

УДК 612.017: 612.018

РОЛЬ РЕКОМБИНАНТНОГО ГЛИКОДЕЛИНА В ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ

© 2022 г. К. Ю. Шардина¹, В. П. Тимганова¹, М. С. Бочкова^{1,2}, П. В. Храмов^{1,2},
М. Б. Раев^{1,2}, С. А. Заморина^{1,2,*}

Представлено академиком РАН В.А. Черешневым

Поступило 22.04.2022 г.

После доработки 25.05.2022 г.

Принято к публикации 27.05.2022 г.

Исследовали влияние рекомбинантного гликоделина (GdA) на уровень Т-регуляторных лимфоцитов (Treg) в культуре активированных CD4⁺-лимфоцитов, одновременно оценивая пролиферативный статус клеток. В исследовании применяли рекомбинантный GdA, полученный из *E. coli* и из клеток НЕК293 в концентрациях 0,2, 2 и 10 мкг/мл. Установлено, что только низкая концентрация (0,2 мкг/мл) рекомбинантного GdA бактериального происхождения снижала количество пролиферирующих CD4⁺-лимфоцитов, а также количество Treg (CD4⁺CD25^{high}CD127^{-/low}) в экспериментальной системе.

Ключевые слова: беременность, гликоделин, дифференцировка клеток, регуляторные Т-лимфоциты

DOI: 10.31857/S2686738922050262

Гликоделин (PP14, PAEP, альфа-2-микроглобулин) — это димерный гликопротеин с молекулярной массой 42–56 кД, который был впервые выделен и идентифицирован в 1976 г. как новый антиген плаценты [1]. Известно, что амниотический вариант гликоделина (GdA) секретируется преимущественно децидуальным железистым эпителием под влиянием прогестерона, накапливаясь в амниотической жидкости и материнской сыворотке во время беременности [2]. Незвизирая на то что иммунодепрессивные эффекты гликоделина хорошо известны [3, 4], его роль в формировании иммунной толерантности в период беременности остается неизученной.

С точки зрения формирования толерантности при беременности, одной из ключевых является субпопуляция регуляторных Т-лимфоцитов (Treg). Дефицит этих клеток или их функциональная недостаточность связаны с осложнением или прерыванием беременности, а повышение уровня Treg ассоциировано с успешным течением беременности [5].

Известно, что GdA способен повышать уровень антигенспецифичных Treg в присутствии антигенпрезентирующих клеток [6], однако прямые эффекты этого белка на дифференцировку Т-клеток практически не изучены. Нативный и рекомбинантный GdA способны напрямую регулировать дифференцировку наивных Т-хелперов, способствуя доминированию Th2 над Th1 [8]. Реализацию эффектов GdA на уровне Т-клеток связывают с вовлечением мембранной молекулы CD45 [7].

Таким образом, целью данной работы являлось изучение роли рекомбинантного GdA в регуляции дифференцировки Treg в модели *in vitro*. В рамках поставленной цели решались две задачи — изучение влияния двух различных по гликозилированию форм рекомбинантного гликоделина, а также изучение пролиферативного статуса клеток в эксперименте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось согласно Хельсинкской Декларации ВМА 2000 г. и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и био-медицине 1999 г., получено разрешение этического комитета ИЭГМ УрО РАН (IRB00010009) от 1.03.2022.

Объекты исследования. Образцы венозной крови были взяты у здоровых доноров (небеременные женщины, $n = 5$, возраст 25–39 лет) путем

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

² Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия

*e-mail: zamorina.sa@gmail.com

венопункции. Мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) выделяли центрифугированием в градиенте плотности диаколл-верографина (Diacoll 1077, “Dia-M”, Россия, $\rho = 1.077 \text{ г/см}^3$). Монокультуры CD4^+ -клеток (Т-хелперы) получали методом иммуномагнитной сепарации с использованием магнитных частиц MACS® MicroBeads (“Miltenyi Biotec”, Германия). Чистота выделения Т-хелперов составила $96.7 \pm 1.7\%$.

В работе использовали два вида рекомбинантного гликоделина: GdA [продукт *E. coli*, 22.4 кДа] и mGdA [продукт НЕК-239м, 23.9 кДа], (“MyBioSource. Inc.”, США) в концентрациях 0.2 и 2 мкг/мл, соответствующих его уровню в периферической крови женщины при физиологической беременности (0.2 мкг/мл – I и III триместры; 2 мкг/мл – II триместр), а также 10 мкг/мл, соответствующей его концентрации в амниотической жидкости (I триместр) и тканях эндометрия [9]. В препаратах гликоделина оценивали концентрацию эндотоксина (ЛПС) с помощью ЛАЛ-теста (“Thermo Scientific”, США). Концентрация эндотоксина в препаратах гликоделина была $>0.5 \text{ EU/мл}$, поэтому в среду культивирования клеток добавляли полимиксин В (Sigma, США) для подавления действия ЛПС. Полученные монокультуры Т-хелперов в концентрации 1×10^6 клеток инкубировали в 96-луночном планшете в полной питательной среде (RPMI-1640 (Sigma Aldrich, США), 10% FBS (“BI”, Израиль), 10 мМ Нерес (“ICN Ph.”, США), 2 мМ L-глутамин (“ICN Ph.”, США), 100 мкг/мл пенициллина-стрептомицина-амфотерицина (“BI”, Израиль)) и 30 мкг/мл полимиксина В с активационными частицами (#130-091-441, “Miltenyi Biotec”, Германия), содержащими антитела против CD2, CD3, CD28 и цитокинами TGF- β (5 нг/мл) и IL-2 (166 нг/мл) (“Miltenyi Biotec”, Германия). Концентрации цитокинов были определены исходя из информации об их биологической активности, предложенной на сайте производителя. После внесения гликоделина клетки культивировали 72 ч при 5% CO_2 и 37°C.

После культивирования производили окрашивание клеток с использованием панели идентификации Treg (#362251, “Biolegend”, США). В панель входят витальный краситель 7-AAD и антитела к поверхностным антигенам (APC-CD25, APC/Cyanine7-CD3, PE/Cyanine7-CD127 (IL-7R α), FITC-CD4). Тактика гейтирования включала в себя следующие этапы: на графике FSC/SSC выделяли общий пул лимфоцитов, затем живые Т-лимфоциты (7-AAD-CD3 $^+$), из них гейтировали Т-хелперы (CD4 $^+$), внутри популяции которых оценивали процент Treg (CD25 $^{\text{high}}$ -CD127 $^{-/\text{low}}$) (рис. 1А). Итоговый фенотип Treg: 7-AAD-CD3 $^+$ CD4 $^+$ CD25 $^{\text{high}}$ CD127 $^{-/\text{low}}$. Измерения

проводили на проточном цитофлуориметре CytoFlex S (“Beckman Coulter”, США).

Для оценки пролиферативного статуса использовали метод дифференциального гейтирования на графике светорассеяния по размеру и гранулярности клеток. Так, после 72 ч культивирования активированные CD4 $^+$ -клетки были представлены тремя популяциями: неделящиеся клетки в характерном для них регионе, пролиферирующие клетки, образующие смещение вправо и вверх и апоптотирующие клетки. Количество клеток внутри каждой популяции выражали в процентах от общего количества клеток [9]. Далее файлы данных были обработаны в программе “KALUZA Analysis Software” (Beckman Coulter, США).

Статистическую обработку полученных результатов данных проводили в программе GraphPad Prism 6 при помощи критерия Вилкоксона. Результаты представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей (Me (Q1–Q3)). Различия считались достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что присутствие в культурах активационных частиц, нагруженных антителами против CD2/CD3/CD28, а также цитокинов TGF- β и IL-2, приводило к существенному повышению уровня Treg в культурах Т-хелперов, что свидетельствует об адекватности экспериментальной системы (рис. 1 а, б).

При изучении влияния GdA на дифференцировку Treg установлено, что данный белок, вне зависимости от источника получения, практически не оказывал достоверного влияния на уровень CD4 $^+$ CD25 $^{\text{high}}$ CD127 $^{-/\text{low}}$ в монокультуре Т-хелперов. Однако низкая концентрация рекомбинантного гликоделина бактериального происхождения (GdA 0.2 мкг/мл) вызывала снижение уровня Treg в культурах клеток (рис. 1 б).

Учитывая тот факт, что процессы пролиферации и дифференцировки тесно связаны, мы оценили пролиферативный статус Т-хелперов в культуре клеток. Показано, что GdA практически не оказывал эффекта на распределение клеток по пролиферативному статусу, за исключением низкой концентрации рекомбинантного гликоделина бактериального происхождения (GdA 0.2 мкг/мл), которая снижала количество пролиферирующих клеток, одновременно повышая количество не пролиферирующих клеток. Таким образом, низкая концентрация GdA угнетала пролиферацию активированных Т-хелперов, и за счет этого эффекта снижалось количество Treg в данной экспериментальной модели (рис. 2).

Важно отметить, что достоверный эффект оказывала только низкая концентрация рекомби-

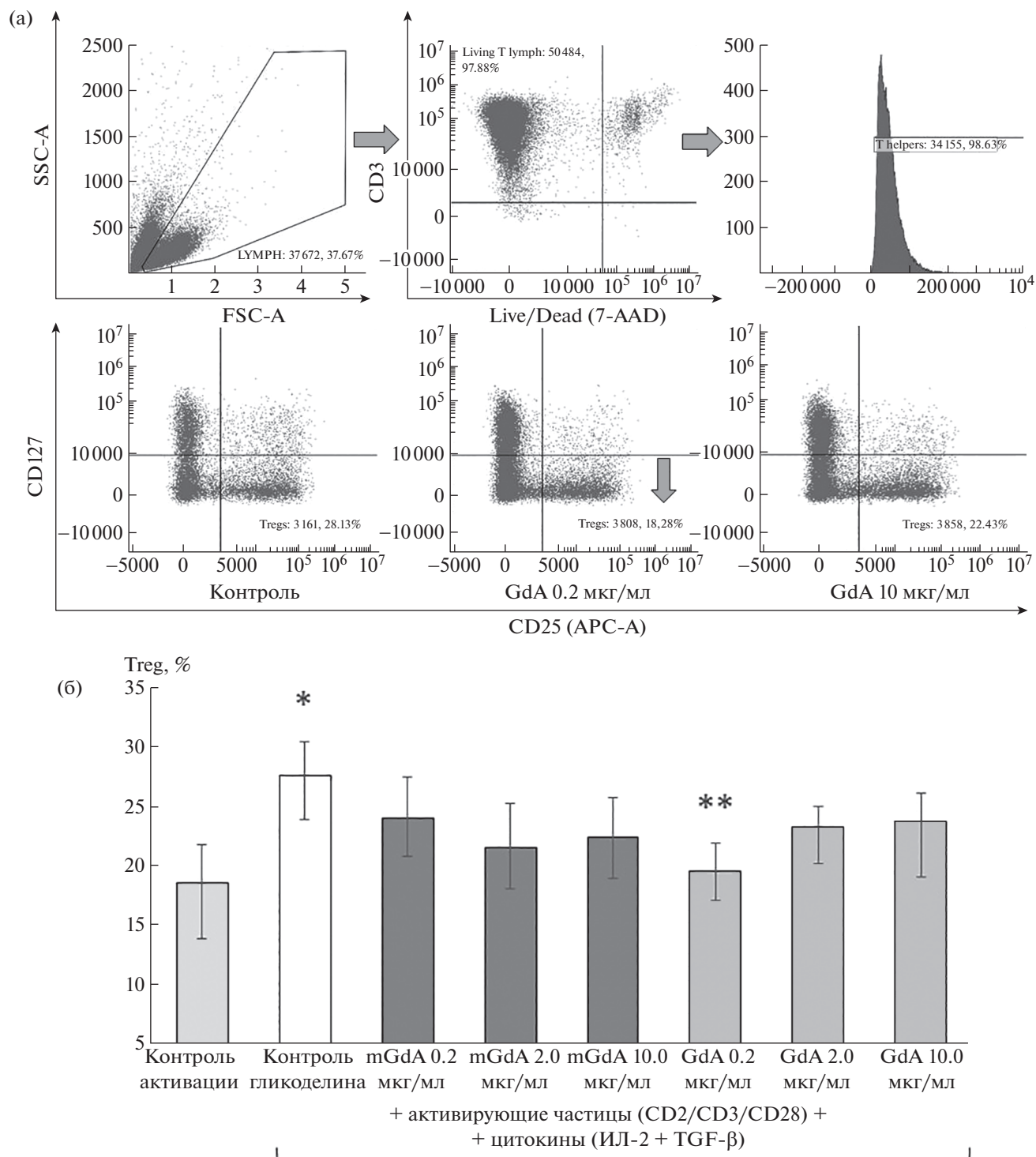


Рис. 1. Влияние гликоделина на уровень Treg (CD25^{high}CD127^{-/low}) в культуре изолированных Т-хелперов. А) Показаны гистограммы гейтирования Treg и результаты одного эксперимента, контроль без гликоделина; Б) Результаты серии экспериментов (Me (Q1–Q3), n = 5).

Примечание: здесь и в рис. 2, * p < 0.05 – достоверные по w-критерию Вилкоксона различия между контролем без активаторов и контролем с активатором, **p < 0.05 – между контролем с активатором и пробами с гликоделином. Контроль активации – пробы без активирующих частиц и цитокинов, контроль гликоделина – пробы без гликоделина.

нантного гликоделина, что может объясняться его способностью регулировать экспрессию своего предположительного рецептора – CD45 [7].

По-видимому, высокие концентрации белка не вызывают достоверных эффектов из-за рефрактерного состояния клеток, связанного с переиз-

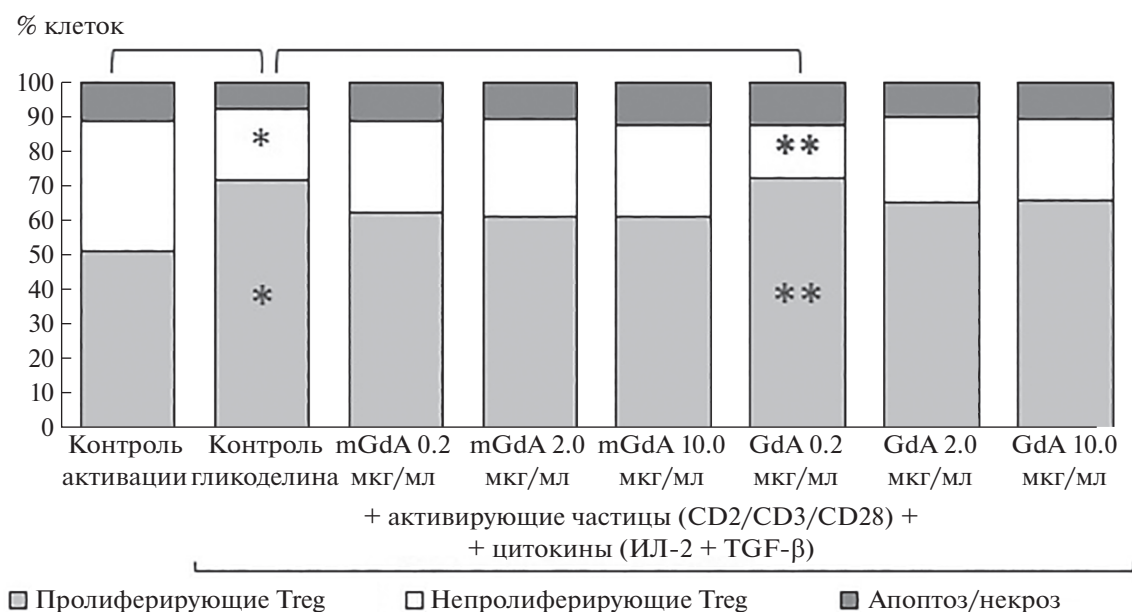


Рис. 2. Влияние гликоделина на пролиферативный статус Т-хелперов (М, n = 5).

бытком сигнала. Стоит также отметить, что гликозилированный рекомбинантный mGdA, полученный в клетках млекопитающих НЕК293, не оказывал достоверных эффектов на пролиферацию и дифференцировку Treg.

В целом выявленный угнетающий эффект гликоделина является довольно неожиданным, поскольку для успешного течения беременности необходимо повышение уровня Treg [10]. В то же время гликозилированный гликоделин, который близок по своей структуре нативному, не оказывал достоверных эффектов на дифференцировку Treg. Стоит отметить, что ранее мы показали, что альфа-фетопротеин способен подавлять дифференцировку Treg *in vitro* [11]. Известно, что хорионический гонадотропин [12] и трофобластический гликопротеин [13] повышают количество Treg в культуре, а также усиливают функциональную активность этих клеток. По-видимому, белки, ассоциированные с беременностью, оказывая по отдельности разнонаправленные эффекты, в совокупности формируют вектор иммунной толерантности.

Таким образом, было показано, что только низкая концентрация (0.2 мкг/мл) рекомбинантного GdA бактериального происхождения снижала количество Treg в экспериментальной системе *in vitro*. В то же время рекомбинантный mGdA, полученный в клетках млекопитающих НЕК293, не оказывал достоверных эффектов на дифференцировку Treg. В целом мы впервые продемонстрировали прямые эффекты рекомбинантного гликоделина на дифференцировку Treg.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ № 19-29-04055 мк и в рамках государственного задания: АААА-А19–119112290007-7.

В работе использовано оборудование ЦКП “Исследования материалов и вещества” ПФИЦ УрО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tatarinov Yu.S. Pregnancy-specific beta-1-glycoprotein, placental-specific alpha-1- and alpha-2-microglobulins. // In: *Pregnancy Proteins: Biology, Chemistry and Clinical Application*. London. 1982. 463 p.
2. Posiseeva L.P., Gerasimov A.M., Petrova U.L. // *Problemy Reproduktsii (Russian Journal of Human Reproduction)*. 2020. V. 26. № 3. P. 1–22.
3. Cui J., Liu Y., Wang X. // *Frontier Immunology*. 2017. V. 8. P. 1685.
4. Bochkova M.S., Zamorina S.A., Timganova V.P., Khrantsov P.V., Rayev M.B. // *Medical Immunology (Russia)*. 2019. V. 21. № 4. P. 603–616.
5. Figueiredo A.S., Schumacher A. // *Immunology*. 2016. V. 148. № 1. P. 13–21.
6. Ochanuna Z., Geiger-Maor A., Dembinsky-Vaknin A., Karussis D., Tykocinski M.L., Rachmilewitz J. // *PLoS ONE*. 2010. V. 5. P. e12868.
7. Rachmilewitz J., Borovsky Z., Riely G.J., Miller R., Tykocinski M.L. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 14059–14065.
8. Mishan-Eisenberg G., Borovsky Z., Weber M.C., Gazit R., Tykocinski M.L., Rachmilewitz J. // *J. Immunol.* 2004. V. 173. P. 5524–5530.
9. Haltunen M., Kämäräinen M., Koistinen H. Glycodelin: a reproduction-related lipocalin // *Biochim. Biophys. Acta*. 2000. V. 1482. P. 149–156.

10. Vesela R., Dolezalova L., Pytlik R., Rychtrmocova H., Mareckova H., Trneny M. // Cellular Immunology. 2011. V. 271. P. 78–84.
11. Chereshev V.A., Timganova V.P., Zamorina S.A., Bochkova M.S., Khramtsov P.V., Kropaneva M.D., Raev M.B. // Dokl. Biol. Sci. 2017. V. 477. № 1. P. 248–251.
12. Martínez F.F., Knubel C.P., Sánchez M.C., Cervi L., Motrán C.C. // Eur. J. Immunol. 2012. V. 42. № 6. P. 1573–1584.
13. Poloski E., Oettel A., Ehrentaut S., Luley L., Costa S.D., Zenclussen A.C., Schumacher A. // Biol. Reprod. 2016. V. 94. № 5. P. 106.

THE ROLE OF RECOMBINANT GLYCODELIN IN THE DIFFERENTIATION OF REGULATORY T-LYMPHOCYTES

**K. Yu. Shardina^a, V. P. Timganova^a, M. S. Bochkova^{a,b}, P. V. Khramtsov^{a,b},
M. B. Rayev^{a,b}, and S. A. Zamorina^{a,b,#}**

^a Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (“IEGM UB RAS”) – a branch of the Federal State Budgetary Institution of the Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

^b Perm State University, Perm, Russian Federation,
Perm, Russian Federation

#e-mail: zamorina.sa@gmail.com

Presented by Academician of the RAS V.A. Chereshev

We studied the effect of recombinant glycodelin (GdA) on the level of T-regulatory lymphocytes (Treg) in a culture of activated CD4⁺ lymphocytes, while simultaneously assessing the proliferative status of cells. The study used recombinant GdA derived from *E. coli* and from HEK293 cells at concentrations of 0.2; 2 and 10 µg/mL. It was found that only a low concentration (0.2 µg/mL) of recombinant GdA of microbial origin reduced the number of proliferating CD4⁺ lymphocytes, as well as the number of Treg (CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}) in the experimental system in vitro.

Keywords: cells differentiation, glycodelin, pregnancy, regulatory T-lymphocytes