетками в верхней камере ° –  $p < 0,05$ ; °°° –  $p < 0,001$ .

линии ТНР-1 в верхней камере, экспрессирующих CD11a, было ниже при внесении в нижнюю камеру кондиционированных сред плацент женщин группы 2 по сравнению с группой 1 (табл. 2). При этом количество этих же клеток, экспрессирующих CD11b, было выше в группе 2 по сравнению с группой 1, а также выше в группе 3 по сравнению с группой 2 (табл. 2). Следует отметить, что интенсивность экспрессии немигрировавшими клетками линии ТНР-1 молекулы CD18 была выше при внесении в нижнюю камеру кондиционированных сред плацент женщин группы 2 по сравнению с группой 1 (табл. 3). При этом интенсивность экспрессии CD11b клетками линии ТНР-1 была выше при культивировании в присутствии кондиционированных сред плацент женщин группы 3 по сравнению с группой 2 (табл. 3).

Анализ экспрессии CD18, CD11a мигрировавшими клетками линии ТНР-1 в нижней камере показал, что внесение в нижнюю камеру кондиционированных сред, полученных после куль-

тивирования ткани плацент всех исследованных групп, приводило к снижению количества клеток, экспрессирующих эти адгезионные молекулы, по сравнению со спонтанным уровнем (табл. 2). При этом количество клеток, экспрессирующих CD11b и CD11c, было снижено только при внесении кондиционированных сред плацент женщин группы 2 и группы 3, по сравнению со спонтанным уровнем (табл. 3). Внесение в нижнюю камеру кондиционированных сред плацент женщин всех исследованных групп приводило также к снижению интенсивности экспрессии адгезионных молекул CD18, CD11a и CD11b мигрировавшими клетками линии ТНР-1 в нижней камере по сравнению со спонтанным уровнем (табл. 3). При этом по сравнению со спонтанным уровнем интенсивность экспрессии CD11c была ниже при внесении кондиционированных сред плацент группы 2 и группы 3 (табл. 3).

Межгрупповой сравнительный анализ показал, что количество мигрировавших клеток линии ТНР-1 в нижней камере, экспрессирующих

ТАБЛИЦА 1. ОТНОСИТЕЛЬНОЕ КОЛИЧЕСТВО КЛЕТОК ЛИНИИ ТНР-1, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ CD18, CD11a, CD11b И CD11c, И ИНТЕНСИВНОСТЬ ИХ ЭКСПРЕССИИ, В ВЕРХНЕЙ И НИЖНЕЙ КАМЕРАХ ПОЛИКАРБОНАТНОЙ ВСТАВКИ ПОСЛЕ ТРАНСЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ МИГРАЦИИ

Адгезионные молекулы	Относительное количество клеток линии ТНР-1 (%), экспрессирующих адгезионные молекулы,						Интенсивность экспрессии адгезионных молекул клетками ТНР-1 (относительные единицы флуоресценции)			
	в верхней камере при внесении в нижнюю камеру		в нижней камере при внесении в нижнюю камеру		в верхней камере при внесении в нижнюю камеру		в нижней камере при внесении в нижнюю камеру			
	среды DMEM/F12 с добавлением 10% ЭТС (спонтанный уровень)	TNF $\alpha$ , 50 Ед/мл	среды DMEM/F12 с добавлением 10% ЭТС (спонтанный уровень)	TNF $\alpha$ , 50 Ед/мл	среды DMEM/F12 с добавлением 10% ЭТС (спонтанный уровень)	TNF $\alpha$ , 50 Ед/мл	среды DMEM/F12 с добавлением 10% ЭТС (спонтанный уровень)	TNF $\alpha$ , 50 Ед/мл	среды DMEM/F12 с добавлением 10% ЭТС (спонтанный уровень)	TNF $\alpha$ , 50 Ед/мл
CD18	91,9±1,0	87,5±2,2*	90±1,3	76,6±2,7**	6314±549,4	7154,4±399,3	3829,6±286,1#	2844,3±214,6**		
CD11a	78,1±1,9	73,9±1,9*	61,4±3,4#	32,7±6,1**	2175±163,3	2261,3±64,5	1834,2±88,4#	1179,1±125,4**		
CD11b	31,9±4,4	36,2±5,1	25,2±3,5#	35,8±3,1*	1507,4±200,8	1450,5±151,4	1192,2±96,5	1371,4±108,1*		
CD11c	57,5±0,7	54,8±1,8	56,6±3,9	54,1±5,5	1732,5±150,8	1886,0±46,3	1882±99,5	1817,0±163,4		

Примечание. Достоверность различий между группами: группа «нижняя камера» отличается от группы «верхняя камера» \* – p < 0,05; группа «ТNF $\alpha$ , 50 Ед/мл» отличается от группы «среды DMEM/F12 с добавлением 10% ЭТС» \* – p < 0,05.

ТАБЛИЦА 2. ОТНОСИТЕЛЬНОЕ КОЛИЧЕСТВО КЛЕТОК ЛИНИИ ТНР-1, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ АДГЕЗИОННЫЕ МОЛЕКУЛЫ CD18, CD11a, CD11b, CD11c В ВЕРХНЕЙ И НИЖНЕЙ КАМЕРАХ ВСТАВКИ ПОСЛЕ ИХ ИНКУБАЦИИ В ПРИСУТСТВИИ КОНДИЦИОНИРОВАННЫХ СРЕД ТКАНИ ПЛАЦЕНТ ВСЕХ ИССЛЕДОВАННЫХ ГРУПП

Адгезионные молекулы	Относительное количество клеток линии ТНР-1 (%), экспрессирующих адгезионные молекулы, после инкубации					
	в верхней камере			в нижней камере		
	при внесении в нижнюю камеру среды DMEM/F12 с добавлением 10% ЭТС (спонтанный уровень)	при внесении в нижнюю камеру секреторных продуктов тканей плацент женщин с физиологической беременностью (9-11 недель) (группа 1)	при внесении в нижнюю камеру секреторных продуктов тканей плацент женщин с физиологической беременностью (39-39 недель) (группа 2)	при внесении в нижнюю камеру среды DMEM/F12 с добавлением 10% ЭТС (спонтанный уровень)	при внесении в нижнюю камеру секреторных продуктов тканей плацент женщин с физиологической беременностью (9-11 недель) (группа 1)	при внесении в нижнюю камеру секреторных продуктов тканей плацент женщин с физиологической беременностью (39-39 недель) (группа 2)
CD18	91,9±1,0	87,9±0,5**	86,9±0,5**	90±1,3	82,3±0,7***##	87,2±0,7***
CD11a	78,1±1,9	70,5±0,6**	65,5±0,5***##	61,4±3,4	55,2±2,6*	45±1,2***##
CD11b	31,9±4,4	22,7±0,4**	25,2±1,1***#	25,2±3,5	23,3±0,6	18,6±0,7***##
CD11c	57,5±0,7	53,3±1,7	53,1±0,3**	56,6±3,9	52,9±3,7	48,7±0,6***##

Примечание. Достоверность различий между группами: группы «9-11 недель», «38-39 недель» и «38-39 недель гестоз» отличаются от спонтанного уровня \* – p < 0,05; \*\* – p < 0,01; группа «9-11 недель» отличается от группы «38-39 недель» † – p < 0,01; †† – p < 0,001; группа «38-39 недель гестоз» отличается от группы «38-39 недель гестоз» †† – p < 0,001; количество клеток в нижней камере отличается от количества клеток в верхней камере в присутствии кондиционированных сред плацент одной и той же группы # – p < 0,05; ## – p < 0,01; ### – p < 0,001.

**ТАБЛИЦА 3. ИЗМЕНЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ЭКСПРЕССИИ АДГЕЗИОННЫХ МОЛЕКУЛ CD18, CD11a, CD11b, CD11c КЛЕТКАМИ ЛИНИИ ТНР-1 В ВЕРХНЕЙ И НИЖНИХ КАМЕРАХ ВСТАВКИ ПОСЛЕ ИХ ИНКУБАЦИИ В ПРИСУТСТВИИ КОНДИЦИОНИРОВАННЫХ СРЕД ТКАНИ ПЛАЦЕНТ ВСЕХ ИССЛЕДОВАННЫХ ГРУПП**

Адгезионные молекулы	Интенсивность экспрессии адгезионных молекул (относительные единицы флуоресценции) клетки линии ТНР-1					
	в верхней камере			в нижней камере		
	при внесении в нижнюю камеру среды ДМЕМ/F12 с добавленным 10% ЭТС (спонтанный уровень)	при внесении в нижнюю камеру секреторных продуктов тканей плацент женщин с физиологической беременностью (9-11 недель) (группа 1)	с физиологической беременностью (39-39 недель) (группа 2)	при внесении в нижнюю камеру секреторных продуктов тканей плацент женщин с физиологической беременностью (9-11 недель) (группа 1)	с физиологической беременностью (39-39 недель) (группа 2)	с беременностью, осложненной гестозом (38-39 недель) (группа 3)
CD18	631,4±549,4	4064±105***	5052,2±186,4***	5428±164,3***	3392,9±67,3***	3358,3±93,3***
CD11a	2175±163,3	1698,7±26,1***	1719±18,8***	1775±20,1***	1582,4±39,3***	1462,9±20,6***
CD11b	1507,4±200,8	1278,4±14,2***	1293±51,1	1434,2±26,1***	902,9±19***	793,7±35,5***
CD11c	1732,5±150,8	1605,2±64,4	1585,8±9,5***	1606,2±12,9***	1829,7±58	1596,9±30,6***

**Примечание.** Достоверность различий между группами: группы «9-11 недель», «38-39 недель» и «38-39 недель гестоз» отличаются от спонтанного уровня \*\*\* –  $p < 0,001$ ; группа «9-11 недель» отличается от группы «38-39 недель» ††† –  $p < 0,001$ ; †† –  $p < 0,01$ ; † –  $p < 0,05$ ; группа «38-39 недель» отличается от группы «38-39 недель гестоз» † –  $p < 0,05$ ; экспрессия в нижней камере отличается от экспрессии в верхней камере в присутствии кондиционированных сред плацент одной и той же группы \* –  $p < 0,05$ ; † –  $p < 0,01$ ; ††† –  $p < 0,001$ .

CD11a, CD11b было ниже, а CD18 – выше, при внесении в нижнюю камеру кондиционированных сред плацент женщин группы 2 по сравнению с группой 1 (табл. 2). Интенсивность экспрессии мигрировавшими клетками линии ТНР-1 молекул CD11a, CD11b, CD11c была ниже при внесении в нижнюю камеру кондиционированных сред плацент женщин группы 2 по сравнению с группой 1 (табл. 3). Индуцированная трансэндотелиальная миграция внутри одной и той же группы сопровождалась снижением в нижней камере по сравнению с верхней камерой количества клеток, экспрессирующих CD18, после инкубации с кондиционированными средами плацент женщин группы 1 и экспрессирующих CD11a, CD11b, CD11c после инкубации с кондиционированными средами плацент женщин групп 2 и 3 (табл. 2). Также отмечено снижение интенсивности экспрессии адгезионных молекул клетками в нижней камере по сравнению с клетками в верхней камере: CD18, CD11a и CD11b в группе 1, CD18 и CD11b в группе 2, CD18, CD11b и CD11c в группе 3 (табл. 3).

## Обсуждение

Усиленная трансэндотелиальная миграция в присутствии факторов, секретируемых тканью плацент женщин всех исследованных групп, по сравнению со спонтанным уровнем может быть связана с отмеченным ранее содержанием в кондиционированных средах плацент как хемоаттрактантов, так и провоспалительных цитокинов [3]. В используемой нами модели высокий уровень трансэндотелиальной миграции клеток линии ТНР-1 под влиянием факторов, секретируемых тканью плаценты на сроке 9-11 недель, может быть связан с высоким уровнем секреции тканью плаценты в первом триместре цитокинов IL-8 и IL-6 [3]. Повышенная секреция этих цитокинов тканью плаценты вызывает активацию ЭК [7, 18, 19], что приводит к повышенной экспрессии адгезионных молекул ЭК (CD54, CD62P) [4], и может определять трансэндотелиальную миграцию моноцитов в ткань плаценты и децидуальную ткань. Высокий уровень миграции моноцитов на ранних этапах развития беременности способствует быстрому развитию и росту ткани плаценты и децидуальной ткани [13, 20].

В третьем триместре физиологической беременности секреция тканью плаценты IL-8 и IL-6 уменьшается [3], что может являться причиной установленного нами сниженного уровня трансэндотелиальной миграции клеток линии ТНР-1. Ранее нами было отмечено, что экспрессия эндотелиальными клет-

ками молекулы CD54, являющейся лигандом адгезионных молекул моноцитов CD11a, CD11b, CD11c, под влиянием факторов, секретируемых тканью плаценты в третьем триместре физиологической беременности, была ниже по сравнению с экспрессией в присутствии факторов плацент первого триместра [4]. Одновременно при трансэндотелиальной миграции количество моноцитоподобных клеток линии ТНР-1 в верхней камере, экспрессирующих CD11a, было ниже. Эти данные указывают на участие CD54 и CD11a в описанном ранее снижении количества мононуклеаров в ткани плаценты в третьем триместре беременности [12], что соответствует завершению развития ткани плаценты.

Установленное нами повышение трансэндотелиальной миграции клеток линии ТНР-1 под влиянием факторов, секретируемых тканью плаценты при гестозе, по сравнению с терминальными сроками физиологической беременности сопровождается повышенным количеством клеток линии ТНР-1 в верхней камере, экспрессирующих CD11b, а также повышенной интенсивностью экспрессии этой молекулы. Другими авторами была показана повышенная экспрессия CD11a, CD11b и CD11c на лейкоцитах периферической крови женщин с беременностью, осложненной гестозом [15, 16]. На мышинной модели показано, что активация CD11b на лейкоцитах усиливает их миграцию даже через интактный эндотелий [25]. Эти данные позволяют предположить, что повышение экспрессии CD11b лейкоцитами периферической крови и наличие градиента концентрации хемокинов является одним из механизмов развития воспаления в ткани плаценты и в децидуальной ткани при гестозе в условиях *in vivo*. Усиление экспрессии CD11b клетками линии ТНР-1, находящимися в верхней камере, в нашей модели может быть связано как с прямым воздействием секреторных продуктов тка-

ни плаценты (IL-6, IL-8 [3, 14]) на эти клетки, так и с индукцией этими факторами активации ЭК. Ранее отмечено, что секреторные продукты ткани плаценты при гестозе стимулируют синтез bFGF эндотелиальными клетками [5]. В присутствии провоспалительных цитокинов bFGF способен стимулировать трансэндотелиальную миграцию моноцитов [27]. Гестоз сопровождается секрецией тканью плаценты провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$  и повышенной по сравнению с физиологической беременностью секрецией IL-6 [3]. В таких условиях усиление секреции bFGF ЭК в присутствии факторов плацент женщин с беременностью, осложненной гестозом, может вносить вклад в развитие воспаления в ткани плаценты и в децидуальной ткани за счет привлечения моноцитов периферической крови.

Таким образом, полученные нами результаты отражают участие молекулы CD11a в механизмах привлечения моноцитов в условиях *in vivo* в ткань плаценты и децидуальную ткань по мере развития физиологической беременности. При беременности, осложненной гестозом, усиленная трансэндотелиальная миграция моноцитов опосредована усилением экспрессии CD11b моноцитами под влиянием факторов плацент женщин с беременностью, осложненной гестозом, что в совокупности с отмеченными ранее повышенной секрецией IL-6 тканью плаценты при гестозе и усиленной секрецией bFGF эндотелиальными клетками, способствует в условиях *in vivo* инициации и прогрессированию воспалительного процесса в ткани плаценты.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ ГК № 02.740.11.0711 и грантов Президента РФ № НШ-3594.2010.7 и МД-150.2011.7, гранта для молодых ученых Правительства Санкт-Петербурга (34/05-07/12-МУ).

## Список литературы

1. Айламазян Э.К., Соколов Д.И., Сельков С.А. Гестоз и атеросклероз: общность патогенетических механизмов // Журнал акушерства и женских болезней. – 2009. – Т. LVIII, № 1. – С. 4-15.
2. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. – СПб.: Фолиант, 2008. – 552 с.
3. Соколов Д.И., Лесничия М.В., Селютин А.В., Климова В.А., Аржанова О.Н., Сельков С.А. Роль цитокинов в контроле развития плаценты в норме и при гестозе // Иммунология. – 2009. – № 1. – С. 22-27.
4. Степанова О.И., Львова Т.Ю., Пюрбеева Е.Н., Миравшвили М.И., Зайнулина М.С., Сельков С.А., Соколов Д.И. Влияние растворимых продуктов ткани плаценты на экспрессию адгезионных молекул эндотелиальными клетками EA.Hy926 // Медицинская иммунология. – 2011. – Т. 16, № 6. – С. 589-596.
5. Степанова О.И., Сафронова Н.Ю., Фураева К.Н., Львова Т.Ю., Соколов Д.И., Сельков С.А. Влияние секреторных факторов плаценты на продукцию цитокинов эндотелиальными клетками // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т. 154, № 9. – С. 361-364.

Ссылки 6-27 см. в References (стр. 140). See References for numbers 6-27 at p. 140.

## References

1. Aylamazyan E.K., Sokolov D.I., Sel'kov S.A. Gestoz i ateroskleroz: obshchnost' patogeneticheskikh mekhanizmov [Eclampsia and atherosclerosis: a generality of pathogenetic mechanisms]. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney – Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2009, vol. LVIII, no. 1, pp. 4-15.

2. Ketlinskiy S.A., Simbirtsev A.S. Tsitokiny [Cytokines]. *St. Petersburg, Foliant – Foliant, 2008. 552 p.*
3. Sokolov D.I., Lesnichiya M.V., Selyutin A.V., Klimova V.A., Arzhanova O N., Sel'kov S.A. Rol' tsitokinov v kontrole razvitiya platsenty v norme i pri gestoze [The role of cytokines in the control of placental development in norm and in eclampsia]. *Immunologiya – Immunology, 2009, no. 1, pp. 22-27.*
4. Stepanova O.I., L'vova T.Yu., Pyurbeeva E.N., Mirashvili M.I., Zaynulina M.S., Sel'kov S.A., Sokolov D.I. Vliyaniye rastvorimykh produktov tkani platsenty na ekspressiyu adgezionnykh molekul endotelial'nykh kletkami EA.Hy926 [Influence of soluble placental tissue-derived molecules upon expression of adhesion molecules by EA.Hy926 endothelial cells]. *Meditsinskaya immunologiya – Medical Immunology, 2011, vol. 16, no. 6, pp. 589-596.*
5. Stepanova O.I., Safronova N.Yu., Furaeva K.N., L'vova T.Yu., Sokolov D.I., Sel'kov S.A. Vliyaniye sekretornykh faktorov platsenty na produktsiyu tsitokinov endotelial'nykh kletkami [Placenta secretory factors influence on cytokines production by endothelial cells]. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny – Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2012, vol. 154, no. 9, pp. 361-364.*
6. Cartwright J.E., Fraser R., Leslie K., Wallace A.E., James J.L. Remodelling at the maternal-fetal interface: relevance to human pregnancy disorders. *Reproduction, 2010, vol. 140, pp. 803-813.*
7. Chen Q., Stone P., Ching L.M., Chamley L. A role for interleukin-6 in spreading endothelial cell activation after phagocytosis of necrotic trophoblastic material: implications for the pathogenesis of preeclampsia. *J. Pathol., 2009, vol. 217, pp. 122-130.*
8. Denison F.C., Kelly R.W., Calder A.A., Riley S.C. Cytokine secretion by human fetal membranes, decidua and placenta at term. *Human Reproduction, 1998, vol. 13, no. 12, pp. 3560-3565.*
9. Edgell C.S., McDonald C.C., Graham J.B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization (endothelium/somatic cell genetics/differentiated cell lines/von Willebrand factor/hemostasis). *Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1983, vol. 80, pp. 3734-3737.*
10. Gomez-Lopez N., Guilbert L.J., Olson D.M. Invasion of the leukocytes into the fetal-maternal interface during pregnancy. *J. Leukoc. Biol., 2010, vol. 88, pp. 1-9.*
11. Holtan S.G., Creedon D.J., Haluska P., Markovic S.N. Cancer and pregnancy: parallels in growth, invasion, and immune modulation and implications for cancer therapeutic agents. *Mayo Clin. Proc., 2009, vol. 84, no. 11, pp. 985-1000.*
12. Ingman K., Cookson V.J.K.W., Jones C.J.P., Aplin J.D. Characterisation of Hofbauer cells in first and second trimester placenta: incidence, phenotype, survival *in vitro* and motility. *Placenta, 2010, vol. 31, pp. 535-544.*
13. Khan S., Katabuchi H., Araki M., Nishimura R., Okamura H. Human villous macrophage-conditioned media enhance human trophoblast growth and differentiation *in vitro*. *Biology of Reproduction, 2000, vol. 62, pp. 1075-1083.*
14. Li C., Houser B.L., Nicotra M.L., Strominger J.L. HLA-G homodimer-induced cytokine secretion through HLA-G receptors on human decidual macrophages and natural killer cells. *PNAS, 2009, vol. 106, no. 14, pp. 5767-5772.*
15. Luppi P., Haluszczak C., Betters D., Richard C.A.H., Trucco M., DeLoia J.A. Monocytes are progressively activated in the circulation of pregnant women. *J. Leukoc. Biol., 2002, vol. 72, pp. 874-884.*
16. Mellembakken J.R., Aukrust P., Olafsen M.K., Ueland T., Hestdal K., Videm V. Activation of leukocytes during the uteroplacental passage in preeclampsia. *Hypertension, 2002, vol. 39, pp. 155-160.*
17. Pavlov O.V., Sel'kov S.A., Seliutin A.V., Anan'eva V.V. Secretion of tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1 by placental macrophages *in vitro* during various pregnancy outcomes. *Biull. Eksp. Biol. Med., 1999, vol. 128, no. 7, pp. 97-100.*
18. Petreaca M.L., Yao M., Liu Y., DeFea K., Martins-Green M. Transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-2 by interleukin-8 (IL-8/CXCL8) is required for IL-8/CXCL8-induced endothelial permeability. *Molecular Biology of the Cell, 2007, vol. 18, pp. 5014-5023.*
19. Schraufstatter I.U., Chung J., Burger M. IL-8 activates endothelial cell CXCR1 and CXCR2 through Rho and Rac signaling pathways. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol., 2001, vol. 280, pp. L1094-L1103.*
20. Seval Y., Korgun E.T., Demir R. Hofbauer cells in early human placenta: possible implications in vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta, 2007, vol. 28, pp. 841-845.*
21. Singh U., Nicholson G., Urban B.C., Sargent I.L., Kishore U., López Bernal A. Immunological properties of human decidual macrophages – a possible role in intrauterine immunity. *Reproduction, 2005, vol. 129, pp. 631-637.*
22. Smith C.W., Marlin S.D., Rothlein R., Toman C., Anderson D.C. Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils *in vitro*. *J. Clin. Invest., 1989, vol. 83, pp. 2008-2017.*
23. Van Mourik M.S.M., Macklon N.S., Heijnen C.J. Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. *J. Leukoc. Biol., 2009, vol. 85, pp. 4-19.*
24. Verma S., Hiby S.E., Loke Y.W., King A. Human decidual natural killer cells express the receptor for and respond to the cytokine interleukin 15. *Biology of Reproduction, 2000, vol. 62, pp. 959-968.*
25. Woollard K.J., Suhartoyo A., Harris E.E., Eisenhardt S.U., Jackson S.P., Peter K., Dart A.M., Hickey M.J., Chin-Dusting J.P.F. Pathophysiological levels of soluble P-Selectin mediate adhesion of leukocytes to the endothelium through Mac-1 activation. *Circ. Res., 2008, vol. 103, pp. 1128-1138.*
26. Yagel S., Livni N., Zacut D., Gallily R. Characterization and localization of human placental mononuclear phagocytes by monoclonal antibodies and other cell markers. *Isr. J. Med. Sci., 1990, vol. 26, no. 5, pp. 243-249.*
27. Zittermann S.I., Issekutz A.C. Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF, FGF-2) potentiates leukocyte recruitment to inflammation by enhancing endothelial adhesion molecule expression. *Am. J. Pathol., 2006, vol. 168, pp. 835-846.*