

ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ КАК ВОЗМОЖНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ ИММУННОЙ ПЕРЕСТРОЙКИ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ

Черных Е.Р., Селедцова Н.В., Леплина О.Ю.,
Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Курганова Е.В.,
Хонина Н.А., Останин А.А., Пасман Н.М.¹

НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск

¹Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

Резюме. В работе исследовались фенотипические и функциональные характеристики IFN α -индуцированных дендритных клеток (ДК) при физиологической беременности и гиперандрогении надпочечникового генеза, а также оценивалось влияние гормона коры надпочечников – дегидроэпиандростерона сульфата (ДГЭАС) на функциональную активность ДК *in vitro*. По сравнению с небеременными женщинами ДК беременных отличались признаками задержки созревания/активации, тогда как у беременных с гиперандрогенией (ГА) доля зрелых CD83⁺ и активированных CD25⁺ДК была сходна с таковой у небеременных женщин. Сыворотки крови женщин с физиологической беременностью подавляли генерацию зрелых CD83⁺ДК, тогда как сыворотки крови беременных с ГА и непосредственно ДГЭАС стимулировали созревание и активацию ДК. Анализ способности ДК стимулировать экспрессию Th1 (IFN γ) и Th2 (IL-4) цитокинов в СКЛ показал, что в отличие от небеременных женщин, ДК которых активировали Th1-клетки, ДК женщин с физиологической беременностью стимулировали преимущественно CD3⁺IL-4⁺T-клетки. ДК беременных с ГА стимулировали T-клетки к продукции как Th1, так и Th2-цитокинов. При этом добавление ДГЭАС в культуры ДК беременных усиливало их Th1-поляризующую активность. ДК женщин с физиологической беременностью оказывали ингибирующий эффект на активированные NK-клетки, что проявлялось снижением относительного количества CD56⁺CD16⁺ клеток и увеличением уровня их апоптоза. Указанная активность ДК частично ослаблялась в присутствии ДГЭАС. Полученные результаты раскрывают новые механизмы иммуно-эндокринных взаимодействий при физиологической и осложненной беременности.

Ключевые слова: дендритные клетки, фенотип, Th1/Th2, ДГЭАС, беременность.

Chernykh E.R., Seledtsova N.V., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Tyrinova T.V., Kurganova E.V., Khonina N.A., Ostanin A.A., Pashman N.M.

DENDRITIC CELLS AS POSSIBLE REGULATORS OF IMMUNE RE-ORGANIZATION IN PREGNANCY

Abstract. The present work was aimed to evaluation of phenotype and functional properties of IFN α -induced dendritic cells (DCs) in normal pregnancy, and in cases complicated with suprarenal hyperandrogenia (HA), as well as *in vitro* assessment of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) effects upon DC functions. As compared with non-pregnant women, DCs from healthy pregnant women are notable for impaired maturation/activation, whereas fractions of mature (CD83⁺) and activated (CD25⁺) cells DC were similar in normal pregnancy and in women with HA. Blood sera from healthy pregnant women inhibited generation of mature DCs, whereas sera of women with HA and direct supplementation with DHEAS enhanced maturation and activation of DCs. Functional analysis of DC capacity to stimulate Th1 (IFN γ)

Адрес для переписки:

Черных Елена Рэмовна,
НИИ клинической иммунологии СО РАМН
630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: (383) 236-03-29.
Факс: (383) 222-70-28.
E-mail: ct_lab@mail.ru

and Th2 (IL-4) cytokine expression in MLC has shown that, in contrast to non-pregnant women with T1-cell activation by DCs, the DCs from healthy pregnant women caused predominant activation of CD3⁺IL-4⁺T-cells. In HA-complicated pregnancy, DCs were capable to stimulate both Th1- and Th2-cytokine production in T-cell populations. Meanwhile, addition of DHEAS to DCs cultures were accompanied by enhancement of their T1-polarizing activity. DCs from women with normal pregnancy exerted inhibitory effect upon activated NK-cells that was evidenced by a relative decrease in CD56⁺CD16⁺ cells counts and increased apoptosis levels. This function of DCs was partially abrogated in presence of DHEAS. The results obtained reveal new mechanisms of immune/endocrine interactions in normal and complicated pregnancy. (*Med. Immunol.*, vol. 11, N 6, pp 541-548)

Введение

Успешное течение беременности связано с включением сложных регуляторных механизмов, которые позволяют плоду расти и развиваться, несмотря на распознавание фетальных аллоантигенов иммунной системой матери. Формирование иммунологической толерантности связывают с апоптозом и/или анергией аллореактивных Т-клеток, переключением с Т-хелперов 1 типа (Th1) на Т-хелперы 2 типа (Th2), генерацией регуляторных Т-клеток [12, 19]. Однако многие тонкие механизмы, ответственные за включение и выключение этих процессов, остаются до сих пор непонятными.

Исследования в области трансплантационной иммунологии показали, что важную роль в индукции толерантности к аллоантигенам играют дендритные клетки (ДК), которые способны не только активировать, но и подавлять иммунный ответ. ДК являются специализированными клетками, презентующими антигены Т-лимфоцитам. При этом характер Т-клеточного ответа (активация или ингибция) и его направленность (дифференцировка в сторону Th1 или Th2) во многом зависят от гистогенетического происхождения, зрелости и функциональной активности ДК. До недавнего времени считалось, что наличие толерогенной/супрессорной активности ассоциировано с состоянием незрелости ДК (для миелоидных ДК) или их принадлежностью к лимфоидному ряду (плазматикоидные ДК). Однако последние исследования продемонстрировали, что зрелые ДК также способны проявлять толерогенные свойства, причем эти свойства могут индуцироваться под действием иммуносупрессорных цитокинов, простагландина E₂, витамина D₃, молекул HLA-G и некоторых других факторов [7, 21]. Кроме того, имеются веские основания предполагать, что функциональная активность ДК в определенной степени подвержена гормональной регуляции [15, 20].

Проведенные нами ранее исследования показали, что угроза прерывания беременности на фоне надпочечниковой гиперандрогении ассоциирована с дефектом супрессорной перестройки [1]. Действительно, хорошо известно, что гормон коры надпочечников дегидроэпиандростерон (и его сульфатированная форма – ДГЭАС)

является естественным антагонистом глюкокортикоидов и способен активировать иммунную систему, в том числе активировать Th1-ответ и естественные киллерные клетки (NK-клетки) [18]. Кроме того, нами было показано, что ДГЭАС в культуре *in vitro* стимулирует созревание ДК [2].

Исходя из вышеизложенного было высказано предположение, что физиологическое течение беременности ассоциировано с доминированием толерогенной активности дендритных клеток, тогда как при надпочечниковой гиперандрогении ДК проявляют иммуностимулирующую активность. Следует отметить, что большинство вопросов, касающихся характеристики ДК человека, тем более их регуляторной активности при беременности остаются недостаточно изученными. Поэтому целью работы явилось исследование фенотипических и функциональных характеристик ДК при физиологической беременности и гиперандрогении надпочечникового генеза, а также оценка влияния ДГЭАС на функциональную активность ДК *in vitro*.

Материалы и методы

В исследование были включены 42 небеременные женщины фертильного возраста, 60 женщин с физиологической беременностью и 36 беременных с гиперандрогенией надпочечникового генеза (все беременные со сроком гестации до 22 недель).

Мононуклеарные клетки (МНК) получали центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколла-верографина. Моноциты выделяли на чашках Петри (Nunc, Дания) путем прилипания к пластике МНК (2-5 × 10⁶/мл) в присутствии 10% сыворотки крови АВ (IV) группы. ДК генерировали путем культивирования моноцитов в 6-луночных планшетах (Nunc, Германия) в течение 5 сут. в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 5% сыворотки плодов коровы (FCS, Биолот, Санкт-Петербург) в присутствии GM-CSF (40 нг/мл, Sigma-Aldrich, США) и IFN α (1000 Ед/мл, Роферон-А, Roche, Швейцария) при 37 °С в CO₂-инкубаторе. Созревание ДК индуцировали липополисахаридом (10 мкг/мл, LPS *E. coli* 0114:B4, Sigma-Aldrich), который вносили за 24 ч до окончания культивирования.

Влияние ДГЭАС (Sigma-Aldrich, Cat. No D5297) на функциональную активность ДК оценивали, добавляя гормон в концентрации 10^{-6} М на этапе индукции созревания (совместно с LPS за 24 ч до окончания культивирования).

Оценку поверхностных маркеров проводили методом одноцветной или двухцветной проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, Becton Dickinson) с использованием программы Cell Quest (Becton Dickinson, США). Для оценки поверхностных маркеров ДК использовали меченные фикоэритрином (PE) или флуоресцентинизотионатом (FITC) анти-CD83, анти-CD25 (BD PharMingen, США), анти-CD14 моноклональные антитела (Сорбент, Москва).

Влияние сывороток крови женщин с физиологическим течением беременности и беременных с гиперандрогенией на фенотип генерируемых ДК оценивали, добавляя образцы интактных сывороток (в концентрации 10% v/v) в культуры ДК доноров на этапе индукции созревания (совместно с LPS за 24 ч до окончания культивирования). Средняя концентрация ДГЭАС в сыворотках крови женщин с физиологической беременностью составляла $0,63 \pm 0,1$ мкг/мл, у беременных с гиперандрогенией — $9,3 \pm 0,6$ мкг/мл.

Оценку экспрессии внутриклеточных цитокинов в популяции Т-клеток, стимулированных дендритными клетками в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ), проводили методом трехцветной проточной цитометрии. Для этого МНК ($0,1 \times 10^6$ /лунку), истощенные от моноцитов, культивировали в 96-луночных планшетах в полной среде RPMI-1640 с 10% FCS в отсутствие и присутствии ДК в соотношении 10:1 в течение 72 ч. За 18 ч до конца инкубации в культуру добавляли брэфелдин (ISN, 10 мкг/мл). Затем клетки отмывали и инкубировали 15 мин при комнатной температуре с 5 мкл меченных аллофикоцианином (APC) анти-CD3 МАТ (Becton Dickinson, США). Далее проводили пермеабиллизацию клеток с помощью 0,2% раствора Твин-20 и инкубировали их с FITC-конъюгированными анти-IFN γ и PE-мечеными анти-IL-4 антителами (Becton Dickinson, США). Образцы анализировали на проточном цитометре с использованием программы Cell Quest.

Продукцию Th1/Th2 цитокинов (IFN γ /IL-4) оценивали в 5-суточных супернатантах СКЛ (при соотношении МНК:ДК, как 10:1) с помощью иммуноферментного анализа, используя соответствующие тест-системы в соответствии с инструкцией фирмы-производителя («Вектор-Бест», Новосибирск).

Для оценки влияния интактных и ДГЭАС-модифицированных ДК (ДКИНТ и ДКДГЭАС соответственно) на НК-клетки МНК культиви-

ровали в течение 24 ч в отсутствие (контроль) и в присутствии (опыт) ДК в соотношении 3:1. Относительное содержание активированных CD56⁺CD16⁺НК-клеток определяли методом проточной цитометрии с использованием PE-меченных анти-CD16 и FITC-меченных анти-CD56 МАТ (Сорбент, Москва). Оценку клеточного цикла и уровень апоптоза в популяции CD56⁺CD16⁺НК-клеток проводили с помощью окрашивания клеток Actinomycin D, 7-Amino (Calbiochem, Германия). Относительное содержание клеток с гипердиплоидным (клетки в S-M фазах клеточного цикла), диплоидным (клетки в G₀/G₁ фазах клеточного цикла) и гиподиплоидным (апоптотические клетки) набором ДНК определяли по степени флуоресценции красителя. Результаты выражали в виде процентного соотношения позитивных клеток к общему количеству клеток (не менее 10 000) в исследуемой области.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ «Statistica 6.0» для Windows. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический U-критерий Вилкоксона—Манна—Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Данные приведены в виде среднего арифметического значения (M) и стандартной ошибки среднего (S.E.).

Результаты

Поскольку функциональная активность ДК во многом зависит от степени их зрелости, отправной точкой исследования явилась оценка поверхностных маркеров ДК беременных женщин. Контролем служили ДК небеременных фертильных женщин. Как видно из данных таблицы 1, в группе женщин с физиологической беременностью среди генерированных ДК регистрировалось 2-кратное снижение относительного количества зрелых (CD83⁺) и активированных (CD25⁺) клеток ($p_U < 0,01$). В то же время у беременных с надпочечниковой гиперандрогенией (ГА+) снижения доли CD83⁺ и CD25⁺ ДК не отмечалось, и популяция ДК по своему фенотипу была схожей с таковой в контрольной группе. Соответственно, относительное количество CD83⁺ и CD25⁺ ДК у этих женщин было в 2 раза выше, чем при физиологической беременности. Наряду с увеличением доли зрелых и активированных клеток популяция ДК беременных с ГА отличалась повышенным содержанием клеток с маркером моноцитов/макрофагов (CD14⁺). Чтобы объяснить причину одновременного увеличения числа CD83⁺ и CD14⁺ клеток, в отдельной серии экспериментов была исследована ко-экспрессия этих молекул на ДК. Оказалось, что в группе женщин с физиологической

ТАБЛИЦА 1. ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДК

Маркеры	Небеременные женщины	Беременные ГА (-)	Беременные ГА (+)
CD14	19,9±2,7 (20)	18,0±2,4 (33)	31,1±5,8 [#] (10)
CD25	22,7±4,1 (17)	9,3±1,3 ^{**} (18)	26,9±2,9 ^{##} (13)
CD83	24,0±3,3 (22)	10,7±1,2 ^{**} (33)	25,9±1,8 ^{##} (18)
CD14 ⁺ CD83 ⁻	НД	12,2±3,5 (16)	17,6±4,0 (10)
CD14 ⁺ CD83 ⁺	НД	4,3±0,9 (16)	14,0±2,5 ^{##} (10)
CD14 ⁻ CD83 ⁺	НД	4,3±0,5 (16)	10,6±2,5 ^{##} (10)

Примечание. Представлено относительное содержание ДК ($M \pm S.E.$), экспрессирующих данный маркер, в группах небеременных женщин, беременных с физиологической гестацией (ГА-) и беременных с надпочечниковой гиперандрогенией (ГА+); в скобках – количество наблюдений; НД – нет данных. ** – $p_U < 0,01$ – достоверность различий по сравнению с группой небеременных женщин; # – $p_U < 0,05$, ## – $p_U < 0,01$ – достоверность различий по сравнению с группой женщин с физиологической беременностью (U – критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

беременностью примерно половина CD83⁺ клеток ко-экспрессировала на своей поверхности CD14 (4,3±0,9%). Статистически значимое 3-кратное увеличение CD14⁺CD83⁺ клеток у беременных с гиперандрогенией (до 14,0±2,5%, $p_U < 0,01$), по-видимому, обуславливает одновременное возрастание как CD14⁺, так и CD83-позитивных ДК, зарегистрированное в данной подгруппе женщин.

Поскольку беременность сопровождается усилением продукции половых гормонов и изменением баланса цитокинов, можно полагать, что указанные факторы влияют на функциональную

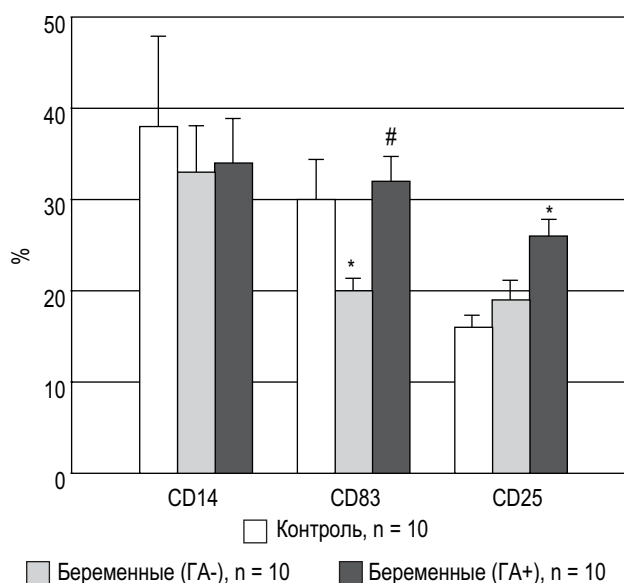


Рисунок 1. Влияние сывороток крови беременных с физиологической беременностью (ГА-) и с гиперандрогенией (ГА+) на фенотип ДК

Примечание. Представлены средние значения ($M \pm S.E.$) относительного количества ДК, экспрессирующих соответствующие маркеры.

* – $p_U < 0,05$, достоверность различий по сравнению с контрольными культурами ДК; # – $p_U < 0,05$, достоверность различий по сравнению с культурами ДК, генерированными в присутствии 10% сыворотки крови здоровых беременных (U – критерий Вилкоксона–Манна–Уитни в сопряженных парах).

активность предшественников ДК и/или их созревание. Действительно, сыворотки крови женщин с физиологической беременностью при добавлении в культуры ДК доноров ингибировали созревание ДК, что проявлялось снижением относительного количества CD83⁺ клеток (рис. 1). В то же время сыворотки беременных с ГА не оказывали ингибирующего эффекта на содержание CD83⁺ДК и, более того, вызывали возрастание числа активированных CD25⁺ДК, что могло быть обусловлено стимулирующим действием ДГЭАС. Действительно, анализ влияния ДГЭАС на фенотип ДК женщин с физиологической беременностью показал, что добавление гормона на этапе созревания ДК сопровождается достоверным увеличением числа CD83⁺ (с 17,0±2,4% до 21,5±3,1%; $n = 10$; $p_U < 0,01$) и CD25⁺ клеток (с 8,8±2,2% до 12,0±2,1%; $n = 10$; $p_U < 0,05$).

Таким образом, при физиологической беременности, генерируемые *in vitro* ДК, характеризуются признаками задержки созревания, что проявляется снижением доли CD83⁺ зрелых и CD25⁺ активированных клеток, тогда как у беременных с гиперандрогенией ДК фенотипически схожи с таковыми в группе небеременных женщин. При этом если сывороточные факторы женщин с физиологической беременностью ингибируют созревание ДК, то сыворотки крови от беременных с ГА, а также непосредственно ДГЭАС оказывают стимулирующий эффект на созревание/активацию ДК.

Чтобы оценить, каким образом задержка созревания/активации ДК при беременности сказывается на их функциональной активности, на следующем этапе была исследована способность ДК стимулировать Т-клетки к продукции IFN γ и IL-4 в СКЛ. Как видно из данных таблицы 2, ДК небеременных женщин стимулировали 5-кратное увеличение числа CD3⁺IFN γ ⁺Т-клеток и практически не влияли на количество CD3⁺IL-4⁺ Т-клеток. Аналогичные данные были получены также при анализе продукции IFN γ и IL-4. Так, концентрация IFN γ в супернатантах СКЛ, стимулированных ДК, существенно превышала таковую в контрольных культурах

МНК. При этом ДК значимо не влияли на уровень продукции ИЛ-4.

По сравнению с группой небеременных женщин ДК беременных с физиологическим течением гестации не вызывали количественного прироста $CD3^+IFN\gamma^+$ Т-клеток и стимулировали более низкий уровень продукции $IFN\gamma$, однако индуцировали практически 3-кратное увеличение относительного количества $CD3^+IL-4^+$ Т-клеток и умеренное усиление продукции ИЛ-4 (ИВДК = $4,6 \pm 2,2$). ДК беременных с ГА активировали Т-клетки к внутриклеточной продукции и секреции $IFN\gamma$, хотя стимулирующий эффект был достоверно ниже по сравнению с ДК небеременных женщин. Одновременно с этим ДК сохраняли способность стимулировать Th2-ответ, в частности индуцировали увеличение доли $CD3^+IL-4^+$ Т-клеток и продукцию ИЛ-4.

Таким образом, если ДК небеременных женщин активировали Т-клетки к продукции Th1-цитокинов, то ДК женщин с физиологической беременностью стимулировали преимущественно Th2-ответ. В то же время при беременности, осложненной гиперандрогенией, ДК обладали способностью стимулировать как Th1-, так и Th2-ответ.

Чтобы убедиться, что выявленные изменения функциональной активности ДК у беременных с ГА обусловлены повышенным уровнем ДГЭАС, в отдельной серии экспериментов было исследовано непосредственное влияние данного гормона на Th1-стимулирующую активность ДК женщин с физиологической беременностью. Сравнение способности интактных и ДГЭАС-модифицированных ДК беременных ($n = 9$) активировать Т-клетки к продукции $IFN\gamma$ в СКЛ показало, что обработка ДК гормоном индуци-

ровала появление у них выраженной Th1-стимулирующей активности. Так, концентрация $IFN\gamma$ в культурах СКЛ, индуцированных ДГЭАС-модифицированными ДК более чем в 2 раза превышала таковую в культурах СКЛ, индуцированных интактными ДК (344 ± 160 против 144 ± 90 пкг/мл; $p_U < 0,05$). Полученные данные свидетельствуют о том, что ДГЭАС *in vitro* обладает выраженным влиянием на функциональную активность ДК женщин с нормальной беременностью, в частности, переводит их из разряда Th2-стимулирующих в категорию ДК, активирующих Th1-ответ.

Помимо изменения Th1/Th2 баланса, важную роль в поддержании толерантности может играть элиминация аллоантиген-распознающих Т-клеток и активированных НК-клеток. Из данной литературы известно, что ДК могут оказывать разнонаправленное действие на НК-клетки. В этой связи представлялось интересным проанализировать особенности взаимодействия ДК беременных с активированными $CD56^+CD16^+$ НК-клетками. Со-культивирование МНК доноров с ДК женщин с физиологической беременностью (в соотношении 3:1 в течение 24 ч) сопровождалось достоверным снижением относительного количества $CD56^+CD16^+$ НК-клеток (табл. 3). Причем ДК всех 10 обследованных беременных обладали ингибирующим эффектом в отношении $CD56^+CD16^+$ клеток. Анализ клеточного цикла показал, что инкубация МНК с ДК беременных сопровождается достоверным увеличением уровня апоптоза $CD56^+CD16^+$ клеток (с $4,1 \pm 0,7$ до $21,1 \pm 5,0\%$; $p_U < 0,05$). Таким образом, уменьшение количества активированных НК в присутствии ДК беременных может быть обусловлено гибелью $CD56^+CD16^+$ клеток вследствие апоптоза.

ТАБЛИЦА 2. Th1/Th2-СТИМУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ДК В СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЕ ЛИМФОЦИТОВ

Показатель	Условия культивирования	Внутриклеточная экспрессия и продукция $IFN\gamma$ и ИЛ-4					
		небеременные женщины, $n = 10$		беременные (ГА-), $n = 8$		беременные (ГА+), $n = 8$	
		значение	ИВДК	значение	ИВДК	значение	ИВДК
$CD3^+ IFN\gamma^+$, %	0	$1,5 \pm 0,2$	$5,2 \pm 0,9$	$1,8 \pm 0,5$	$1,1 \pm 0,2^{**}$	$1,8 \pm 0,5$	$2,0 \pm 0,4^{***}$
	+ДК	$5,9 \pm 0,6$		$1,5 \pm 0,27^{**}$		$2,5 \pm 0,3^{***}$	
$CD3^+ IL-4^+$, %	0	$1,7 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,4$	$3,5 \pm 0,4^{**}$	$3,3 \pm 0,5$	$2,4 \pm 0,5^*$
	+ДК	$2,1 \pm 0,4$		$8,6 \pm 1,0^{**}$		$7,4 \pm 1,0^{**}$	
$IFN\gamma$, пкг/мл	0	$18,2 \pm 5,7$	$22,2 \pm 3,1$	$16,5 \pm 2,8$	$3,4 \pm 0,9^{**}$	$16 \pm 3,0$	$13,5 \pm 3,1^{**}$
	+ДК	353 ± 41		$63,4 \pm 27,8^{**}$		$218 \pm 69^{**}$	
ИЛ-4, пкг/мл	0	$1,0 \pm 0,08$	$2,0 \pm 1,0$	$1,0 \pm 0,09$	$4,6 \pm 2,2$	$1,0 \pm 0,12$	$5,4 \pm 2,0^*$
	+ДК	$2,0 \pm 1,0$		$4,6 \pm 2,2$		$5,4 \pm 2,0^*$	

Примечание. Данные представлены в виде $M \pm S.E.$ ИВДК – индекс влияния ДК в СКЛ (отношение уровня продукции или относительного содержания клеток с внутриклеточным содержанием цитокина в культурах МНК в присутствии ДК к аналогичному показателю в отсутствии ДК).

* – $p_U < 0,05$, ** – $p_U < 0,01$ – достоверность различий по сравнению с группой небеременных женщин; # – $p_U < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с группой женщин с физиологической беременностью (U – критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

В то же время ДК, модифицированные ДГЭАС, усиливали апоптоз активированных НК-клеток в значительно меньшей степени (до $7,7 \pm 1,1\%$). Видно, что количество $CD56^+CD16^+$ клеток в культурах с ДГЭАС-модифицированными ДК было достоверно выше, а уровень апоптоза – значимо ниже, чем в присутствии интактных ДК.

Следует отметить, что со-культивирование МНК доноров с ДК небеременных женщин также сопровождалось усилением апоптоза $CD56^+CD16^+$ клеток (с $4,6 \pm 0,1\%$ до $13,7 \pm 2,6\%$; $p_U < 0,01$; $n = 14$), а также достоверным уменьшением относительного количества $CD56^+CD16^+$ клеток (с $9,6 \pm 0,5\%$ до $7,5 \pm 1,1\%$; $p_U < 0,05$; $n = 14$). Однако ингибирующий эффект ДК в отношении активированных НК-клеток проявлялся ни во всех случаях, и у 4 из 14 обследованных женщин ДК не влияли на количество $CD56^+CD16^+$ клеток.

Обсуждение

Дендритные клетки представляют уникальную популяцию антигенпрезентирующих клеток, которые способны как стимулировать, так и ингибировать иммунный ответ, а также индуцировать состояние толерантности. Присутствуя в децидуальной оболочке, где происходит непосредственный контакт клеток плода и матери, ДК являются кандидатом на роль регуляторов направленности и выраженности иммунного ответа [13]. Экспериментальные исследования на мышах показали, что при беременности количество ДК в децидуальной оболочке возрастает, причем максимальное увеличение ДК наблюдается в ранние сроки беременности [23]. Установлено, что в популяции децидуальных ДК преобладают миелоидные $CD11c^+$ ДК, которые характеризуются сниженной продукцией IL-12 и повышенной продукцией IL-10 [8]. Этими же авторами было показано, что количество миелоидных ДК на ранней стадии беременности возрастает не только в децидуальной оболочке, но и в периферической крови.

Исследования у человека также указывают на наличие в децидуальной оболочке незрелых миелоидных ДК, которые способны индуцировать толерантность [11] или активировать

Th2-ответ [16], обеспечивая успешное развитие беременности. Недавние исследования Ван Y.-L. с соавт., выявили в плаценте беременных (I триместр) как минимум 3 субпопуляции ДК. Количество миелоидных ДК 1-го типа ($BDC4-1^+CD19-CD14^-$) среди МНК плаценты было таким же, как в периферической крови; количество миелоидных клеток 2-го типа ($BDC4-3^+CD14^-$) существенно превышало таковое в периферической крови; а количество плазматоидных ДК ($BDC4-2^+CD123^+$) было снижено. Обе субпопуляции миелоидных клеток характеризовались низкой экспрессией костимуляторных молекул (CD86, CD80), что свидетельствовало о состоянии их незрелости. Причем в обеих субпопуляциях обнаруживалась экспрессия молекулы ILT-3 (Immunoglobulin-like transcript 3), участвующей в индукции толерантности [6]. С другой стороны, имеются данные о присутствии в децидуальной оболочке зрелых $CD83^+$ ДК, обладающих иммуностимуляторной активностью [4, 14].

Данные, характеризующие при беременности ДК периферической крови, очень немногочисленны. Так, исследования лимфоидных и миелоидных ДК в крови беременных показали, что максимально количество ДК выявляется в первом и третьем триместрах, причем соотношение миелоидных и лимфоидных ДК у женщин с преэклампсией существенно возрастало [9]. На основании этого авторы предположили, что ДК играют важную роль в регуляции иммунной системы при беременности, обеспечивая сдвиг Th1→Th2 цитокинового баланса. В свою очередь, увеличение доли миелоидных и снижение лимфоидных ДК на фоне преэклампсии может приводить к активации Th1 ответа. Кроме того, совсем недавно Vachy V. с соавт. опубликовали данные, характеризующие свойства ДК беременных, индуцированных *in vitro* в присутствии GM-CSF и IL-4. ДК были фенотипически менее зрелыми и отличались сниженной продукцией IL-12 и повышенной – IL-10 [5]. Однако способность ДК активировать Th1- и Th2-ответ в проведенных работах не изучалась.

ТАБЛИЦА 3. ВЛИЯНИЕ ИНТАКТНЫХ И ДГЭАС-МОДИФИЦИРОВАННЫХ ДК ЖЕНЩИН С ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕРЕМЕННОСТЬЮ НА КОЛИЧЕСТВО И АПОПТОЗ АКТИВИРОВАННЫХ $CD56^+CD16^+$ НК-КЛЕТОК

Показатель	МНКО	МНК+ДКИНТ	МНК+ДКДГЭАС
$CD56^+CD16^+$, %	$10,6 \pm 0,8$	$6,6 \pm 0,5^*$	$8,2 \pm 0,5^{**}$
Апоптоз $CD56^+CD16^+$, %	$4,1 \pm 0,7$	$21,1 \pm 5,0^*$	$7,7 \pm 1,1^{**}$

Примечание. Данные представлены в виде $M \pm S.E.$ ($n = 10$). Относительное содержание и уровень апоптоза $CD56^+CD16^+$ НК-клеток определяли в культурах МНК здоровых доноров, инкубированных 24 ч в отсутствие (МНКО) и в присутствии интактных (МНК+ДКИНТ) и ДГЭАС-модифицированных (МНК+ДКДГЭАС) ДК женщин с физиологической беременностью в соотношении 3:1.

* – $p_U < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с МНКО, ** – $p_U < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с МНК+ДКИНТ (U – критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

В настоящей работе впервые исследовались фенотипические и функциональные характеристики ДК, полученных из моноцитов периферической крови беременных. Для генерации ДК использовался протокол, в котором ИЛ-4 был замещен на $IFN\alpha$. Данный протокол позволяет генерировать ДК промежуточной степени зрелости, которые, по данным литературы, обладают также цитотоксической активностью [17]. Для сравнения анализировались свойства ДК, полученных от небеременных женщин фертильного возраста, а также беременных с надпочечниковой гиперандрогенией, которые входят в группу риска по невынашиванию беременности.

Проведенные исследования показали, что при физиологической беременности ДК являются менее зрелыми, о чем свидетельствует снижение относительного содержания $CD83^+$ и $CD25^+$ клеток. В то же время у женщин с гиперандрогенией признаков задержки созревания/активации ДК не наблюдалось, и они не отличались от таковых в контрольной группе небеременных женщин. Поскольку сыворотки крови женщин с физиологической беременностью подавляли созревание ДК доноров, а сыворотки беременных с ГА не оказывали такого эффекта и, более того, стимулировали накопление ДК с признаками активации ($CD25^+$), можно полагать, что содержащиеся в сыворотке гуморальные факторы (цитокнины, гормоны) способны оказывать значимое регулирующее влияние на свойства ДК. Действительно, недавно в исследованиях *in vitro* было показано, что половые гормоны (сывороточный уровень которых повышен у беременных) влияют на созревание и функциональную активность ДК [20]. Модулирующий эффект сывороток женщин с ГА связан, очевидно, с повышенной концентрацией гормона коры надпочечников – ДГЭАС. Действительно, как показали наши исследования, ДГЭАС при добавлении в культуры ДК женщин с физиологической беременностью обладал выраженным стимулирующим эффектом на созревание ДК.

Выявленные нами фенотипические изменения ДК при беременности ассоциировались с изменением их функциональных свойств. Так, в отличие от небеременных женщин, ДК которых активировали Т-клетки 1 типа, ДК беременных стимулировали преимущественно ИЛ-4⁺ Т-клетки. При этом наличие у беременных ГА принципиально меняло функциональную активность ДК, и наряду с Th2-стимуляторной активностью они вновь приобретали способность активировать Т-клетки к продукции Th1-цитоклинов. Полученные нами данные впервые свидетельствуют о преобладании Th2-стимулирующей активности $IFN\alpha$ -индуцированных ДК, полученных из периферической крови здоровых беременных. Кроме того, нами впервые показано изменение функ-

циональной активности указанного типа ДК при беременности, осложненной надпочечниковой гиперандрогенией. Причем, анализ непосредственного влияния ДГЭАС на Th1-стимуляторную активность ДК беременных является веским аргументом в пользу того, что усиление способности ДК активировать Т-клетки к продукции $IFN\gamma$ обусловлено повышенным уровнем гормона.

Наконец, еще одним интересным аспектом работы является анализ взаимодействия ДК и НК-клеток. Согласно данным литературы, зрелые ДК способны стимулировать пролиферацию НК-клеток [10]. С другой стороны, промежуточные по степени зрелости ДК, генерируемые в присутствии IFN , обладают цитотоксической активностью, могут лизировать опухолевые клетки, а также активированные Т-лимфоциты [22]. Проведенные нами исследования впервые показали, что ДК женщин с физиологической беременностью способны индуцировать апоптоз активированных $CD56^+CD16^+$ НК-клеток, что сопровождается снижением их относительного количества. Этот эффект в наибольшей степени выражен для ДК беременных, однако проявляется также в присутствии ДК небеременных женщин. Интересно, что ДГЭАС частично нивелировал апоптогенный эффект ДК беременных в отношении НК-клеток. Следовательно, можно полагать, что созревание $IFN\alpha$ -индуцированных ДК под действием гормона сопряжено с ослаблением их цитотоксической активности. Кроме того, полученные данные могут отчасти объяснить выявленное нами повышение количества активированных НК-клеток у беременных с надпочечниковой гиперандрогенией [3].

В целом результаты нашей работы свидетельствуют, что ДК, генерируемые из периферической крови женщин с физиологической беременностью, характеризуются задержкой созревания, наличием доминирующей Th2-стимулирующей активности и ингибирующим эффектом в отношении активированных НК-клеток, что способствует подавлению иммунных реакций отторжения плода. При надпочечниковой гиперандрогении наблюдается усиление Th1-стимулирующей активности ДК и ослабление их способности подавлять активированные НК-клетки, что, видимо, является одной из причин нарушения «гестационной» иммуносупрессии и обуславливает риск невынашивания беременности у женщин с указанной патологией. Установленные факты раскрывают новый аспект иммуноэндокринных взаимодействий и их значение при физиологической и осложненной беременности.

Благодарности

Работа поддержана грантами РФФИ № 07-04-00967 и № 08-04-00700.

Список литературы

1. Селедцова Н.В., Хонина Н.А., Дударева А.В., Тихонова М.А., Останин А.А., Пасман Н.М., Черных Е.Р. Нарушение иммунорегуляторных механизмов у беременных с гиперандрогенией // Бюллетень СО РАМН. – 2006. – Т. 119, № 1. – С. 35-40.
2. Селедцова Н.В., Хонина Н.А., Тихонова М.А., Останин А.А., Пасман Н.М., Черных Е.Р. Влияние дегидроэпиандростерона сульфата на фенотип и функции дендритных клеток *in vitro* // Мед. иммунология. – 2007. – Т. 9, № 6. – С. 589-596.
3. Селедцова Н.В., Хонина Н.А., Дударева А.В., Тихонова М.А., Останин А.А., Пасман Н.М., Черных Е.Р. Характеристика естественных цитотоксических клеток и регуляторных Т-лимфоцитов у беременных с надпочечниковой гиперандрогенией // Иммунология. – 2007. – Т. 28, № 3. – С. 151-155.
4. Askelund K., Liddell H.S., Zanderigo A.M. CD83(+) dendritic cells in the decidua of women with recurrent miscarriage and normal pregnancy // Placenta. – 2004. – Vol. 25. – P. 140-145.
5. Vachy V., Williams D.J., Ibrahim M.A. Altered dendritic cell function in normal pregnancy // J. Reprod. Immunol. – 2008. – Vol. 78, N 1. – P. 11-21.
6. Ban Y.-L., Kong B.-H., Qu X., Yang Q.-F., Ma Y.-Y. BDCA-1+, BDCA-2+ and BDCA-3+ dendritic cells in early human pregnancy deciduas // Clin. Exp. Immunol. – 2008. – Vol. 151. – P. 399-406.
7. Blois S.M., Kammerer U., Soto C.A., Tometten M.C., Shaikly V., Barrientos G., Jurd R., Rukavina D., Thomson A.W., Klapp B.F., Fernandez N., Arck P.C. Dendritic cells: key to fetal tolerance? // Biol. Reprod. – 2007. – Vol. 77. – P. 590-598.
8. Blois S.M., Soto C.A., Tometten M.C., Klapp B.F., Margni R.A., Arck P.C. Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy // Biol. Reprod. – 2004. – Vol. 70, N 4. – P. 1018-1023.
9. Darmochwal-Kolarz D., Rolinski J., Tabarkiewicz J., Leszczynska-Gorzela B., Buczkowski J., Wojas K., Oleszczuk J. Myeloid and lymphoid dendritic cells in normal pregnancy and pre-eclampsia // Clin Exp Immunol. – 2003. – Vol. 132. – P. 339-344.
10. Ferlazzo G., Pack M., Thomas D., Paludan C., Schmid D., Strowig T., Bougras G., Muller W.A., Moretta L., Munz C. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs // Proc. Natl. Acad. Sci US. – 2004. – Vol. 101, N 47. – P. 16606-16611.
11. Gardner L., Moffett A. Dendritic cells in the human deciduas // Biol. Reprod. – 2003. – Vol. 69. – P. 1438-1446.
12. Guerin L.R., Prins J.R., Robertson S.A. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment // Human Reproduction Update. – 2009. – Vol. 1, N 1. – P. 1-19.
13. Kammerer U., Kruse A., Barrientos G., Arck P.C., Blois S.M. Role of dendritic cells in the regulation of maternal immune responses to the fetus during mammalian gestation // Immunol. Invest. – 2008. – Vol. 37, N 5. – P. 499-533.
14. Kammerer U., Schoppet M., McLellan A.D., Kapp M., Huppertz H.-I., Kaampgen E., Dietl J. Human decidua contains potent immunostimulatory CD83+ dendritic cells // Am. J. Pathol. – 2000. – Vol. 157. – P. 159-169.
15. Liang J., Sun L., Wang Q. Progesterone regulates mouse dendritic cells differentiation and maturation // Int. Immunopharmacol. – 2006. – Vol. 6. – P. 350-355.
16. Miyazaki S., Tsuda H., Sakai M. Predominance of Th2-promoting dendritic cells in early human pregnancy deciduas // J. Leukoc. Biol. – 2003. – Vol. 74. – P. 514-522.
17. Papewalis C., Jacobs B., Wuttke M., Ullrich E., Baehring T., Fenk R., Willenberg H.S., Schinner S., Cohnen M., Seissler J., Zacharowski K., Scherbaum W.A., Schott M. IFN α skews monocytes into CD56+ expressing dendritic cells with potent functional activities *in vitro* and *in vivo* // J. Immunol. – 2008. – Vol. 180, N 3. – P. 1462-1470.
18. Powell J.M., Sonnenfeld G. The effects of Dehydroepiandrosterone (DHEA) on *in vitro* spleen cell proliferation and cytokine production // J. Interferon & Cytokine Research. – 2006. – Vol. 26, N 1. – P. 34-39.
19. Seavey M.M., Mosmann T.R. Immunoregulation of fetal and anti-partental immune response // Immunol. Res. – 2008. – Vol. 40. – P. 97-113.
20. Segerer S.E., Meller N., van den Brandt J., Kapp M., Dietl J., Reichardt H.M., Rieger L., Kammerer U. Modulation of maturation and function of dendritic cells by female sex steroid hormones // Amer. J. Reprod. Immunol. – 2008. – Vol. 60, N 1. – P. 86-96.
21. Steinman R.M., Hawiger D., Nussenzweig M.C. Tolerogenic dendritic cells // Ann. Rev. Immunol. – 2003. – Vol. 21. – P. 685-711.
22. Wesa A.K., Storkus W.J. Killer dendritic cells: mechanisms of action and therapeutic implications for cancer // Cell Death & Differentiation. – 2008. – Vol. 15. – P. 51-57.
23. Zarnani A.-H., Moazzeni S.-M., Shokri F., Salehnia M., Jeddi-Tehrani M. Kinetics of murine decidual dendritic cells // Reproduction. – 2007. – Vol. 133. – P. 275-283.

поступила в редакцию 07.04.2009
отправлена на доработку 20.04.2009
принята к печати 18.06.2009