БИОХИМИЯ, 2019, том 84, вып. 10, с. 1460 – 1472

УДК 612.01.8;612.017.1;611.018.53

РОЛЬ КАСПАЗ В ПРОЯВЛЕНИИ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ КЛЕТОК NK-92 В РАЗЛИЧНЫХ МОДЕЛЯХ ИХ СОКУЛЬТИВИРОВАНИЯ С КЛЕТКАМИ ТРОФОБЛАСТА*

© 2019 Ю.П. Милютина, В.А. Михайлова, К.М. Пятыгина, Е.С. Демидова, Д.А. Малыгина, Т.Е. Тертычная, А.В. Арутюнян, Д.И. Соколов, С.А. Сельков**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта» Северо-Западного отделения РАМН, 199034 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: milyutina1010@mail.ru

Поступила в редакцию 17.04.2019
После доработки 18.06.2019
Принята к публикации 22.06.2019

Изучение особенностей взаимодействия естественных киллеров с клетками трофобласта и выявление условий, при которых NK-клетки способны реализовывать свою цитотоксическую функцию, имеет важное фундаментальное и прикладное значение для понимания их роли в развитии патологических процессов и осложнений в период беременности. В данной работе продемонстрированы особенности изменения содержания и активации каспаз в клетках трофобласта линии Jeg-3 в различных моделях их сокультивирования с клетками линии NK-92 и показана необходимость непосредственного контакта между клетками данных популяций для активации каспазы-8 и каспазы-3 в клетках трофобласта. В результате взаимодействия в клетках линии Jeg-3 обнаруживается цитотоксический белок гранзим B, что сопровождается снижением его количества в клетках линии NK-92. Дистантное сокультивирование клеток линий NK-92 и Jeg-3 не приводит к активации инициаторной и эффекторной каспаз в клетках линии Jeg-3, характерной для картины развития апоптоза. При этом снижение исследуемых прокаспаз в клетках трофобласта может быть обусловлено реализацией их альтернативных неапоптических функций.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: каспазы, гранзим B, трофобласт, естественные киллеры, апоптоз.

DOI: 10.1134/S0320972519100087

При физиологически протекающей беременности и формировании плаценты процессу апоптоза отводят одну из ключевых ролей. Ингибирование или гиперактивация апоптоза в результате нарушения механизмов его регуляции может явиться причиной развития акушерских осложнений и основой патогенеза различных заболеваний плода [1]. Изучение процесса апоптоза в плаценте до настоящего времени вызывает ряд трудностей, что связано с проблемой получения первичного биологического материала и оценки вклада отдельных популяций клеток в данный процесс [2, 3]. Это определяет актуальность исследований, связанных с использованием различных моделей взаимодействия клеток трофобласта с клетками, принимающими активное участие в процессах формирования плаценты, в частности, клетками иммунной системы, определяющими феномен иммунологической толерантности матери к отцовским антигенам, которые экспрессируются клетками трофобласта [4]. Поскольку в число функций NK-клеток входит уничтожение аллогенных клеток, вопросы, связанные с взаимодействием клеток трофобласта и NK-клеток, до настоящего времени являются объектом пристального внимания. В мировой литературе накопилось достаточно большое количество сведений о децидуальных NK-клетках (dNK), вопрос о происхождении которых до сих пор остается дискуссионным [5].

Установлено, что dNK содержат в большем количестве цитотоксические белки, такие как порообразующий белок перфорин, специфические сериновые протеазы, в частности гранзимы A и B, а также гранулизин [6–9]. Показано, что dNK-клетки продуцируют факторы, участвующие в инвазии трофобласта и в ангиогенезе. С другой стороны, они могут ограничивать глубину инвазии трофобласта, проявляя

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», BM19-121, 16.09.2019.

** Адресат для корреспонденции.

цитотоксичность, в том числе, благодаря секреции фактора-α некроза опухолей (TNF-α) и интерферона-γ (IFN-γ) [10, 11]. Одной из основных причин изменения цитотоксичности NK-клеток в плаценте в настоящее время считается ингибирующее действие трофобласта. Снижение цитотоксичности NK-клеток до уровня, при котором они не вызывают цитолиз трофобластов, является необходимым условием для их нормальной инвазии. Однако результаты исследований, касающихся изучения изменения цитотоксической активности NK-клеток при взаимодействии с различными клетками в области маточно-плацентарного контакта, противоречивы [6, 12–14].

В настоящее время существует несколько методов оценки цитотоксической активности NK-клеток. Один из них – это исследование процесса активации внутриклеточных цистеиновых протеаз (каспаз) [15]. Таким образом, с учетом ключевой роли каспаз в реализации апоптотической гибели клеток, а также их возможного участия в других биологических процессах, таких как клеточная дифференцировка [16], интересным представляется оценка характера активации каспаз в клетках трофобласта после их взаимодействия с NK-клетками в системе *in vitro*.

Целью данной работы является исследование содержания цитотоксических белков в клетках линии NK-92, а также анализ процесса активации инициаторной каспазы-8 и эффекторной каспазы-3 в клетках трофобласта линии Jeg-3 в различных моделях их совместного культивирования.

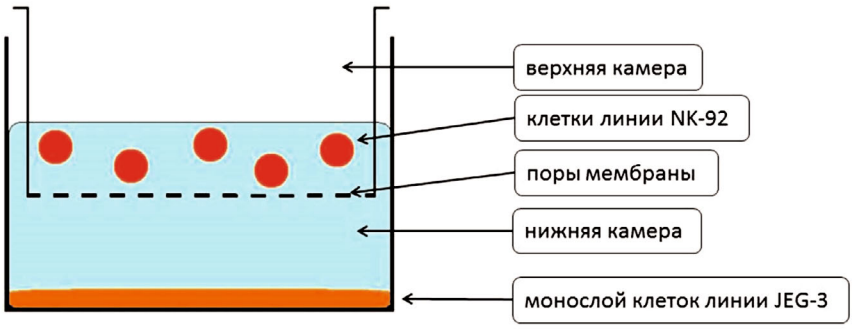
МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клетки. Использовали клетки линии Jeg-3 («ATCC», США), воспроизводящие морфологические, фенотипические и функциональные характеристики инвазивного трофобласта первого триместра беременности [17, 18]. Клетки культивировали в полной ростовой среде DMEM с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, 0,5 мМ L-глутамина, 1% незаменимых аминокислот 1 мл MEM, 1 мМ пирувата натрия («Sigma-Aldrich Chem. Co.», США). Для дезинтеграции монослоя клеток использовали раствор версена и трипсина («Biolot», Россия) (1 : 1). Клетки линии NK-92 («ATCC») воспроизводят базовые фенотипические и функциональные характеристики активированных натуральных киллеров (NK-клеток) [19, 20]. Клетки культивировали в минимальной среде Игла α-модификации (α-modification Minimum Essential Medium, α-MEME), содержащей 12,5%-ную инактивированную ЭТС, 12,5%-ную инактивированную лошадиную сыворотку, 0,02 мМ фолиевой кислоты, 0,2 мМ мио-инозитола, 2 мМ L-глутамина, 100 мкг/мл стрептомицина, 100 ед/мл пенициллина, 10 мМ HEPES, 0,1 мМ 2-меркаптоэтанола («Sigma-Aldrich», США), 500 МЕ/мл рекомбинантного IL-2 (препарат «Ронколейкин», ООО «Биотех», Россия). Клетки линий NK-92 Jeg-3 культивировали в инкубаторе во влажной атмосфере при 37 °C, 5%-ной CO_2. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью раствора трипанового синего, она составляла не менее 96%.

Дистантное сокультивирование NK-клеток и клеток трофобласта. Для исключения прямого контакта между клетками линии NK-92 и клетками линии Jeg-3 использовали экспериментальную модель, получившую в литературе название системы *transwell* [21]. Использовали 6-луночный планшет и вставки с поликарбонатной мембраной (диаметр поры – 1 мкм, площадь мембраны – 4,8 см^2) («BD», США). Эта модель обеспечивает межклеточное взаимодействие только за счет растворимых факторов. Клетки линии Jeg-3 инкубировали 24 ч до образования конфлюэнтного монослоя в нижней камере (лунка 6-луночного планшета) в концентрации $1,2 \times 10^6$ клеток на лунку в 8 мл среды DMEM, 10%-ной ЭТС. На второй день удаляли 4 мл среды из каждой лунки и помещали в них вставку с поликарбонатной мембраной, в которую вносили $1,8 \times 10^6$ клеток линии NK-92 в 4 мл среды α-MEME, 12,5%-ной ЭТС (рис.1, *а*). Клетки в системе *transwell* инкубировали 24 ч. Эксперименты проводили во влажной атмосфере, 37 °C, 5%-ной CO_2. В качестве контроля использовали интактные клетки линий NK-92 и Jeg-3, проинкубированные раздельно.

Контактное сокультивирование NK-клеток и клеток трофобласта. Клетки линии Jeg-3 культивировали во флаконах площадью 75 см^2 («BD») в полной ростовой среде DMEM в концентрации 2×10^6 клеток/мл в течение 24 ч для достижения 50%-ного субконфлюэнтного монослоя. Затем клетки линии Jeg-3 окрашивали витальным красителем CFSE (сукцинимидиловый эфир диацетата 5(6)карбоксифлуоресцеина) в соответствии с указаниями производителя («Sigma», США). Далее во флакон с окрашенными CFSE клетками линии Jeg-3 вносили клетки линии NK-92 в концентрации 3×10^6 клеток/мл и инкубировали 24 ч во влажной атмосфере, 37 °C, 5%-ной CO_2. После инкубации клетки собирали из лунок, обрабатывая их раствором версена. В качестве контроля использовали клетки линий NK-92 и

а



б

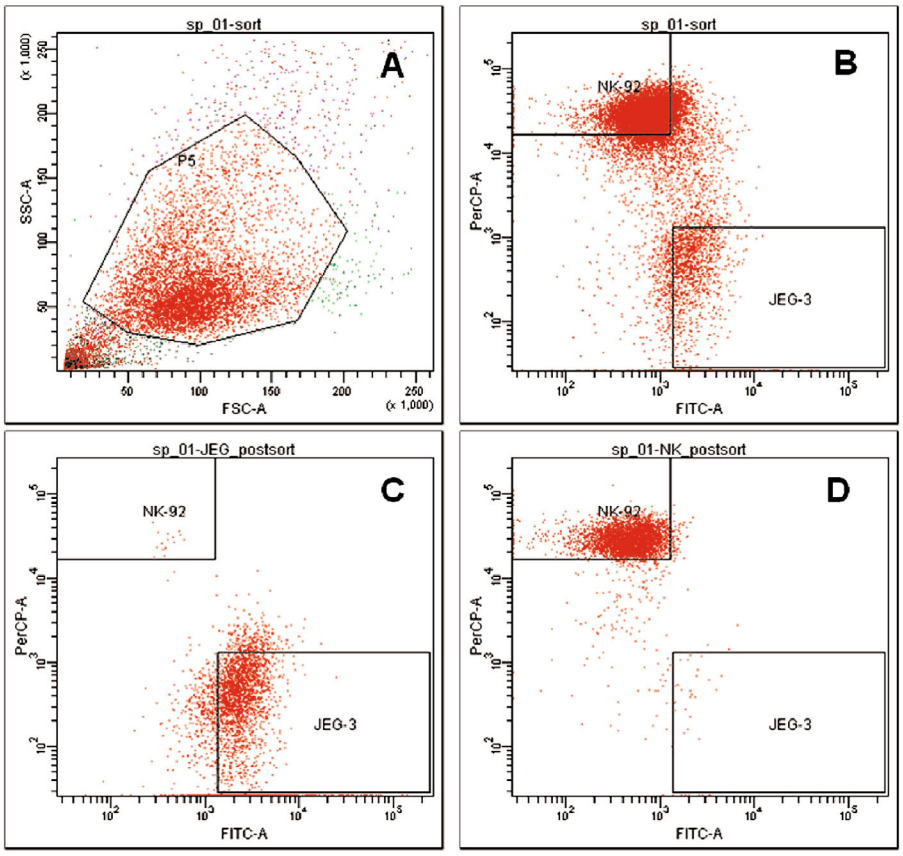


Рис. 1. Стратегия проведения экспериментов по дистантному и контактному сокультивированию клеток линии Jeg-3 и клеток линии NK-92. *а* – Схема эксперимента дистантного сокультивирования клеток линий Jeg-3 и NK-92 в 6-луночном планшете; *б* – стратегия гейтирования клеток линий NK-92 и Jeg-3, использованная при их сортировке после контактного сокультивирования (A –*presort* клеток линии NK-92, обработанных антителами к CD45(PerCp) и клеток линии Jeg-3, меченных красителем CFSE(FITC); график распределения в координатах FSC-SSC, гейт P5 содержит клетки линии NK-92 и Jeg-3. B – график распределения в координатах PerCP -FITC. Квадрант NK-92 содержит клетки линии NK-92, меченные CD45(PerCp). Квадрант Jeg-3 содержит клетки линии Jeg-3, меченные CFSE(FITC). C – *postsort* клеток линии Jeg-3 в координатах PerCP–FITC. D – *postsort* клеток линии NK-92 в координатах PerCP–FITC).
С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

Jeg-3, которые культивировали раздельно в аналогичных условиях. Эксперименты по контактному и дистантному сокультивированию проводили четырежды, в каждом исследовании сокультивированные клетки и контрольные интактные клетки инкубировали в четырёх повторах.

Сортировка клеток. Разделение клеток линии NK-92 и клеток линии Jeg-3 после их контактного сокультивирования проводили с помощью проточного цитофлуориметра-сортировщика клеток FacsAriaIII («BD»). Полученную после контактного сокультивирования суспензию клеток в растворе версена трижды отмывали теплой средой DMEM, центрифугируя при 200 g. Затем суспензию клеток обрабатывали антителами к CD45 (PerCP) в соответствии с указаниями производителя («BD»). При контроле неспецифического связывания использовали антитела для изотопического контроля в соответствии с протоколами производителя («BD»). Для разделения клеток использовали протокол Purity (рис. 1, *б*) и сопло диаметром 85 мкм. Популяцию клеток линии NK-92 выделяли по фенотипу $CD45^+$(PerCp), клетки линии Jeg-3 – по маркировке CFSE (FITC). Разделение клеток проводили по прямому и боковому свечению, по каналам FITC и PerCP. На основании измерения пробы, обработанной изотипическим контролем, устанавливали границы флуоресценции. На основании измерения пробы, обработанной антителами, выделяли целевые клетки для сортировки (*presort*). Для подтверждения качества разделения клеток различных популяций проводили процедуру, называемую *postsort*, согласно протоколу производителя. Во всех случаях чистота выделения клеток линии NK-92 и клеток линии Jeg-3 составила не менее 99,0 ± 1,0%. Долю жизнеспособных клеток после выделения на сортировщике оценивали с помощью обработки клеток раствором 7ААД («Biolegend», США), она составила 91,6 ± 2,9%.

Иммуноблоттинг. Клетки, полученные после экспериментов, промывали три раза охлажденным фосфатным буфером (0,01M PBS, pH 7,4) и лизировали в буфере RIPA (50 мМ, Tris-HCl, pH 8,1, 1%-ный Triton X-100, 0,1%-ный SDS, 0,5%-ный дезоксихолат натрия, 1 мМ ЭДТА, 150 мМ, NaCl), содержащем коктейль ингибиторов протеаз («Roche», Швейцария). Пробы центрифугировали 10 мин при 16 000 g для удаления клеточного дебриса. Концентрацию общего белка в пробах оценивали по методу Бредфорда [22]. Образцы клеточных лизатов разделяли в 10%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) по Лэммли и переносили на PVDF-мембрану. Содержание прокаспаз и активных каспаз выявляли с помощью специфичных первичных антител к каспазе-8 (Caspase-8 (1C12) mouse Ab 1:1000, «Cell Signaling», США), к каспазе-3 (Caspase-3 rabbit Ab, 1 : 1000, «Cell Signaling»). Содержание белков, входящих в состав литических гранул, анализировали с помощью моноклональных антител против гранзима B (anti-Granzyme B, mouse Ab, 1 : 1000, «Biolegend») или перфорина (Anti-Human Perforin, mouse Ab, 1 : 1000, «Bioscience Inc.», CA). После инкубации с HRP-конъюгированными козьими антителами против кролика или мыши (1 : 1000, «BioRad») сигналы регистрировали с помощью усиленной хемилюминесценции («ECL GE», Швеция). Полученные данные были нормализованы по β-актину (beta-Actin, Rabbit Ab, «Cell Signaling») либо по глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназе (GAPDH (14C10) Rabbit Ab, 1 : 1000, «Cell Signaling»). Активацию каспазы-3 оценивали как отношение обнаруженного активного фрагмента каспазы-3 (p17), полученного в результате расщепления, к эндогенному уровню неактивного профермента каспазы-3 (p35). Активацию каспазы-8 рассчитывали как отношение ее активного фрагмента (p18) к прокаспазе-8 (p57) и выражали в условных единицах.

Статистическую обработку проводили с помощью программы STATISTICA 10.0. Для сравнения исследованных показателей был использован непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни или *t*-тест для независимых выборок. Данные проверены на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка, однородность дисперсий оценивалась критерием Ливена. Переменные с нормальным распределением представлены как средние арифметические и стандартные отклонения (M ± sd). Когда нормальное распределение отсутствовало, использовали Медианы (25–75-ая перцентили).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данные, представленные на рис. 2, показывают, что после контактного сокультивирования данных популяций клеток, в лизатах клеток линии NK-92 снижено содержание гранзима B (n = 6). Уровень перфорина при этом не отличался от его уровня в интактных клетках линии NK-92. Не было выявлено различий в содержании гранзима B и перфорина между клетками линии NK-92 после их дистантного сокультивирования с клетками линии Jeg-3 и интактными клетками линии NK-92 (n = 6). Установлено, что в результате контактного сокультивирования клеток линий Jeg-3 и NK-92, цитотоксический белок гранзим B методом иммуноблоттинга об-

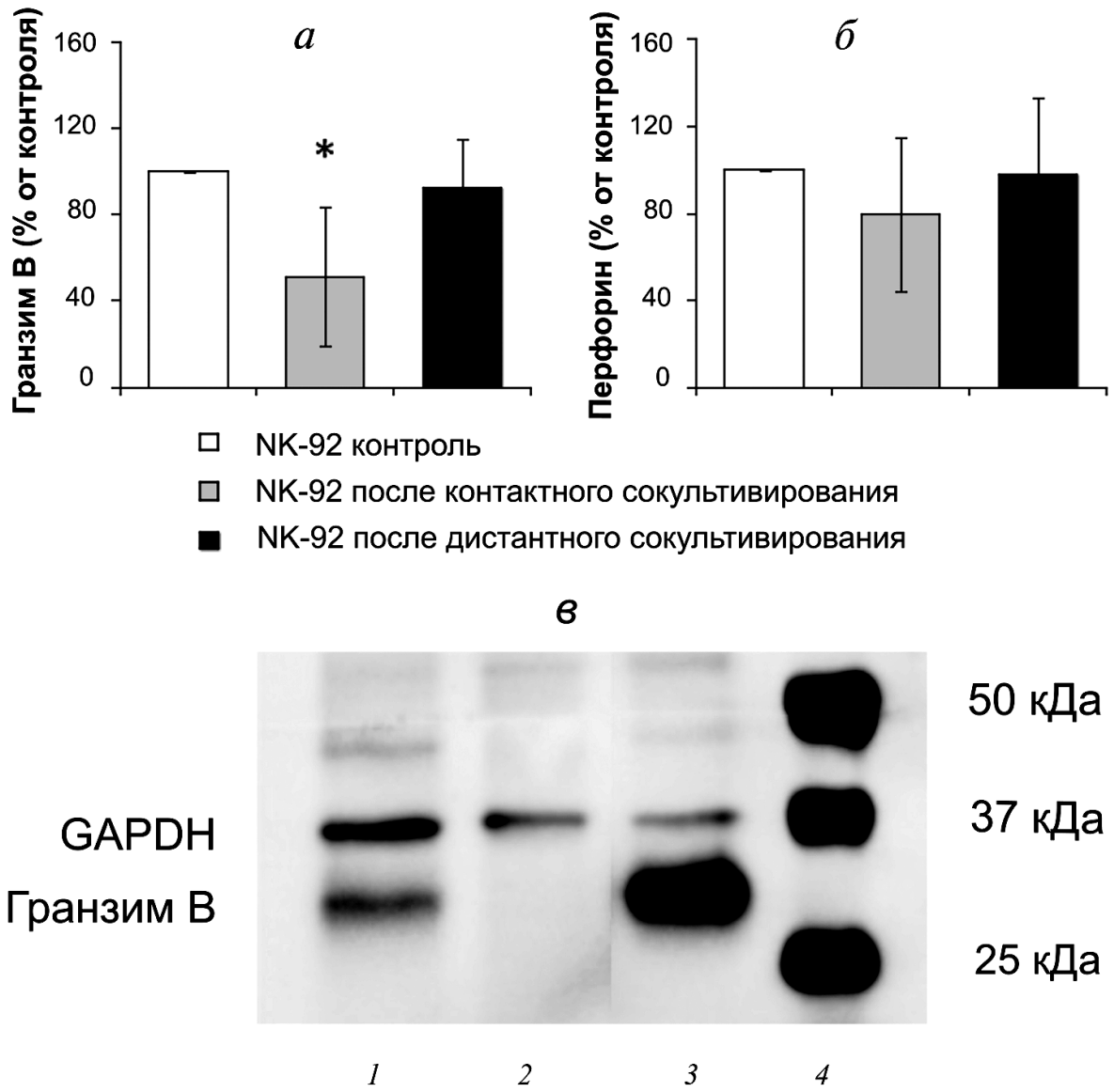


Рис. 2. Анализ содержания цитотоксических белков. *а* – Количественная оценка содержания гранзима B в лизатах клеток линии NK-92 после контактного и дистантного сокультивирования с клетками линии Jeg-3 относительно его содержания в интактных клетках линии NK-92 (контроль) (* $p < 0,05$ – отличие показателя в лизатах клеток линии NK-92 после совместного сокультивирования с клетками линии Jeg-3 от интактных клеток линии NK-92); *б* – количественная оценка содержания перфорина в лизатах клеток линии NK-92 после контактного и дистантного сокультивирования с клетками линии Jeg-3 относительно его содержания в интактных клетках линии NK-92 (контроль); *в* – иммуноблот, демонстрирующий содержание гранзима B в клетках линии Jeg-3 после контактного сокультивирования с клетками линии NK-92 (*1* – клетки линии Jeg-3 после совместного культивирования с клетками линии NK-92; *2* – клетки линии Jeg-3 культивированные спонтанно (интактные клетки); *3* – клетки линии NK-92 интактные; *4* – маркеры мол. массы)

наруживается в клетках линии Jeg-3. При этом после дистантного сокультивирования данных культур клеток гранзим B не выявлялся в клетках линии Jeg-3.

В клетках линии Jeg-3 после их дистантного сокультивирования с клетками линии NK-92 (опыт) количество прокаспазы-3 было ниже по сравнению с интактными (контроль) клетками линии Jeg-3 ($p < 0,05$). При этом, несмотря на отличие отношения фрагмента активной каспазы-3 к прокаспазе-3 в контрольных и опытных клетках линии Jeg-3, достоверных различий в уровне фрагмента активной каспазы-3 в лизатах клеток линии Jeg-3 после дистантного сокультивирования с клетками линии NK-92 и контрольными клетками линии Jeg-3 обнаружено не бы-

ло (n = 4) (рис. 3, *а*). Показано, что через 24 ч после дистантного сокультивирования с клетками линии NK-92 в клетках линии Jeg-3 содержание прокаспазы-8 снижено по сравнению с интактными клетками линии Jeg-3. Содержание фрагмента активной каспазы-8 в клетках линии Jeg-3 после дистантного сокультивирования с клетками линии NK-92 не отличалось от его содержания в контрольных клетках линии Jeg-3. Различий в активации каспазы-8, выраженной в отношении интенсивность фрагмента активной каспазы-8/интенсивность прокаспазы-8 в клетках линии Jeg-3 после дистантного сокультивирования с клетками линии NK-92 и интактными клетками линии Jeg-3, также не обнаруживалось (n = 4) (рис. 3, *б*).

В клетках линии Jeg-3 после контактного сокультивирования с клетками линии NK-92 была обнаружена повышенная активация в них каспазы-3 по сравнению с интактными клетками линии Jeg-3. Оценка значения показателя интенсивность фрагмента активной каспазы-3/интенсивность прокаспазы-3 выявила, что данная величина в клетках линии Jeg-3 после их контактного сокультивирования с клетками линии NK-92 превышала аналогичный показатель в интактных клетках Jeg-3 ($p < 0,05$) (n = 4). В отличие от дистантного сокультивирования изменение данного показателя связано с повышенным по сравнению с контрольными клетками линии Jeg-3 уровнем фрагмента активной каспазы-3 в клетках линии Jeg-3 после контактного

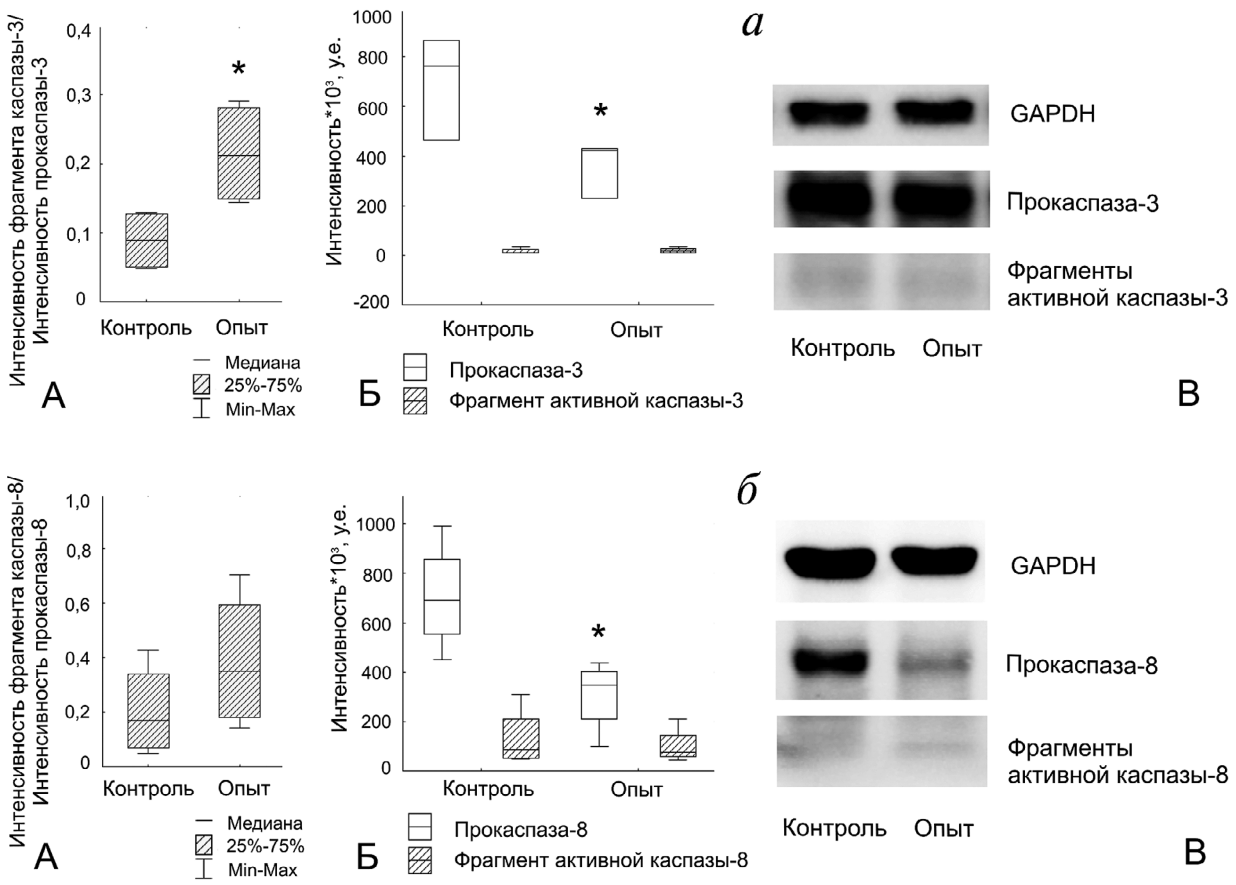


Рис. 3. Активация каспаз в клетках линии Jeg-3 после дистантного сокультивирования с клетками линии NK-92. *а* – Активация каспазы-3 в клетках линии Jeg-3. (А – отношение интенсивности фрагмента активной каспазы-3 к интенсивности прокаспазы-3 в интактных (контроль) клетках линии Jeg-3 и после дистантного сокультивирования с клетками линии NK-92 (опыт). Б – влияние клеток линии NK-92 на интенсивность фрагмента каспазы-3 и интенсивность прокаспазы-3 в клетках линии Jeg-3 при дистантном сокультивировании. В –результат иммуноблоттинга каспазы-3 клеток линии Jeg-3); *б* – активация каспазы-8 в клетках линии Jeg-3. (А – отношение интенсивности фрагмента активной каспазы-8 к интенсивности прокаспазы-8 в интактных (контроль) клетках линии Jeg-3 и после дистантного сокультивирования с клетками линии NK-92 (опыт). Б – влияние клеток линии NK-92 на интенсивность фрагмента каспазы-8 и интенсивность прокаспазы-8 в клетках линии Jeg-3 при дистантном сокультивировании. В – результат иммуноблоттинга каспазы-8 клеток линии Jeg-3); * $p < 0,05$ – отличие показателя в лизатах клеток линии Jeg-3 после совместного сокультивирования с клетками линии NK-92 от интактных клеток линии Jeg-3

сокультивирования с клетками линии NK-92. При этом в клетках линии Jeg-3 интенсивность полос прокаспазы-3 в контроле и опыте не имела достоверных различий ($n = 4$) (рис. 4, *а*).

Одновременно с обнаружением фрагмента активной каспазы-3 показано увеличение степени активации каспазы-8, выраженной в виде отношения фрагмента активной каспазы-8 к прокаспазе-8 в клетках линии Jeg-3, полученных после их контактного сокультивирования с клетками линии NK-92 по сравнению с таковым в интактных клетках линии Jeg-3 ($p < 0,05$) ($n = 4$). При этом изменение данного отношения связано только с обнаружением в опытных образцах фрагмента p18 каспазы-8 ($p < 0,05$), так как отличия интенсивности полос прокаспазы-8 в клетках линии Jeg-3 после контактного сокультивирования с клетками линии NK-92 и при интактном культивировании клеток линии Jeg-3 в серии данных экспериментов не наблюдалось ($n = 4$) (рис. 4, *б*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Предотвращение гибели полуаллогенного трофобласта при взаимодействии с цитотоксическими клетками иммунной системы матери является стратегической физиологической задачей, решаемой организмом в период беременности. Поэтому клетки трофобласта обладают мощным арсеналом средств защиты, направленной на сохранение их жизнеспособности. При контакте клеток трофобласта и NK-клеток можно оценить взаимовлияние этих популяций клеток. В настоящее время показана иммуноре-

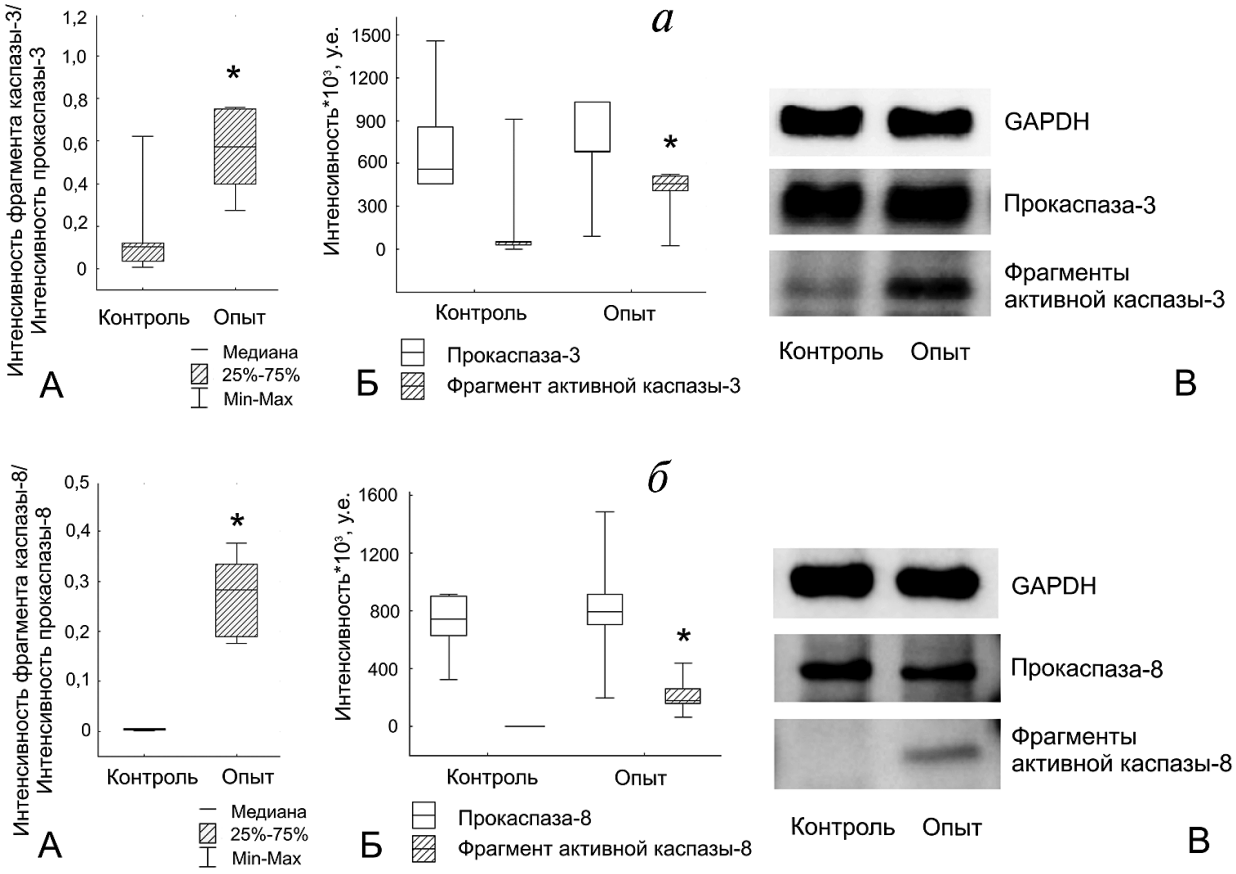


Рис. 4. Активация каспаз в клетках линии Jeg-3 после контактного сокультивирования с клетками линии NK-92. *а* – Активация каспазы-3 в клетках линии Jeg-3 (А – отношение интенсивности фрагмента активной каспазы-3 к интенсивности прокаспазы-3 в интактных (контроль) клетках линии Jeg-3 и после контактного сокультивирования с клетками линии NK-92 (опыт). Б – влияние клеток NK-92 на интенсивность фрагмента каспазы-3 и интенсивность прокаспазы-3 в клетках линии Jeg-3 при контактном сокультивировании. В – результат иммуноблоттинга каспазы-3 клеток линии Jeg-3); *б* – активация каспазы-8 в клетках линии Jeg-3 (А – отношение интенсивности фрагмента активной каспазы-8 к интенсивности прокаспазы-8 в интактных (контроль) клетках линии Jeg-3 и после контактного сокультивирования с клетками линии NK-92 (опыт). Б – влияние клеток линии NK-92 на интенсивность фрагмента каспазы-8 и интенсивность прокаспазы-8 в клетках линии Jeg-3 при контактном сокультивировании. В – результат иммуноблоттинга каспазы-8 клеток линии Jeg-3); * $p < 0,05$ – отличие показателя в лизатах клеток линии Jeg-3 после совместного сокультивирования с клетками линии NK-92 от интактных клеток линии Jeg-3

гуляторная (в основном, иммуносупрессивная) роль ряда соединений, синтезируемых трофобластом (синцитин-1, лиганды NKG2D рецепторов и др.) в отношении материнской иммунной системы [23, 24]. Имеются данные о том, что трофобласт продуцирует IL-10 [25, 26], TGFβ [27].

В результате взаимодействия NK-клеток с другими клетками при распознавании их, как клеток-мишеней, происходит активация NK-клеток, в частности NK-клеток периферической крови (pNK), а также использованных нами клеток линии NK-92. В результате образования иммунологического синапса в цитоплазму клетки-мишени высвобождается массив цитотоксических белков, что приводит к индукции апоптоза [28–30]. Клетки NK-92 в условиях контактного сокультивирования, по-видимому, способны реализовывать свое цитотоксическое действие в отношении клеток трофобласта. Данное предположение подтверждается тем, что мы обнаруживаем в клетках линии Jeg-3 после их контакта с клетками NK-92 гранзим B. Появление гранзима B в клетках линии Jeg-3 сопровождается снижением его уровня в клетках NK-92, что указывает на его адресную секрецию.

Кроме того, NK-клетки могут активировать апоптоз в клетке-мишени путем включения рецепторов смерти на клеточной поверхности, таких как белки семейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR), включая Fas (CD95) [31–33]. Нами показано, что контактное сокультивирование клеток линии NK-92 и клеток линии Jeg-3 приводит к активации инициаторной каспазы-8 контакт-зависимого пути индукции апоптоза в клетках линии Jeg-3. Показано, что клетки трофобласта экспрессируют Fas и другие рецепторы смерти (TRAIL-R1 и TRAIL-R2) на своей поверхности [34]. Каспаза-8 была первоначально охарактеризована как инициатор внешнего пути апоптоза. Более поздние наблюдения, установившие, что каспаза-8 активируется во многих типах опухолей, привели к открытию ее альтернативных, неапоптотических функций [35, 36]. Каспаза-8 полностью активируется только после двухэтапного процесса, включающего начальную димеризацию прокаспазы-8. На этом этапе она проявляет низкую каталитическую активность с узким диапазоном расщепляемых субстратов. Для полной активации требуется вторая протеолитическая стадия. Аутопроцессинг приводит к продуцированию малой субъединицы p10 и промежуточной p43 (DEDs-p18), а затем, в результате отщепления эффекторных доменов смерти (DEDs), к высвобождению большой субъединицы p18, содержащей активный цистеиновый сайт, обнаруживаемой методом иммуноблоттинга. [37]. В результате этого процесса возрастает возможное количество расщепляемых субстратов, включая каспазу-3. [38]. Обнаружение субъединицы p18 в клетках исследователи обычно расценивают как маркер активации каспазы-8. Многие неапоптотические функции каспазы-8 зависят от фосфорилирования остатка тирозина (Tyr380), обнаруженного в области линкера между большой и малой субъединицами фермента. Данный процесс приводит к повышенной резистентности к CD95-индуцированному апоптозу. Полагают, что пониженная скорость апоптоза при этом обусловлена сниженной скоростью расщепления каспазы-8, что подтверждается уменьшением образования фрагмента p18 либо его полным исчезновением [37, 39]. Показано, что активация каспазы-8, сопровождаемая экспрессией фосфатидилсерина на внешней стороне цитоплазматической мембраны, не всегда ассоциируется с гибелью клетки. Подобное событие в трофобласте может являться следствием слияния клеток и формирования синцитиального слоя [40], что продемонстрировано исследованиями, которые выполнены *in vitro* на модели хориокарциномы JAR [41]. Однако клетки линии JAR также, как и клетки линии Jeg-3 по сравнению, например, с клетками BeWo, не подвергаются обширной синцитиализации [42–44]. При этом в исследованиях с клетками линии BeWo, подвергнутых форсколиновому межклеточному слиянию, показано, что синцитиализация сопровождается снижением уровня прокаспазы-3 (через 24 ч культивирования) и прокаспазы-8 (через 48 ч культивирования), что является результатом снижения экспрессии белков. Исследователи подтверждают данное предположение обнаруженным снижением транс-крипции соответствующих мРНК при образовании синцития и отсутствием появления активных фрагментов каспазы-3 и каспазы-8 [42]. Сходная картина, демонстрирующая снижение уровня прокаспазы-8 и прокаспазы-3, и отсутствие активных фрагментов соответствующих каспаз, отмечена нами в клетках Jeg-3 после их дистантного сокультивирования с клетками NK-92. Исходя из этого, можно предположить, что в условиях дистантного сокультивирования с клетками NK-92 в клетках линии Jeg-3 усиливается процесс образования синцития, что требует дальнейшего исследования. В наших экспериментах по изучению контактного сокультивирования клеток линий Jeg-3 и NK-92 уровень прокаспазы-8 и прокаспазы-3 не отличался от контрольных образцов, представленных только одной популяцией – клетками линии Jeg-3. Можно предположить, что клетки NK-92 в результате контакт-

ного взаимодействия с клетками линии Jeg-3 стимулируют в них процессы расщепления каспазы-8, возможно, через активацию рецепторов смерти. В то же время имеются сведения о содержании в клетках Jeg-3 значительного количества мРНК TRAIL-R3 – рецептора, не имеющего функциональных доменов смерти и действующего как «приманка» [45], а также резистентности к TRAIL клеток хорионкарциномы [46]. Поэтому данные процессы требуют дальнейшего изучения.

Каждая ступень апоптотического каскада в трофобласте жестко контролируется эндогенными ингибиторами, некоторые из которых имеют значительную структурную гомологию с каспазой-8, что позволяет им блокировать ее активацию и предотвращать рецептор-зависимый апоптоз [1]. Ряд исследователей полагает, что обнаружение с помощью иммуноблота расщепления прокаспазы не означает, что рассматриваемая каспаза активирована [47]. Они подчеркивают, что абсолютным требованием активации каспазы является ее димеризация и расщепление в отсутствии димеризации не приводит к ее активации [47–49]. Именно поэтому при изучении активности каспазы-8 методом иммуноблоттинга, помимо оценки наличия расщепленного фрагмента p18, исследуют также активацию эффекторной каспазы-3. Целесообразно также определять ферментативную активность с использованием специфических субстратов [50]. Однако перекрестная активность каспазы-8 и гранзима B в отношении большинства применяемых субстратов, содержащих последовательность Ile-Glu-Thr-Asp, не позволило провести данный анализ в нашем исследовании. Кроме того, показано, что в трофобласте осуществляются механизмы инактивации пути апоптоза уже после активации каспазы-8 [51]. В то же время расщепление каспазы-3 в клетках Jeg-3, которое мы наблюдали после их контактного сокультивирования с клетками NK-92, является признаком необратимого развития апоптотического процесса. Данный факт может поставить под сомнение предположение о том, что в нашем эксперименте по контактному сокультивированию реализуется механизм инактивации апоптоза клетками трофобласта. Активация каспазы-3 может быть связана не только с воздействием каспазы-8, а также быть следствием других событий, в частности, она может быть напрямую активирована белками литических гранул, поступающих из NK-клеток в результате образования иммунологического синапса [52]. Как отмечалось выше, субстратная специфичность гранзима B совпадает с каспазой-8, вследствие чего он может расщеплять зимогенные формы других каспаз, в частности каспазы-3 [53–55]. Он также способен активировать каспазы через митохондриальный путь, стимулируя выброс цитохрома C и других апоптогенных молекул в цитоплазму, активации каспазы-9 и, как следствие этого активации каспазы-3 [56]. При этом само наличие признаков апоптоза в клетках трофобласта в присутствии NK-клеток требует более детального исследования, так как трофобласт имеет систему защиты от NK-клеток в виде экспрессии HLA-G и HLA-E [57], а также экспрессирует лиганды рецепторов смерти как на поверхности, так и в растворимой форме [1]. Безусловно, необходимо учитывать, что в данной модели *in vitro* использовалась клеточная линия NK-92, по своим характеристикам несколько отличная от pNK или dNK.

Однако мы опирались как на проведенные нами исследования NK-клеток периферической крови [58], так и на данные других исследователей [59], свидетельствующие о возможности экстраполяции такого рода сведений на маточные NK-клетки, исходя из того, что клетки линии NK-92 соответствуют основным фенотипическим и функциональным характеристикам NK-клеток человека.

Возможно, реализация цитотоксического ответа клеток NK-92 в отношении клеток трофобласта может быть связана с недостаточностью ингибирующего сигнала со стороны клеток Jeg-3. Отмечено, что NK-92 практически не экспрессируют на своей поверхности рецепторы семейства KIR [60]. Однако в клетках NK-92 установлена незначительная экспрессия KIR2DL4 и ILT-2/CD85, непосредственно распознающих HLA-G трофобласта, их экспрессия увеличивается при сокультивировании с клетками трофобласта линии BeWo [4]. Клетками NK-92 активно экспрессируются ингибирующие рецепторы NKG2A и NRG2B, лигандом которых служит HLA-E [60]. Поэтому, несмотря на то что клетки NK-92 считают популяцией клеток с повышенной цитотоксической активностью, содержащих высокий уровень цитотоксических белков, трофобласт имеет различные пути реализации своей ингибирующей функции в отношении данных клеток.

Изменений в содержании цитотоксических белков в клетках NK-92 при их дистантном сокультивировании с клетками Jeg-3 не выявлено. Показано, что изменения в спектре секреции цитокинов dNK-клетками происходят только при их контактном (но не дистантном) сокультивировании с клетками трофобласта [61]. Было продемонстрировано накопление гранулизина dNK клеток в клетках EVT, являющихся наиболее инвазивными клетками эмбрионального

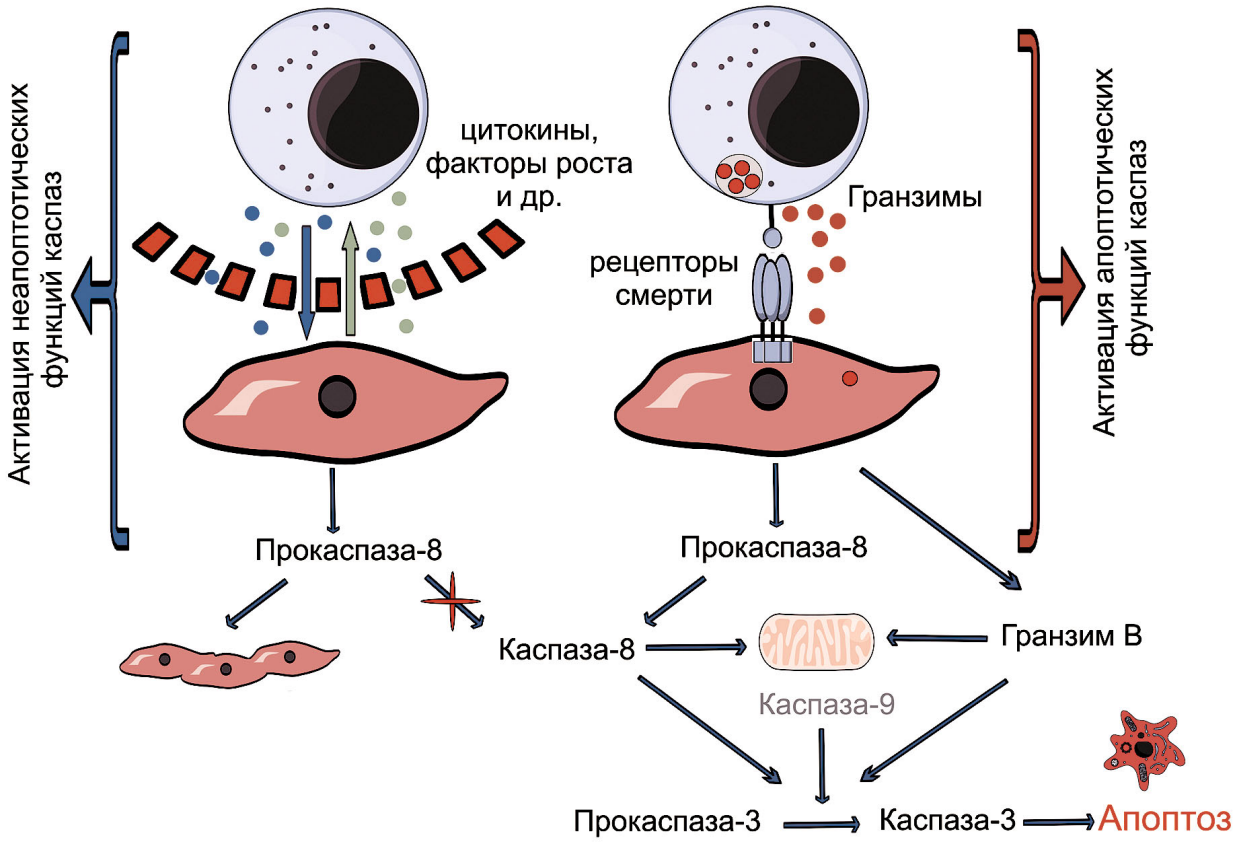


Рис. 5. Предполагаемая схема активации каспаз в клетках линии Jeg-3 после их взаимодействии с клетками линии NK-92 в системе *in vitro* в условиях наличия либо отсутствия их непосредственного контакта.
С цветным вариантом рис. 5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

происхождения, после их контактного сокультивирования, и как следствие, активация в клетках EVT процессов апоптоза [52]. Важную роль межклеточных контактов (не только растворимых факторов) в функционировании трофобласта отмечали также и в других работах [62]. Полученные нами данные подтверждают значение контактного взаимодействия клеток трофобласта и NK-клеток.

Результаты взаимодействия клеток линий NK-92 и Jeg-3 при наличии либо отсутствии непосредственного контакта между ними, а также предполагаемые механизмы активации каспаз в клетках трофобласта Jeg-3 при этом представлены на рис. 5. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что именно контактное сокультивирование клеток линий Jeg-3 и NK-92 *in vitro* характеризуется секрецией гранзима B клетками линии NK-92, что сопровождается активацией каспаз и может стать причиной гибели трофобласта. Характер изменения уровня исследованных каспазы-8 и каспазы-3 в условиях отсутствия непосредственного контакта между клетками данных популяций позволяет выдвинуть предположение о возможном усилении процессов, связанных с образованием синцития клетками линии Jeg-3.

Финансирование. Выполнено при финансовой поддержке НШ-2873.2018.7 и Госзадания АААА-А19-119021290116-1.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Straszewski-Chavez, S.L., Abrahams, V.M., and Mor, G. (2005) The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy, *Endocr. Rev.*, **26**, 877–897, doi: 10.1210/er.2005-0003.
2. Romanski, A., Uherek, C., Bug, G., Seifried, E., Klingemann, H., Wels, W.S., Ottmann, O.G., and Tonn, T. (2016) CD19-CAR engineered NK-92 cells are sufficient to overcome NK cell resistance in B-cell malignancies, *J. Cell. Mol. Med.*, **20**, 1287–1294, doi: 10.1111/jcmm.12810.
3. Crespo, A.C., Strominger, J.L., and Tilburgs, T. (2016) Expression of KIR2DS1 by decidual natural killer cells increases their ability to control placental HCMV infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 15072–15077, doi: 10.1073/pnas.1617927114.
4. Liu, Y., Zhang, L., Gao, M., Zhang, F., Xu, X., Liu, X., and Hu, X. (2013) Changes of inhibitory receptors on NK-92 cells and HLA-G on BeWo cells with *Toxoplasma gondii* infection, *Inflammation*, **36**, 1440–1447, doi: 10.1007/s10753-013-9684-1.
5. Matson, B.C., and Caron, K.M. (2014) Uterine natural killer cells as modulators of the maternal-fetal vasculature, *Int. J. Dev. Biol.,* **58**, 199–204, doi: 10.1387/ijdb.140032kc.
6. Manaster, I., and Mandelboim, O. (2010) The unique properties of uterine NK cells, *Am. J. Reprod. Immunol.*, **63**, 434–444, doi: 10.1111/j.1600-0897.2009.00794.x.
7. Vacca, P., Pietra, G., Falco, M., Romeo, E., Bottino, C., Bellora, F., Prefumo, F., Fulcheri, E., Venturini, P.L., Costa, M., Moretta, A., Moretta, L., and Mingari, M.C. (2006) Analysis of natural killer cells isolated from human decidua: Evidence that 2B4 (CD244) functions as an inhibitory receptor and blocks NK-cell function, *Blood*, **108**, 4078–4085, doi: 10.1182/blood-2006-04-017343.
8. Koopman, L.A., Kopcow, H.D., Rybalov, B., Boyson, J.E., Orange, J.S., Schatz, F., Masch, R., Lockwood, C.J., Schachter, A.D., Park, P.J., and Strominger, J.L. (2003) Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential, *J. Exp. Med.*, **198**, 1201–1212, doi: 10.1084/jem.20030305.
9. King, A., Wooding, P., Gardner, L., and Loke, Y.W. (1993) Expression of perforin, granzyme A and TIA-1 by human uterine $CD56^+$ NK cells implies they are activated and capable of effector functions, *Hum. Reprod.*, **8**, 2061–2067, doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137982.
10. Lash, G.E., Robson, S.C., and Bulmer, J.N. (2010) Review: functional role of uterine natural killer (uNK) cells in human early pregnancy decidua, *Placenta*, **31 Suppl.**, 87–92, doi: 10.1016/j.placenta.2009.12.022.
11. Ivanisevic, M., Segerer, S., Rieger, L., Kapp, M., Dietl, J., Kammerer, U., and Frambach, T. (2010) Antigen-presenting cells in pregnant and non-pregnant human myometrium, *Am. J. Reprod. Immunol.*, **64**, 188–196, doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00858.x.
12. Kopcow, H.D., Allan, D.S., Chen, X., Rybalov, B., Andzelm, M.M., Ge, B., and Strominger, J.L. (2005) Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15563–15568, doi: 10.1073/pnas.0507835102.
13. Redzovic, A., Laskarin, G., Dominovic, M., Haller, H., and Rukavina, D. (2013) Mucins help to avoid alloreactivity at the maternal fetal interface, *Clin. Dev. Immunol.*, **2013**, 542152, doi: 10.1155/2013/542152.
14. Sun, J., Yang, M., Ban, Y., Gao, W., Song, B., Wang, Y., Zhang, Y., Shao, Q., Kong, B., and Qu, X. (2016) Tim-3 is upregulated in NK cells during early pregnancy and inhibits NK cytotoxicity toward trophoblast in galectin-9 dependent pathway, *PLoS One*, **11**, e0147186, doi: 10.1371/journal.pone.0147186.
15. Langhans, B., Ahrendt, M., Nattermann, J., Sauerbruch, T., and Spengler, U. (2005) Comparative study of NK cell-mediated cytotoxicity using radioactive and flow cytometric cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, **306**, 161–168, doi: 10.1016/j.jim.2005.08.010.
16. Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., and Kumar, S. (2015) Old, new and emerging functions of caspases, *Cell Death Differ.*, **22**, 526–539, doi: 10.1038/cdd.2014.216.
17. Jingting, C., Yangde, Z., Yi, Z., Huining, L., Rong, Y., and Yu, Z. (2007) Heparanase expression correlates with metastatic capability in human choriocarcinoma, *Gynecol. Oncol.*, **107**, 22–29, doi: 10.1016/j.ygyno.2007.05.042.
18. Kohler, P.O., and Bridson, W.E. (1971) Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **32**, 683–687, doi: 10.1210/jcem-32-5-683.
19. Gong, J.H., Maki, G., and Klingemann, H.G. (1994) Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells, *Leukemia*, **8**, 652–658.
20. Komatsu, F., and Kajiwara, M. (1998) Relation of natural killer cell line NK-92-mediated cytolysis (NK-92-lysis) with the surface markers of major histocompatibility complex class I antigens, adhesion molecules, and Fas of target cells, *Oncol. Res.*, **10**, 483–489.
21. Coulomb-L'Hermine, A., Larousserie, F., Pflanz, S., Bardel, E., Kastelein, R.A., and Devergne, O. (2007) Expression of interleukin-27 by human trophoblast cells, *Placenta*, **28**, 1133–1140, doi: 10.1016/j.placenta.2007.06.004.
22. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
23. Hedlund, M., Stenqvist, A.C., Nagaeva, O., Kjellberg, L., Wulff, M., Baranov, V., and Mincheva-Nilsson, L. (2009) Human placenta expresses and secretes NKG2D ligands via exosomes that down-modulate the cognate receptor expression: evidence for immunosuppressive function, *J. Immunol.*, **183**, 340–351, doi: 10.4049/jimmunol.0803477.
24. Lokossou, A.G., Toudic, C., and Barbeau, B. (2014) Implication of human endogenous retrovirus envelope proteins in placental functions, *Viruses*, **6**, 4609–4627, doi: 10.3390/v6114609.
25. Hakam, M.S., Miranda-Sayago, J.M., Hayrabedyan, S., Todorova, K., Spencer, P.S., Jabeen, A., Barnea, E.R., and Fernandez, N. (2017) Preimplantation factor (PIF) promotes HLA-G, -E, -F, -C expression in JEG-3 choriocarcinoma cells and endogenous progesterone activity, *Cell. Physiol. Biochem.*, **43**, 2277–2296, doi: 10.1159/000484378.
26. Hanna, N., Hanna, I., Hleb, M., Wagner, E., Dougherty, J., Balkundi, D., Padbury, J., and Sharma, S. (2000) Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts, *J. Immunol.*, **164**, 5721–5728.
27. Knofler, M., and Pollheimer, J. (2012) IFPA Award in placentology lecture: molecular regulation of human trophoblast invasion, *Placenta,* **33**, 55–62, doi: 10.1016/j.placenta.2011.09.019.
28. Rousalova, I., and Krepela, E. (2010) Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (review), *Int. J. Oncol.*, **37**, 1361–1378.
29. Thiery, J., Keefe, D., Saffarian, S., Martinvalet, D., Walch, M., Boucrot, E., Kirchhausen, T., and Lieberman, J. (2010) Perforin activates clathrin- and dynamin-dependent endo-

cytosis, which is required for plasma membrane repair and delivery of granzyme B for granzyme-mediated apoptosis, *Blood*, **115**, 1582–1593, doi: 10.1182/blood-2009-10-246116.
30. Thiery, J., Keefe, D., Boulant, S., Boucrot, E., Walch, M., Martinvalet, D., Goping, I.S., Bleackley, R.C., Kirchhausen, T., and Lieberman, J. (2011) Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells, *Nat. Immunol.*, **12**, 770–777, doi: 10.1038/ni.2050.
31. Lieberman, J. (2003) The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal, *Nat. Rev. Immunol.*, **3**, 361–370 doi: 10.1038/nri1083.
32. Orange, J.S., and Ballas, Z.K. (2006) Natural killer cells in human health and disease, *Clin. Immunol.*, **118**, 1–10, doi: 10.1016/j.clim.2005.10.011.
33. Hazeldine, J., and Lord, J.M. (2013) The impact of ageing on natural killer cell function and potential consequences for health in older adults, *Ageing Res. Rev.*, **12**, 1069–1078, doi: 10.1016/j.arr.2013.04.003.
34. Hammer, A., and Dohr, G. (2000) Expression of Fas-ligand in first trimester and term human placental villi, *J. Reprod. Immunol.*, **46**, 83–90.
35. Salvesen, G.S., and Walsh, C.M. (2014) Functions of caspase 8: the identified and the mysterious, *Semin. Immunol.*, **26**, 246–252, doi: 10.1016/j.smim.2014.03.005.
36. Feltham, R., Vince, J.E., and Lawlor, K.E. (2017) Caspase-8: not so silently deadly, *Clin. Transl. Immunol.*, **6**, e124, doi: 10.1038/cti.2016.83.
37. Cursi, S., Rufini, A., Stagni, V., Condo, I., Matafora, V., Bachi, A., Bonifazi, A.P., Coppola, L., Superti-Furga, G., Testi, R., and Barila, D. (2006) Src kinase phosphorylates Caspase-8 on Tyr380: a novel mechanism of apoptosis suppression, *EMBO J.*, **25**, 1895–1905, doi: 10.1038/sj.emboj.7601085.
38. Powley, I.R., Hughes, M.A., Cain, K., and MacFarlane, M. (2016) Caspase-8 tyrosine-380 phosphorylation inhibits CD95 DISC function by preventing procaspase-8 maturation and cycling within the complex, *Oncogene*, **35**, 5629–5640, doi: 10.1038/onc.2016.99.
39. Cohen, G.M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis, *Biochem. J.,* **326** (Pt 1), 1–16.
40. Gauster, M., and Huppertz, B. (2010) The paradox of caspase 8 in human villous trophoblast fusion, *Placenta*, **31**, 82–88, doi: 10.1016/j.placenta.2009.12.007.
41. Adler, R.R., Ng, A.K., and Rote, N.S. (1995) Monoclonal antiphosphatidylserine antibody inhibits intercellular fusion of the choriocarcinoma line, JAR, *Biol. Reprod.*, **53**, 905–910, doi: 10.1095/biolreprod53.4.905.
42. Wei, B.R., Xu, C., and Rote, N.S. (2012) Increased resistance to apoptosis during differentiation and syncytialization of BeWo choriocarcinoma cells, *Adv. Biosci. Biotechnol.*, **3**, 805–813, doi: 10.4236/abb.2012.326100.
43. Borges, M., Bose, P., Frank, H.G., Kaufmann, P., and Potgens, A.J. (2003) A two-colour fluorescence assay for the measurement of syncytial fusion between trophoblast-derived cell lines, *Placenta*, **24**, 959–964, doi: 10.1016/S0143-4004(03)00173-5.
44. Al-Nasiry, S., Spitz, B., Hanssens, M., Luyten, C., and Pijnenborg, R. (2006) Differential effects of inducers of syncytialization and apoptosis on BeWo and JEG-3 choriocarcinoma cells, *Hum. Reprod.*, **21**, 193–201, doi: 10.1093/humrep/dei272.
45. Phillips, T.A., Ni, J., Pan, G., Ruben, S.M., Wei, Y.F., Pace, J.L., and Hunt, J.S. (1999) TRAIL (Apo-2L) and TRAIL receptors in human placentas: implications for immune privilege, *J. Immunol.*, **162**, 6053–6059.
46. Yusuf, K., Smith, S.D., Sadovsky, Y., and Nelson, D.M. (2002) Trophoblast differentiation modulates the activity of caspases in primary cultures of term human trophoblasts, *Pediatr. Res.*, **52**, 411–415, doi: 10.1203/00006450-200209000-00018.
47. van Raam, B.J., and Salvesen, G.S. (2012) Proliferative versus apoptotic functions of caspase-8 Hetero or homo: the caspase-8 dimer controls cell fate, *Biochim. Biophys. Acta*, **1824**, 113–122, doi: 10.1016/j.bbapap.2011.06.005.
48. Keller, N., Grutter, M.G., and Zerbe, O. (2010) Studies of the molecular mechanism of caspase-8 activation by solution NMR, *Cell Death Differ.*, **17**, 710–718, doi: 10.1038/cdd.2009.155.
49. Pop, C., Fitzgerald, P., Green, D.R., and Salvesen, G.S. (2007) Role of proteolysis in caspase-8 activation and stabilization, *Biochemistry*, **46**, 4398–4407, doi: 10.1021/bi602623b.
50. Carrillo, I., Droguett, D., Castillo, C., Liempi, A., Munoz, L., Maya, J.D., Galanti, N., and Kemmerling, U. (2016) Caspase-8 activity is part of the BeWo trophoblast cell defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection, *Exp. Parasitol.*, **168**, 9–15, doi: 10.1016/j.exppara.2016.06.008.
51. Barnhart, B.C., and Peter, M.E. (2002) Two faces of caspase-8, *Nat. Immunol.*, **3**, 896–898, doi: 10.1038/ni1002-896.
52. Nakashima, A., Shiozaki, A., Myojo, S., Ito, M., Tatematsu, M., Sakai, M., Takamori, Y., Ogawa, K., Nagata, K., and Saito, S. (2008) Granulysin produced by uterine natural killer cells induces apoptosis of extravillous trophoblasts in spontaneous abortion, *Am. J. Pathol.*, **173**, 653–664, doi: 10.2353/ajpath.2008.071169.
53. Sweeney, E.A., Inokuchi, J., and Igarashi, Y. (1998) Inhibition of sphingolipid induced apoptosis by caspase inhibitors indicates that sphingosine acts in an earlier part of the apoptotic pathway than ceramide, *FEBS Lett.*, **425**, 61–65.
54. Estebanez-Perpina, E., Fuentes-Prior, P., Belorgey, D., Braun, M., Kiefersauer, R., Maskos, K., Huber, R., Rubin, H., and Bode, W. (2000) Crystal structure of the caspase activator human granzyme B, a proteinase highly specific for an Asp-P1 residue, *Biol. Chem.*, **381**, 1203–1214, doi: 10.1515/BC.2000.148.
55. Watt, W., Koeplinger, K.A., Mildner, A.M., Heinrikson, R.L., Tomasselli, A.G., and Watenpaugh, K.D. (1999) The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis, *Structure*, **7**, 1135–1143.
56. Afonina, I.S., Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2010) Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B, *Immunol. Rev.*, **235**, 105–116, doi: 10.1111/j.0105-2896.2010.00908.x.
57. Morandi, F., and Pistoia, V. (2014) Interactions between HLA-G and HLA-E in physiological and pathological conditions, *Front. Immunol.*, **5**, 394, doi: 10.3389/fimmu.2014.00394.
58. Mikhailova, V.A., Bazhenov, D.O., Viazmina, L.P., Agnaeva, A.O., Bespalova, O.N., Sel'kov, S.A., and Sokolov, D.I. (2019) Cytotoxic activity of peripheral blood NK cells towards trophoblast cells during pregnancy, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **166**, 567–573, doi: 10.1007/s10517-019-04393-4.
59. Park, D.W., Lee, H.J., Park, C.W., Hong, S.R., Kwak-Kim, J., and Yang, K.M. (2010) Peripheral blood NK cells reflect changes in decidual NK cells in women with recurrent miscarriages, *Am. J. Reprod. Immunol.*, **63**, 173–180, doi: 10.1111/j.1600-0897.2009.00777.x.
60. Maki, G., Klingemann, H.G., Martinson, J.A., and Tam, Y.K. (2001) Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92, *J. Hematother. Stem. Cell. Res.*, **10**, 369–383, doi: 10.1089/15258160175028-8975.

61. Lash, G.E., Naruse, K., Robson, A., Innes, B.A., Searle, R.F., Robson, S.C., and Bulmer, J.N. (2011) Interaction between uterine natural killer cells and extravillous trophoblast cells: effect on cytokine and angiogenic growth factor production, *Hum. Reprod.*, **26**, 2289–2295, doi: 10.1093/humrep/der198.

62. Zhang, Y., Qu, D., Sun, J., Zhao, L., Wang, Q., Shao, Q., Kong, B., Zhang, Y., and Qu, X. (2016) Human trophoblast cells induced MDSCs from peripheral blood CD14(+) myelomonocytic cells *via* elevated levels of CCL2, *Cell. Mol. Immunol.*, **13**, 615–627, doi: 10.1038/cmi.2015.41.

INDUCTION OF CASPASE CASCADE IN TROPHOBLAST CELLS OF Jeg-3 LINE IN DIFFERENT MODELS OF THEIR CO-CULTIVATION WITH NK-92 CELLS

Yu. P. Milyutina*, V. A. Mikhailova, K. M. Pyatygina, E. S. Demidova, D. A. Malygina, T. E. Tertychnaia, A. V. Arutjunyan, D. I. Sokolov, and S. A. Selkov

Ott Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductology, 199034 St. Petersburg, Russia; E-mail: milyutina1010@mail.ru

Received April 17, 2019
Revised June 18, 2019
Accepted June 22, 2019

Study of the interaction of natural killers (NK) with trophoblast cells and identification of the conditions favoring the NK-cells cytotoxicity is of fundamental and applied importance for understanding their role in pathologies and complications during pregnancy. In the present work, changes in the content and activation of caspases in the Jeg-3 trophoblast cells in various models of their co-cultivation with NK-92 cells were examined. The necessity of the direct contact between cells of these two populations for activation of caspase-8 and caspase-3 in trophoblast cells has been shown. Under direct contact conditions, the cytotoxic granzyme B was found in the Jeg-3 cells, accompanied by a decrease in its amount in the NK-92 cells. Distant co-cultivation of the NK-92 and Jeg-3 cells is not accompanied by the activation of the initiatory and effector caspases, characteristic of apoptosis, in the Jeg-3 cells. At that, a decrease in the content of studied pro-caspases in the trophoblast cells may be due to the realization of their alternative non-apoptotic functions.

Keywords: caspases, granzyme B, trophoblast, natural killers, apoptosis