

Цель исследования — оценка влияния МВ клеток линии NK-92 на пролиферативную и миграционную активность клеток трофобласта линии Jeg-3.

Материалы и методы. Источником МВ явились естественные киллеры линии NK-92. Клетки инкубировали в течение 24 ч при 37 °С и 5% CO₂ в концентрации 400×10³/мл культуральной среды. Выделение МВ производили при помощи метода дифференциального центрифугирования. Для этого содержимое флаконов центрифугировали при 300 g, 22 °С 10 мин для осаждения клеток. Затем супернатанты последовательно центрифугировали при 500 g, 4 °С 10 мин, 9900 g, 10 °С 11 мин и 19 800 g, 10 °С 20 мин. Полученный осадок МВ был дважды отмыт раствором Хенкса без Ca²⁺ и Mg²⁺ и осажён при 19 800 g, 10 °С 20 мин. Количество белка в пробе МВ измеряли по методу Брэдфорда. Влияние МВ на пролиферативную активность клеток трофобласта линии Jeg-3 оценивали при помощи культурального метода и спектрофотометрического анализа. После суточной культивации клеток трофобласта с МВ естественных киллеров клетки линии Jeg-3 окрашивались раствором кристаллического фиолетового, после чего измеряли оптическую плотность раствора с помощью микропланшетного ридера. Миграционную активность оценивали при совместном культивировании клеток трофобласта и МВ в 24-луночных планшетах с использованием вставок с поликарбонатными фильтрами. После суточной культивации клетки фиксировали, окрашивали гематоксилином Майера и фотографировали со стороны нижней камеры микроскопом AxioObserver Z1 (Carl Zeiss). Все эксперименты проводили не менее трёх раз. Статистическую обработку полученных данных производили с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни.

Результаты. Культивирование МВ линии NK-92 с клетками линии Jeg-3 приводило к снижению пролиферативной активности клеток трофобласта. При совместном культивировании МВ с клетками трофобласта отмечалось усиление их миграции на нижнюю сторону вставки с поликарбонатными фильтрами.

Заключение. Микровезикулы клеток линии NK-92 изменяют функциональную активность клеток линии Jeg-3 за счёт модулирования их пролиферативной и миграционной активностей. Таким образом, МВ естественных киллеров способны участвовать в межклеточных коммуникациях, играющих важную роль в реализации как физиологических, так и патологических состояний беременности.

Литература

1. Wen C. et al. Biological roles and potential applications of immune cell-derived extracellular vesicles // *J. Extracell. Vesicles*. — 2017. — Vol. 6. — №1. — P. 1400370.
2. Markova K.L. et al. Microvesicles of leukocyte origin // *Annals of the Russian academy of medical sciences*. — 2018. — Vol. 73. — №6. — P. 378–387.
3. Sedgwick A.E., D'Souza-Schorey C. The biology of extracellular microvesicles // *Traffic*. — 2018. — Vol. 19. — №5. — P. 319–327.
4. Stahl P.D., Raposo G. Extracellular Vesicles: Exosomes and Microvesicles, Integrators of Homeostasis // *Physiology (Bethesda)*. — 2019. — Vol. 34. — №3. — P. 169–177.
5. Jong A.Y. et al. Large-scale isolation and cytotoxicity of extracellular vesicles derived from activated human natural killer cells // *J. Extracell. Vesicles*. — 2017. — Vol. 6. — №1. — P. 1294368.
6. Sokolov D.I. et al. Phenotypic and Functional Characteristics of Microvesicles Produced by Natural Killer Cells // *Medical Immunology (Russia)*. — 2019. — Vol. 21. — №4. — P. 669–688.

РЕЦЕПТОРНЫЙ ПРОФИЛЬ НК-КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ПРИСУТСТВИИ КЛЕТОК ТРОФОБЛАСТА И ЦИТОКИНОВ IL-15 И IL-18*

Гребенкина П.В., лаборант-исследователь;
Давыдова А.А., мл. научный сотрудник, лаборант-исследователь; **Тыщук Е.В.**, лаборант-исследователь; **Ковалева А.А.**, лаборант-исследователь; **Ошколова А.А.**, лаборант-исследователь.

Руководители: **В.А. Михайлова**, канд. биол. наук;
Д.И. Соколов, доц., докт. биол. наук.

НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, лаборатория межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий.

E-mail: grebenkinap@gmail.com;
моб. тел.: +7 (905) 802 8558.

Децидуальные НК-клетки взаимодействуют с клетками трофобласта. Установлено снижение интенсивности экспрессии CD56 и NKG2C НК-клетками в присутствии клеток трофобласта *in vitro*. Присутствие IL-15 способствовало увеличению количества NKG2C+-клеток и снижению экспрессии CD56 в кокультуре относительно монокультуры НК-клеток. Добавление IL-18 снижало числа NKG2C+- и NKp44+-клеток, но повышало интенсивность экспрессии NKp44 в кокультуре относительно монокультуры. Интенсивность экспрессии CD56 снижается.

Ключевые слова: НК-клетки, трофобласт, беременность, цитокины.

Decidual NK-cells interact with trophoblast cells in a cytokine microenvironment. A reduced intensity of CD56 and NKG2C expression by NK-cells in the presence of trophoblast cells in vitro was found. The presence of IL-15 led to an increased number of NKG2C+ cells and a decreased CD56 expression in culture relative to the NK-cells monoculture. The addition of IL-18 reduced the numbers of NKG2C+, NKp44+ cells, but increased the intensity of NKp44 expression in culture relative to monoculture. The intensity of CD56 expression decreased.

Keywords: NK cells, trophoblast, pregnancy, cytokines.

Актуальность. В эндометрии большую часть лейкоцитов составляют естественные киллеры (НК-клетки) [1]. Одним из источников пула НК-клеток децидуальной оболочки являются НК-клетки, мигрирующие из периферической крови (pNK-клетки) [2]. На их поверхности экспрессировано множество рецепторов, опосредующих их цитотоксичность. Децидуальные НК-клетки взаимодействуют с генетически чужеродными клетками трофобласта. Помимо межклеточных взаимодействий на децидуальные НК-клетки могут оказывать влияние цитокины, в том числе IL-15 и IL-18 [3, 4]. Изменение баланса акти-

* Работа поддержана грантом РФФИ №20-015-00014, государственной программой ААА-А-19-119021290116-1.

вационных и ингибиторных рецепторов может приводить к нарушениям течения беременности [5].

Цель исследования — оценка влияния клеток трофобласта линии Jeg-3 и цитокинов IL-15, IL-18 на экспрессию ингибирующих и активирующих рецепторов рНК-клетками.

Материалы и методы. В исследование включена 21 женщина репродуктивного возраста (29±6 лет) без острых воспалительных заболеваний и вне обострений хронических заболеваний во второй фазе менструального цикла. За сутки до эксперимента в 96-луночный планшет помещали клетки линии Jeg-3 по 20 тыс. клеток в лунку в 100 мкл полной культуральной среды DMEM. На следующий день из периферической крови выделяли мононуклеары (Мн) при помощи центрифугирования в градиенте плотности фикола («Биолот», РФ). Затем Мн помещали в планшет к клеткам линии Jeg-3 или в пустые лунки в количестве 100 тыс. клеток в 100 мкл полной культуральной среды DMEM с добавлением IL-2 («Ронколейкин», «Биотех», РФ). В часть лунок вносили IL-15 или IL-18 (Sigma Aldrich, США). Клетки инкубировали в течение 96 ч. Анализировали изменения в условиях культивирования NK-клеток без клеток трофобласта (монокультура), с клетками трофобласта (кокультура), без и в присутствии цитокинов IL-15 или IL-18. С помощью проточного цитометра BD FACS Canto II (BD, США) оценивали экспрессию NK-клетками периферической крови рецепторов CD45, CD3, CD56, CD14, KIR3DL1, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DS4, NKp44, CD215, CD122, CD127, NKG2D (BD, USA), KIR2DL1, NKG2C (R&D, USA). Полученные данные обрабатывали с помощью программы GraphPad Prism 8, используя непараметрический критерий Вилкоксона.

Результаты. Сокультивирование рНК-клеток с клетками трофобласта линии Jeg-3 приводило к снижению интенсивности экспрессии CD56 ($p < 0,0001$) и активационного рецептора NKG2C ($p = 0,0042$) рНК-клетками по сравнению с монокультурой.

В присутствии IL-18 повышалось количество NKG2C+ ($p = 0,0028$) и NKp44+ ($p < 0,0001$) рНК-клеток в кокультуре по сравнению с монокультурой, интенсивность экспрессии NKp44 рНК-клетками повышалась ($p < 0,0001$). В то же время интенсивность экспрессии CD56 рНК-клетками снижалась ($p < 0,0001$).

В присутствии IL-15 культивирование рНК-клеток и клеток трофобласта линии Jeg-3 приводило к увеличению количества NKG2C+ -клеток ($p = 0,0088$) и снижению интенсивности экспрессии CD56 ($p < 0,0001$) по сравнению с монокультурой.

Заключение. Выявленные изменения фенотипа рНК-клеток указывают на сложный механизм формирования регуляторного статуса NK-клеток в отсутствие заболевания. Моделирование взаимодействия рНК-клеток с клетками трофобласта *in vitro* позволит дополнить подходы к диагностике и терапии репродуктивных неудач.

Литература

1. Erlebacher A. Immunology of the maternal-fetal interface // Annual review of immunology. — 2013. — Vol. 31. — P. 387–411.5.
2. Liu Y. et al. Decidual Natural Killer Cells: A Good Nanny at the Maternal-Fetal Interface During Early Pregnancy // Frontiers in Immunology. — 2021. — Vol. 12.
3. Li J., Li Y., Zhou X., Wei L. et al. Upregulation of IL-15 in the placenta alters trophoblasts behavior contributing to gestational diabetes mellitus // Cell. Biosci. — 2021. — Vol. 11. — №1. — P. 33.

4. Tokmadzic V.S., Tsuji Y., Bogovic T. et al. IL-18 is present at the maternal-fetal interface and enhances cytotoxic activity of decidual lymphocytes // Am. J. Reprod. Immunol. — 2002. — Vol. 48. — №4. — P. 191–200.

5. Айламазян Э.К., Степанова О.И., Сельков С.А., Соколов Д.И. Клетки иммунной системы матери и клетки трофобласта: «конструктивное сотрудничество» ради достижения совместной цели // Вестник Российской академии медицинских наук. — 2013. — Т. 11. — С. 12–21.

РЕПРОДУКТИВНАЯ ФУНКЦИЯ ЖЕНЩИН С ПЕРЕНЕСЁННОЙ НЕРАЗВИВАЮЩЕЙСЯ БЕРЕМЕННОСТЬЮ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЭТИОЛОГИИ В I ТРИМЕСТРЕ

Гринь Е.А.¹, врач акушер-гинеколог.

Руководитель: **Е.И. Новиков**^{2,3}, докт. мед. наук, проф.,
ведущий научный сотрудник.

¹Родильный дом №13, г. Санкт-Петербург;

²НИИ скорой помощи им. И.И. Джanelидзе;

³Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова,
кафедра акушерства-гинекологии.

E-mail: kate_03-95@mail.ru; моб. тел.: +7 (995) 27 8125.

Проведены комплексная диагностика и лечение у 80 женщин с неразвивающейся беременностью (НБ) I триместра бактериальной этиологии. После этого беременность наступила в 59 случаях (73,8%). У 16 женщин (20%) был выявлен угрожающий выкидыш I триместра, у 14 (15,5%) — угрожающие ранние преждевременные роды. У семи женщин (8,8%) беременность закончилась преждевременными родами на сроках 34/35 и 35/36 нед, у 52 (65%) — срочными родами. Оперативным путём были родоразрешены 17 пациенток (21,3%).

Ключевые слова: невынашивание беременности, кольпит, бактериальный вагиноз, хронический эндометрит, беременность и роды.

A comprehensive diagnosis and treatment were carried out in 80 women with undeveloped pregnancy (NB) of the first trimester of bacterial etiology. After that, pregnancy occurred in 59 (73.8%) cases, in one case. Threatening miscarriage of the first trimester was detected in 16 (20.0%) women, threatening early premature birth was detected in 14 (15.5%). In 7 (8.8%) women, pregnancy ended with premature birth at 34/35 and 35/36 weeks, 52 (65%) with urgent delivery. 17 (21.3%) were delivered surgically.

Keywords: miscarriage, colpitis, bacterial vaginosis, chronic endometritis, pregnancy and childbirth.

Актуальность. В последние годы отмечается ежегодный рост регистрации случаев НБ I триместра на 6–7% [1]. Неполная диагностика и отсутствие этиопатогенетического подхода к прегравидарной подготовке женщин, в анамнезе которых имеется неразвивающаяся беременность I триместра, приводит в 60–70% случаев к повторной по-