

УДК 579.61

## РОЛЬ РАСТВОРИМОГО HLA-G ПРИ ВЕРТИКАЛЬНОЙ ПЕРЕДАЧЕ ИНФЕКЦИИ *Toxoplasma gondii*<sup>1</sup>

© 2019 г. Н. F. Wang<sup>a, c, 2</sup>, Y. Z. Jiang<sup>a, 2</sup>, L. Q. Ren<sup>b</sup>, X. B. Liu<sup>a</sup>, H. X. Zhang<sup>a</sup>, X. M. Hu<sup>a, b, \*</sup><sup>a</sup>Department of Immunology, Binzhou Medical University, Yantai, Shandong Province, 264003 China<sup>b</sup>Medical and Pharmaceutical Research Center, Binzhou Medical University, Yantai, Shandong Province, 264003 China<sup>c</sup>Department of Immunology, Shandong College of Traditional Chinese Medicine, Yantai, Shandong Province, 264003 China

\*e-mail: xue-mei-hu@163.com

Поступила в редакцию 03.04.2018 г.

После доработки 14.07.2018 г.

Принята к публикации 17.07.2018 г.

Растворимый лейкоцитарный антиген G (sHLA-G) человека играет ключевую роль при беременности, взаимодействуя с ингибиторными рецепторами децидуальных естественных киллерных клеток (dNK) плацентарного барьера. С целью исследовать возможную роль sHLA-G во время беременности, отягощенной инфекцией *Toxoplasma gondii*, мы проанализировали концентрацию мышинового функционального гомолога sHLA-G, Qa-2, у инфицированных и не инфицированных *T. gondii* беременных мышей линии C57BL/6, а также содержание sHLA-G в культуральной среде линии BeWo. Кроме того, проведена оценка уровней экспрессии KIR2DL4 на клетках dNK человека и NKG2A у беременных мышей. Показано, что инфекция *T. gondii* приводит к значительному повышению уровней Qa-2 и NKG2A у беременных мышей. В клетках человека инфекция *T. gondii* также приводила к усилению экспрессии sHLA-G и KIR2DL4. При обработке антителами против sHLA-G уровень KIR2DL4, повышающийся при инфекции *T. gondii*, снижался. Таким образом, sHLA-G индуцирует усиление экспрессии KIR2DL4, что приводит к чрезмерной иммунологической толерантности. В результате *T. gondii* избегает иммунного ответа и передается плоду по механизму вертикальной трансмиссии, что может приводить к неблагоприятным исходам беременности.

**Ключевые слова:** sHLA-G, Qa-2, KIR2DL4, NKG2A, *Toxoplasma gondii*, вертикальная трансмиссия, неблагоприятный исход беременности

DOI: 10.1134/S0026898419020162

### ВВЕДЕНИЕ

*Toxoplasma gondii* – условно патогенный паразит, который может приводить к серьезным последствиям для беременных женщин и иммунокомпроментированных индивидов. Так, *T. gondii* входит в перечень возбудителей TORCH-группы [1]. При заражении токсоплазмой на первом триместре беременности паразит может передаться вертикально и вызвать самопроизвольный аборт, мертворождение или аномалии развития плода, в том числе повреждения мозга и глаз [2]. Однако иммунные механизмы, ассоциированные с вертикальной трансмиссией *T. gondii*, до сих пор не выяснены.

Взаимодействие между иммунными клетками децидуальной оболочки и трофобластом плода играет важную роль в нормально протекающей беременности. В формировании иммунологической толерантности при беременности задей-

ствован человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G), неклассический белок главного комплекса гистосовместимости класса I, экспрессия которого ограничена клетками экстраворсинчатого трофобласта [3, 4]. Растворимую форму HLA-G (sHLA-G) детектируют в амниотической жидкости, пуповинной крови, материнской сыворотке и плацентарной крови [5]. Из-за его широкого распространения исследователи предположили, что sHLA-G играет важную роль в формировании иммунной толерантности в качестве иммуносупрессивной молекулы [6]. В последнее время появляется все больше работ, посвященных изучению этого белка. sHLA-G можно детектировать в супернатантах эмбриональных культур после искусственного оплодотворения, он является важным маркером имплантации эмбриона [7]. Белок Qa-2 мыши считается гомологом человеческого HLA-G. Мышиный Qa-2, как и HLA-G у человека, вовлечен в регуляцию иммунитета в процессе эмбрионального развития [8].

<sup>1</sup> Статья представлена авторами на английском языке.

<sup>2</sup> Эти авторы внесли равный вклад в работу.

В ряде исследований показано, что концентрация sHLA-G в сыворотке крови беременных женщин падает при неблагоприятных исходах беременности, таких как преэклампсия и самопроизвольный аборт [9]. Отсюда следует, что sHLA-G связан с нормальным протеканием беременности. sHLA-G подавляет цитотоксичность децидуальных естественных киллеров (dNK) путем взаимодействия с ингибиторными рецепторами на их поверхности и таким образом формирует иммунную толерантность плацентарного барьера [10]. К упомянутым ингибиторным рецепторам относятся Ig-подобный рецептор 2DL4 клеток-киллеров (KIR2DL4) и гетеродимер CD94/NKG2A [11]; при этом HLA-G – единственный известный лиганд KIR2DL4, экспрессия которого в основном ограничена NK-клетками CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>dim</sup> (они в основном и образуют популяцию dNK) [12]. Взаимодействие sHLA-G и KIR2DL4 необходимо для трансдукции ингибиторного сигнального каскада [12].

Ранее нами показано, что экспрессия HLA-G трофобластом усиливается при инфекции *T. gondii* [13]. В данном исследовании мы сосредоточились на дальнейшем изучении *in vivo* и *in vitro* уровней экспрессии sHLA-G во время беременности, отягощенной инфекцией *T. gondii*, и роли sHLA-G в вертикальной передаче инфекции *T. gondii* от матери плоду.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Мышиная модель инфекции.** Исследование проведено на мышках линии C57BL/6 (самки в возрасте 6–8 недель и самцы в возрасте 8–10 недель). Беременных самок распределяли по двум группам случайным образом. Самкам из испытываемой группы на восьмые сутки беременности вводили внутривенно 400 тахизоитов *T. gondii* в 200 мкл стерильного фосфатного буфера (PBS), мышам из контрольной группы вводили равный объем стерильного буфера. У животных анализировали течение беременности и состояние плода.

**Использование мышей для исследования** были одобрены Комитетом по этике Медицинского колледжа Университета Биньчжоу (University of Binzhou Medical College Ethics Committee). Все эксперименты с животными проводили в соответствии с Национальными рекомендациями по содержанию животных, и все относящиеся к ним данные были одобрены для публикации Экспертным советом колледжа.

**Клеточная модель инфекции.** Клетки линии BeWo, используемые в качестве экспериментальной модели клеток трофобласта [14] в этом исследовании, были любезно предоставлены Институтом акушерства и гинекологии Университета Фудань (Institute of Gynecology and Obstetrics of Fudan

University, Китай). Клетки инфицировали штаммом *T. gondii* RH в соотношении 3 : 1 (паразиты : клетки) в течение 24 ч. К контрольной группе вместо инфекционного агента добавляли тот же объем PBS.

Клетки dNK изолировали из тканей, полученных от 20 пациенток, добровольно сделавших аборт в отделении акушерства и гинекологии Ян-тайской больницы китайской медицины и Ян-тайской больницы Юй Хуан Дин (Department of Obstetrics and Gynecology, Yantai Chinese Medicine Hospital and Yantai Yu Huang Ding Hospital, Китай). Аборты были сделаны в первом триместре, между 6 и 12 неделями беременности. Из полученных децидуальных тканей выделяли клетки dNK по методу, разработанному в нашей лаборатории. В соответствии со схемой исследования, очищенные dNK-клетки из каждого образца разделяли на 4 группы: контрольную, инфицированную, sHLA-G и анти-HLA-G-Ab (обработанную нейтрализующими sHLA-G антителами). Клетки из всех групп, кроме контрольной, смешивали с  $5.0 \times 10^6$  тахизоитов *T. gondii* в соотношении 5 : 1 (паразиты : клетки). Кроме того, клетки из sHLA-G-группы инкубировали с супернатантом клеток BeWo, а клетки из последней группы инкубировали с супернатантом клеток BeWo, предварительно обработанным антителами против HLA-G – anti-HLA-G mAb 87G (“Exbio”, Великобритания).

**Процедуры сбора образцов** для исследования были одобрены Комитетом по этике Медицинского колледжа Университета Биньчжоу (University of Binzhou Medical College Ethics Committee), от всех пациентов получили информированное согласие.

**Иммуноферментный анализ (ИФА).** Сыворотки, амниотические жидкости и супернатанты тканей плаценты собирали и анализировали на наличие цитокина Qa-2 при помощи коммерческого набора Mouse Qa-2 ELISA (“R&D”, США) согласно инструкциям производителя. Для определения содержания sHLA-G в супернатанте клеток BeWo использовали коммерческий набор sHLA-G ELISA (“BD Pharmingen”, США) в соответствии с инструкциями производителя. Для каждого эксперимента калибровочную кривую строили с использованием рекомбинантного цитокина. Каждое измерение проводили в трех повторах.

**Проточная цитофлуориметрия.** Для анализа клеток методом проточной цитофлуориметрии использованы следующие моноклональные антитела (mAb): конъюгированные с фикоэритрином (PE) анти-NKG2A, конъюгированные с PE/CY5.5 анти-NK1.1, (“eBioscience”, США), конъюгированные с PE анти-KIR2DL4 (“Biolegend”, США) и конъюгированные с PE/CY5.5 анти-CD56 (“BD Pharmingen”). Все образцы инкубировали с антителами в темноте в течение 30 мин при 4°C в соответствии

с инструкциями производителя. Двухцветный анализ клеточных популяций проводили на проточном цитофлуориметре FACS с программным обеспечением Cell Quest ("BD", США).

**Статистический анализ.** Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения SPSS версии 17.0. Для сравнения двух независимых групп использовали непарный *t*-критерий Стьюдента. При *p*-value < 0.05 или 0.01 результаты считались соответственно значимыми или высоко значимыми.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Инфекция T. gondii* приводит к неблагоприятному исходу беременности у мышей

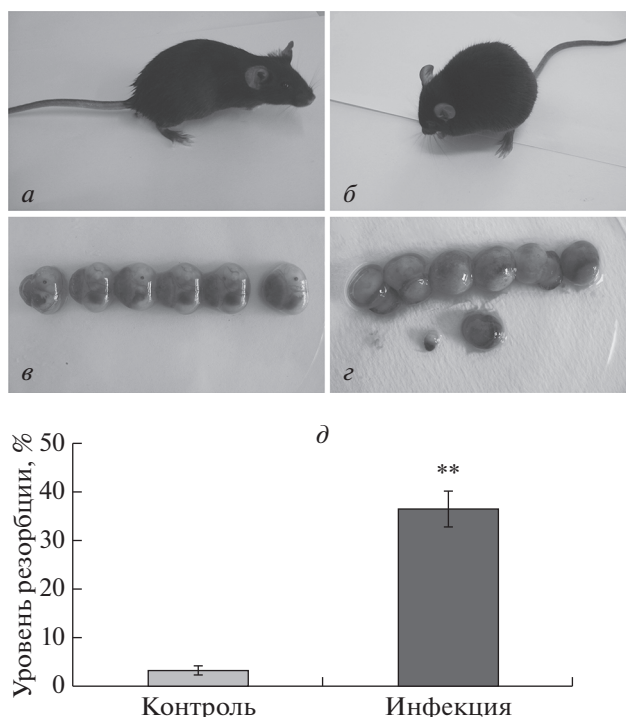
Для проведения исследования была разработана достоверная животная модель инфекции *T. gondii*. У беременных самок мышей из инфицированной группы (рис. 1б) наблюдали нарушение равновесия, согбенность и пилomotorный рефлекс. Плаценты были светлыми и ишемизированными, а плоды отличались неоднородностью размеров (рис. 1з). Фенотип беременных самок из контрольной группы был в норме (рис. 1а): плацента нормально снабжалась кровью, была кроваво-красного цвета, а размер эмбрионов был однородный (рис. 1в). Как показано на рис. 1д, частота резорбции плода в инфицированной группе была значительно выше, чем в контрольной (*p* < 0.001).

### *Инфекция T. gondii* приводит к повышению концентрации Qa-2 у беременных мышей

С целью проанализировать влияние инфекции токсоплазмы на продукцию белка Qa-2 оценивали содержание Qa-2 в сыворотке крови, амниотических жидкостях и супернатантах тканей плаценты у инфицированных и неинфицированных мышей методом ИФА. Как показано на рис. 2, уровень Qa-2 в этих трех биологических образцах в инфицированной группе значимо превышал таковой в контрольной ( $11.15 \pm 0.89$  нг/л против  $9.06 \pm 0.47$  нг/л в сыворотке,  $13.81 \pm 0.83$  нг/л против  $10.17 \pm 0.56$  нг/л в амниотической жидкости,  $12.61 \pm 1.21$  нг/л против  $7.99 \pm 0.56$  нг/л в супернатанте тканей плаценты, *p* < 0.05).

### *Инфекция T. gondii* приводит к усилению экспрессии NKG2A на клетках dNK мышей

С целью проверить, влияет ли инфекция *T. gondii* на уровень экспрессии NKG2A, ингибиторного рецептора для Qa-2 на dNK-клетках мыши, подсчитывали содержание клеток NKG2A<sup>+</sup> в общем пуле клеток плаценты при помощи проточной

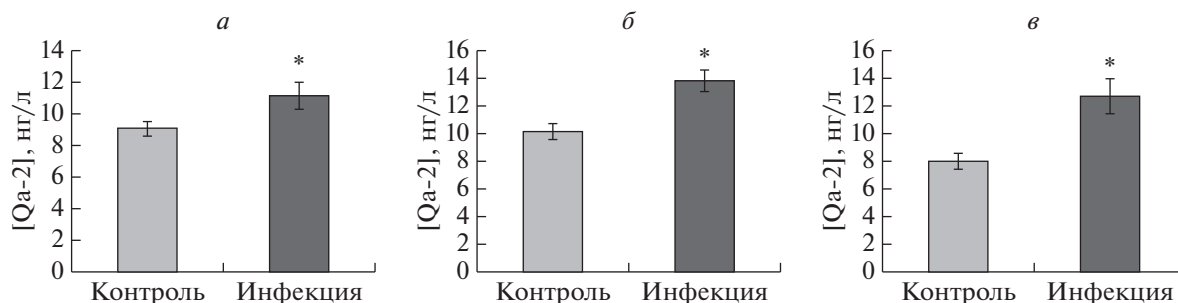


**Рис. 1.** Влияние инфекции *T. gondii* на беременных мышей и исход беременности. Беременным самкам из инфицированной группы на восьмые сутки беременности вводили тахизоиты (внутрибрюшинно), самкам из контрольной группы вводили PBS. Мышей усыпляли через 7 суток после инфицирования и анализировали исход беременности и состояние плодов. а – Неинфицированные беременные самки из контрольной группы выглядят активными. б – У инфицированных токсоплазмой беременных мышей нарушено поведение и появилась согбенность и взъерошенность. в – Плоды самок из контрольной группы одного размера и нормально развиты; амниотическая жидкость прозрачная; плаценты кроваво-красные, с нормальным кровоснабжением. з – Плоды самок из инфицированной группы разного размера, есть уже умершие; амниотическая жидкость мутная; плаценты светлые и ишемизированные. д – Частота резорбции плода в инфицированной группе значительно выше, чем в контрольной (\*\**p* < 0.001).

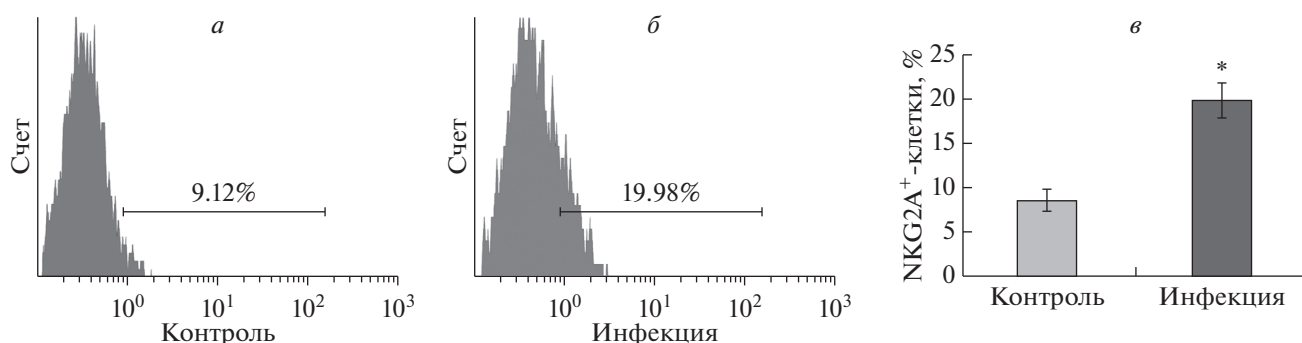
цитометрии. Процент клеток NKG2A<sup>+</sup> в плацентах составил  $19.78 \pm 1.81\%$  в инфицированной группе и только  $8.59 \pm 1.25\%$  в контрольной группе (*p* < 0.05) (рис. 3).

### *Инфекция T. gondii* приводит к увеличению продукции sHLA-G клетками BeWo

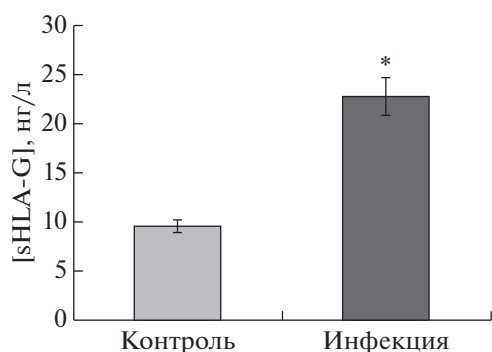
С целью проанализировать влияние инфекции токсоплазмы на уровень синтеза sHLA-G оценивали концентрацию sHLA-G в супернатантах инфицированных *T. gondii* и неинфицированных клеток BeWo методом ИФА. Как показано на рис. 4, уровень синтеза sHLA-G значительно возрос в инфицированной группе по сравнению с



**Рис. 2.** Концентрации Qa-2 в сыворотке, амниотической жидкости и супернатанте тканей плаценты беременной мыши. У усыпленных мышей из инфицированной *T. gondii* и контрольной групп собирали сыворотку крови, амниотическую жидкость и супернатант тканей плаценты и измеряли в них концентрацию Qa-2 с использованием коммерческого набора для ИФА. Уровни Qa-2 в сыворотке (а), амниотической жидкости (б) и супернатанте тканей плаценты (в) были значимо повышены в инфицированной группе по сравнению с контрольной (\* $p < 0.05$ ).



**Рис. 3.** Экспрессия NKG2A на dNK-клетках беременных мышей. Клеточные суспензии плацент усыпленных беременных мышей из контрольной и инфицированной групп получали путем разрезания ткани на мелкие кусочки, осаждения и фильтрации через стерильный сетчатый фильтр. Перед анализом образцов эритроциты в клеточной суспензии лизировали. Процентное содержание NKG2A<sup>+</sup>-клеток в контрольной группе составило  $8.59 \pm 1.25\%$  от общего числа клеток (а), а в инфицированной группе  $19.78 \pm 1.81\%$  (б). в – По сравнению с контрольной группой, экспрессия NKG2A на dNK-клетках мышей из инфицированной группы значимо возросла (\* $p < 0.05$ ).



**Рис. 4.** Экспрессия sHLA-G в супернатантах клеток BeWo. Клетки BeWo инфицировали штаммом *T. gondii* RH (инфицированная группа) или добавляли PBS (контрольная группа). Через 24 ч супернатанты клеток BeWo собирали и оценивали в них концентрацию sHLA-G. Концентрация sHLA-G в супернатанте инфицированных клеток по сравнению с контрольной группой была значимо выше (\* $p < 0.05$ ).

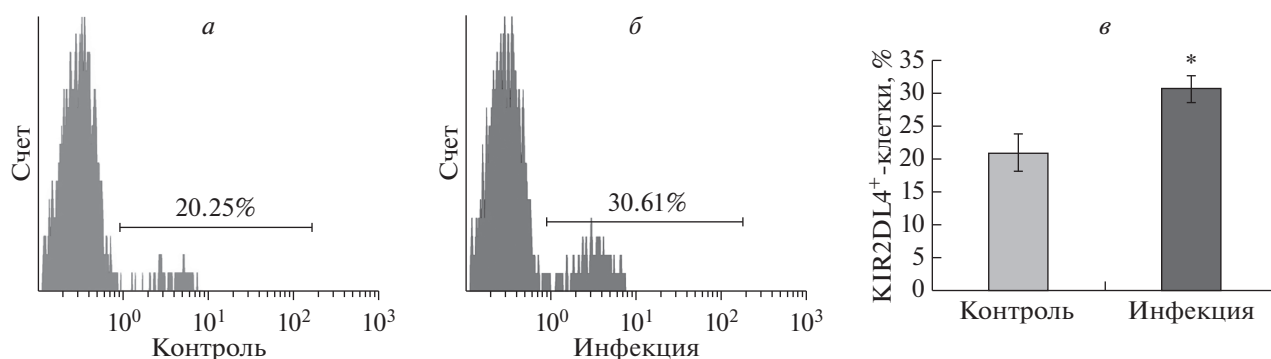
контрольной группой ( $22.82 \pm 1.82$  нг/л против  $9.56 \pm 0.58$  нг/л,  $p < 0.05$ ).

#### *Инфекция *T. gondii* ведет к усилению экспрессии KIR2DL4 на клетках dNK человека*

С целью выяснить, влияет ли инфекция *T. gondii* на уровень экспрессии KIR2DL4, ингибиторного рецептора к sHLA-G на dNK-клетках человека, детектировали клетки KIR2DL4<sup>+</sup> при помощи проточной цитометрии. Согласно результатам эксперимента, процент KIR2DL4<sup>+</sup>-клеток составил  $30.66 \pm 2.03\%$  в инфицированной группе и только  $20.94 \pm 2.89\%$  в контрольной группе ( $p < 0.05$ ) (рис. 5).

#### *Влияние sHLA-G на экспрессию KIR2DL4 в условиях инфекции *T. gondii**

С целью оценить влияние sHLA-G на экспрессию KIR2DL4 в инфицированных *T. gondii* dNK-



**Рис. 5.** Экспрессия KIR2DL4 на dNK-клетках человека. Клетки dNK изолировали из тканей плаценты, полученных из абортного материала. Аборты были сделаны донорами тканей добровольно в первом триместре беременности. После 12 ч культивирования dNK-клетки смешивали с тахизоитами *T. gondii* в инфицированной группе или PBS в контрольной группе; через 24 ч клетки собирали для анализа методом проточной цитометрии. Процентное содержание клеток KIR2DL4<sup>+</sup> составило  $20.94 \pm 2.89\%$  в контрольной группе (а) и  $30.66 \pm 2.03\%$  в инфицированной группе (б). в – По сравнению с контрольной группой уровень экспрессии KIR2DL4 на dNK-клетках в инфицированной группе было значимо выше (\* $p < 0.05$ ).

клетках человека ее сравнили в присутствии и в отсутствие супернатанта клеток BeWo. Как показано на рис. 6, уровень экспрессии KIR2DL4 оказался значимо выше в sHLA-G-группе (в присутствии супернатанта BeWo) по сравнению с просто инфицированной группой клеток ( $42.12 \pm 2.86\%$  против  $29.96 \pm 2.03\%$ ,  $p < 0.05$ ). Затем измеряли уровень экспрессии KIR2DL4 на инфицированных *T. gondii* dNK-клетках в присутствии супернатанта клеток BeWo, предварительно обработанного mAb 87G против HLA-G. Согласно полученным данным, доля клеток KIR2DL4<sup>+</sup> составила  $30.38 \pm 3.23\%$  в этой группе, что значительно ниже, чем в sHLA-G-группе ( $p < 0.05$ ) (рис. 6). Таким образом, впервые показано, что sHLA-G может активировать экспрессию KIR2DL4 на поверхности dNK-клеток человека в условиях инфекции *T. gondii*.

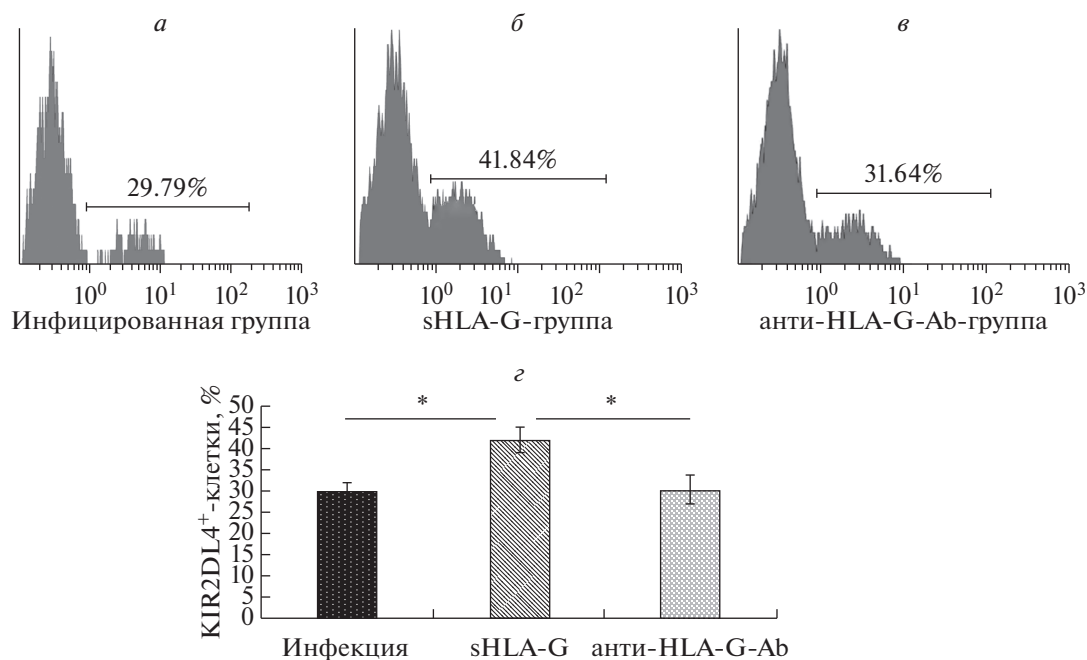
## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основная патогенная форма *T. gondii* представлена тахизоитами, которые могут инфицировать клетки трофобласта в составе плаценты и таким образом передаваться плоду и приводить к неблагоприятным исходам беременности [15]. С целью выяснить возможные механизмы, ассоциированные с аномальным протеканием беременности при инфекции *T. gondii*, мы прежде всего разработали мышиную модель этой инфекции. Как можно видеть на рис. 1, в инфицированной группе частота резорбции эмбрионов была значимо выше, чем в контрольной здоровой группе. Таким образом, мы убедились, что в этой мышинной модели инфекция *T. gondii* приводит к аномальным исходам беременности.

Ранее показано, что у инфицированных вирусом иммунодефицита человека или вирусом гепа-

тита пациентов повышен уровень sHLA-G, что приводит к развитию иммунной толерантности и облегчает ускользание вируса от иммунного ответа [16–18]. В других исследованиях показано, что и больных малярией уровень sHLA-G повышен, что позволяет патогенам внедряться в иммунную систему хозяина [19, 20]. Нами обнаружено, что уровень продукции Qa-2 у зараженных *T. gondii* мышей значительно выше, чем у животных в контрольной группе. По результатам эксперимента *in vitro* также выявлены повышенные уровни экспрессии sHLA-G клетками BeWo, инфицированными *T. gondii*, по сравнению с неинфицированными клетками. Эти результаты согласуются с данными [21], что содержание sHLA-G в амниотической жидкости инфицированных *T. gondii* плодов значительно выше, чем у неинфицированных. Также сообщалось [22] о повышенной концентрации sHLA-G в амниотической жидкости при преждевременных родах, сопряженных с внутриутробной инфекцией. Основываясь на этих данных, мы предположили, что sHLA-G участвует в регуляции иммунного ответа хозяина против внутриутробной инфекции *T. gondii*.

Механизм поддержания иммунной толерантности с участием sHLA-G во время беременности заключается во взаимодействии белка с ингибиторными рецепторами на поверхности dNK-клеток и подавлении цитотоксичности натуральных киллеров [9]. KIR2DL4, хорошо изученный рецептор sHLA-G на клетках dNK человека, непосредственно контактирует с трофобластом и играет важную роль в формировании плацентарного барьера во время беременности [12, 23]. Мы проанализировали уровни экспрессии NKG2A у инфицированных *T. gondii* и неинфицированных беременных мышей линии C57BL/6 и уровни экспрессии KIR2DL4 на dNK-клетках человека.



**Рис. 6.** Экспрессия KIR2DL4 в условиях инфекции *T. gondii*. Очищенные dNK-клетки случайным образом распределяли по 4 группам: контрольную, инфицированную, sHLA-G и анти-HLA-G-Ab. В sHLA-G-группе в дополнение к тахизоитам *T. gondii* к dNK-клеткам добавляли супернатант клеток BeWo, а в анти-HLA-G-Ab-группе – супернатант клеток BeWo, предварительно обработанный mAb 87G против HLA-G. Процент клеток KIR2DL4<sup>+</sup> составил 29.96 ± 2.03% в инфицированной группе (а), 42.12 ± 2.86% в sHLA-G-группе (б) и 30.38 ± 3.23% в анти-HLA-G-Ab-группе (в). z – Уровень экспрессии KIR2DL4 в sHLA-G-группе был значительно выше, чем в инфицированной (\**p* < 0.05) и в анти-HLA-G-Ab-группе (\**p* < 0.05).

Показано, что экспрессия рецепторов NKG2A и KIR2DL4 усиливается при инфекции *T. gondii*, что согласуется с результатами, полученными нами ранее [24]. С целью выяснить роль sHLA-G в неблагоприятных исходах беременности, ассоциированных с инфекцией *T. gondii*, мы измерили уровень экспрессии KIR2DL4 на инфицированных *T. gondii* dNK-клетках человека в присутствии супернатанта клеток BeWo, предварительно обработанного mAb 87G против sHLA-G (анти-HLA-G-Ab-группа). Согласно полученным результатам, доля клеток KIR2DL4<sup>+</sup> в этой группе оказалась значительно ниже, чем в sHLA-G-группе. Следовательно, обработка антителом против sHLA-G противодействует усилению экспрессии KIR2DL4, вызванному инфекцией *T. gondii*.

Полученные результаты можно рассматривать как подтверждение гипотезы, что sHLA-G играет важную роль в поддержании нормального хода беременности, способствуя активации экспрессии KIR2DL4, ингибиторного рецептора на dNK-клетках. Однако sHLA-G может участвовать и в повреждении плода в условиях инфекции *T. gondii*. Таким образом, поддержание баланса между борьбой с инфекцией и обеспечением иммунной толерантности по отношению к плоду критично для благоприятного исхода беременности у женщин, инфицированных патогенами. В качестве

иммуносупрессивной молекулы sHLA-G подавляет цитотоксичность dNK-клеток во время инфекции токсоплазмой, так как повышение продукции sHLA-G может индуцировать возрастание уровня экспрессии KIR2DL4, ингибиторного рецептора dNK-клеток. Повышение продукции sHLA-G и супрессия dNK-клеток могут привести к развитию избыточной иммунной толерантности, что используется *T. gondii* для ускользания от иммунной системы и эффективного проникновения через плаценту. Таким образом, избыточная экспрессия sHLA-G приводит к инфицированию плода по механизму вертикальной трансмиссии и последующим неблагоприятным исходам беременности, отягощенной инфекцией *T. gondii*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами показано, что инфекция *T. gondii* ассоциирована с повышенной продукцией sHLA-G у беременных. Избыточный sHLA-G индуцирует повышение уровня KIR2DL4, ингибиторного рецептора, экспрессированного на NK-клетках. Это способствует тому, что *T. gondii* ускользает от иммунного ответа, реализует путь вертикальной трансмиссии и приводит к неблагоприятному исходу беременности. В результате проведенного исследования получено механистическое объяс-

нение участия sHLA-G в вертикальной трансмиссии *T. gondii* и стал понятнее молекулярный механизм, лежащий в основе аномального течения беременности при инфекции *T. gondii*.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа получила финансовую поддержку Национального фонда естественных наук Китая (National Natural Science Foundation of China, project 81171591 и 81672049) и Фонда естественных наук провинции Шаньдун (Natural Science Foundation of the Shandong Province, project no. ZR2014HP010).

### ВКЛАД АВТОРОВ В РАБОТУ

ХМН, НФВ и YZJ планировали исследование, собирали данные, проводили статистический анализ и отвечали за подготовку рукописи. LQR рецензировал схему эксперимента и редактировал рукопись. ХВЛ и НХЗ внесли вклад в анализ данных и подготовку рукописи.

Все авторы прочитали и одобрили финальную версию статьи.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mahalakshmi B., Therese K.L., Devipriya U., Pushpalatha V., Margarita S., Madhavan H.N. (2010) Infectious aetiology of congenital cataract based on TORCHES screening in a tertiary eye hospital in Chennai, Tamil Nadu, India. *Indian J. Med. Res.* **131**, 559–564.
- Bssieres M.H., Berrebi A., Rolland M., Bloom M.C., Roques C., Cassaing S., Courjault C., Séguéla J.P. (2001) Neonatal screening for congenital toxoplasmosis in a cohort of 165 women infected during pregnancy and influence of in utero treatment on the results of neonatal tests. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **94**, 37–45.
- Abbasi M., Kowalewska-Grochowska K., Bahar M.A., Kilani R.T., Winkler-Lowen B., Guilbert L.J. (2003) Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.* **188**, 608–616.
- Tarrade A., Lai Kuen R., Malassine A. (2001) Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta. *Lab. Invest.* **81**, 1199–1211.
- Sipak-Szmigiel O., Ronin-Walknowska E., Cybulski C., Plonka T., Lubiński J. (2007) Antigens HLA-G, sHLA-G and sHLA-class I in reproductive failure. *Folia Histochem. Cytobiol.* **45**, S137–141.
- Pfeiffer K.A., Rebmann V., Pässler M., van der Ven K., van der Ven H., Krebs D., Grosse-Wilde H. (2000) Soluble HLA levels in early pregnancy after *in vitro* fertilization. *Hum. Immunol.* **61**, 559–564.
- Rebmann V., Switala M., Eue I., Grosse-Wilde H. (2010) Soluble HLA-G is an independent factor for the prediction of pregnancy outcome after ART: a German multi-centre study. *Hum. Reprod.* **25**, 1691–1698.
- Lee M., Choi B., Kwon H.J., Shim J.A., Park K.S., Lee E.S., Sohn S. (2010) The role of Qa-2, the functional homolog of HLA-G, in a Behcet's disease-like mouse model induced by the herpes virus simplex. *J. Inflamm. (Lond)*. **7**, 31–42.
- Lindaman A., Dowden A., Zavazava N. (2006) Soluble HLA-G molecules induce apoptosis in natural killer cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* **56**, 68–76.
- Park G.M., Lee S., Park B., Kim E., Shin J., Cho K., Ahn K. (2004) Soluble HLA-G generated by proteolytic shedding inhibits NK-mediated cell lysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **3**, 606–611.
- Riley J.K., Yokoyama W.M. (2008) NK cell tolerance and the maternal-fetal interface. *Am. J. Reprod. Immunol.* **59**, 371–387.
- Morandi F., Ferretti E., Castriconi R., Dondero A., Piretto A., Bottino C., Pistoia V. (2011) Soluble HLA-G dampens CD94/NKG2A expression and function and differentially modulates chemotaxis and cytokine and chemokine secretion in CD56<sup>bright</sup> and CD56<sup>dim</sup> NK cells. *Blood*. **118**, 5840–5850.
- Zhao M., Zhang R., Xu X., Liu Y., Zhang H., Zhai X., Hu X. (2013) IL-10 reduces levels of apoptosis in *Toxoplasma gondii*-infected trophoblasts. *PLoS One*. **8**, e56455.
- Barbosa B.F., Silva D.A., Costa I.N., Mineo J.R., Ferrero E.A. (2008) BeWo trophoblast cell susceptibility to *Toxoplasma gondii* is increased by interferon-gamma, interleukin-10 and transforming growth factor-beta1. *Clin. Exp. Immunol.* **151**, 536–545.
- Cowen D., Wolf A. (1950) Experimental congenital toxoplasmosis II. Transmission of toxoplasmosis to the placenta and fetus following vaginal infection in the pregnant mouse. *J. Exp. Med.* **92**, 403–416.
- Weng P.J., Fu Y.M., Ding S.X., Xu D.P., Lin A., Yan W.H. (2011) Elevation of plasma soluble human leukocyte antigen-G in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hum. Immunol.* **72**, 406–411.
- Celsi F., Catamo E., Kleiner G., Tricarico P.M., Vuch J., Crovella S. (2013) HLA-G/C, miRNAs, and their role in HIV infection and replication. *Biomed. Res. Int.* **2013**, 693646.
- Thibodeau V., Lajoie J., Labbé A.-C., Zannou M.D., Fowke K.R., Alary M., Poudrier J., Roger M. (2011) High level of soluble HLA-G in the female genital tract of Beninese commercial sex workers is associated with HIV-1 infection. *PLoS One*. **6**, e25185.
- d'Almeida T.C., Sadissou I., Milet J., Cottrell G., Mondière A., Avokpaho E., Gineau L., Sabbagh A., Massougbdji A., Moutairou K., Donadi E.A., Favier B., Carosella E., Moreau P., Rouas-Freiss N., Courtin D., Garcia A. (2017) Soluble human leukocyte antigen-G during pregnancy and infancy in Benin: mother/child resemblance and association with the risk of malaria infection and low birth weight. *PLoS One*. **12**, e0171117.
- Sadissou I., d'Almeida T., Cottrell G., Luty A., Krawice-Radanne I., Massougbdji A., Moreau P., Moutairou K., Malar J. (2014) High plasma levels of HLA-G are associated with low birth weight and with an increased risk of malaria in infancy. *Malar. J.* **13**, 312–319.

21. Robert-Gangneux F., Gangneux J.P., Vu N., Jaillard S., Guiguen C., Amiot L. (2011) High level of soluble HLA-G in amniotic fluid is correlated with congenital transmission of *Toxoplasma gondii*. *Clin. Immunol.* **138**, 129–134.
22. Kusanovic J.P., Romero R., Jodicke C., Mazaki-Tovi S., Vaisbuch E., Erez O., Mittal P., Gotsch F., Chaiworapongsa T., Edwin S.S., Pacora P., Hassan S.S. (2009) Amniotic fluid soluble human leukocyte antigen-G in term and preterm parturition, and intra-amniotic infection/inflammation. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* **22**, 1151–1166.
23. Salcedo M., Bouso P., Ljunggren H.G., Kourilsky P., Abastado J.P. (1998) The Qa-1b molecule binds to a large subpopulation of murine NK cells. *Eur. J. Immunol.* **28**, 4356–4361.
24. Xu X., Fu Q., Zhang Q., Zhao M., Gao Z., Liu X., Liu Y., Hu X. (2013) Changes of human decidual natural killer cells cocultured with YFP-*Toxoplasma gondii*: implications for abnormal pregnancy. *Fertil. Steril.* **99**, 427–432.

## THE ROLE OF SOLUBLE HLA-G IN THE VERTICAL TRANSMISSION OF *Toxoplasma gondii*

H. F. Wang<sup>1,3</sup>, Y. Z. Jiang<sup>1</sup>, L. Q. Ren<sup>2</sup>, X. B. Liu<sup>1</sup>, H. X. Zhang<sup>1</sup>, X. M. Hu<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology, Binzhou Medical University, Yantai, Shandong Province, 264003 China

<sup>2</sup>Medical and Pharmaceutical Research Center, Binzhou Medical University, Yantai, Shandong Province, 264003 China

<sup>3</sup>Department of Immunology, Shandong College of Traditional Chinese Medicine, Yantai, Shandong Province, 264003 China

\*e-mail: xue-mei-hu@163.com

Soluble human leukocyte antigen G (sHLA-G) plays a key role in pregnancy through interaction with decidual natural killer (dNK) cell inhibitory receptors at the maternal–fetal interface. To demonstrate the possible role of sHLA-G during the pregnancy with *Toxoplasma gondii* infection, we compared the concentration of a murine functional homolog of sHLA-G, Qa-2, in *T. gondii* infected and non-infected pregnant C57BL/6 mice, and that of sHLA-G in BeWo culture supernatant. In addition, the levels of KIR2DL4 expressed on human dNK cells and NKG2A in pregnant mice were evaluated. We showed that *T. gondii* infection resulted in significant increase in the level of Qa-2 and NKG2A in pregnant mice. sHLA-G and KIR2DL4 in human samples were also significantly upregulated under the condition of *T. gondii* infection. The further treatment with sHLA-G antibody could reduce the expression level of KIR2DL4 which was upregulated by *T. gondii* infection. In summary, sHLA-G could upregulate the expression level of KIR2DL4 which lead to excessive immunological tolerance, and further contributed to *T. gondii* immunity escaping and affecting fetus via vertical transmission which may lead to adverse outcomes.

**Keywords:** sHLA-G, Qa-2, KIR2DL4, NKG2A, *Toxoplasma gondii*, vertical transmission, adverse pregnant outcome