

На правах рукописи

Матвейчев Алексей Валерьевич

**Роль цитотрофобласта плаценты человека в регуляции
способности дендритных клеток стимулировать клеточные
формы иммунных реакций**

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 2010

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Нижегородский государственный университет имени Н.И.Лобачевского» Федерального агентства по образованию
Федеральное государственное учреждение науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И. Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

В. Ю. Талаев

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

А. А. Ярилин

доктор биологических наук, профессор

А. Г. Лютов

Ведущая организация: Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии РАМН, г. Москва

Защита состоится «__» _____ 2010 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.02 в Федеральном государственном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации по адресу 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, г. Москва.

Автореферат разослан «__» _____ 2010г.

Ученый секретарь диссертационного совета

кандидат медицинских наук

Л.И. Новикова

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы

По современным данным, большое число патологий беременности, таких как бесплодие, невынашивание и преэклампсия являются следствием иммунного конфликта на границе организмов матери и плода. Для борьбы с этими опасными состояниями ученые возлагают большие надежды на дендритные клетки (ДК) как на потенциальный рычаг управления иммунными реакциями. Располагаясь в местах наиболее вероятного контакта с антигеном, именно они первыми контактируют с ним и определяют процесс дальнейшего развертывания ответа. Хорошо известна способность ДК влиять на баланс цитокинов спектра Тх-1 и Тх-2 в зависимости от условий микроокружения и, таким образом, выбирать преобладающий тип иммунных реакций (Kalinski P. et al, 1999, Moser M., Murphy K.M., 2000). Также известно, что баланс между Тх-1 и Тх-2/Тх-3 цитокинами влияет на исход беременности (Dealtry G.B., et al., 2000). Вышесказанное свидетельствует об обоснованности предположения о вовлечении ДК в сохранение плода и создание условий, благоприятствующих его развитию, а также важности исследования взаимодействия ДК и клеток цитотрофобласта плаценты – носителей антигена плода, контактирующих с клетками матери.

По нашему мнению, понимание роли дендритных клеток в сложных процессах поддержания толерантности к плоду позволит создать новые средства и методы лечения патологий беременности, что приобретает особое значение в нынешней сложной демографической ситуации. Также изучение механизмов, предотвращающих ответ на генетически чужеродный плод при нормальных физиологических условиях, имеет принципиальное общенаучное значение для иммунологии как науки, изучающей самозащиту организма от чужеродных веществ и сохранение биологической индивидуальности.

Цель исследования

Изучить влияние клеток цитотрофобласта плаценты человека на морфологические, функциональные и фенотипические свойства моноцитарных дендритных клеток в экспериментальных условиях, воспроизводящих элементы фето-плацентарного микроокружения *in vitro*.

Задачи исследования

1. Создать *in vitro* экспериментальную модель фето-плацентарного микроокружения, включающую клетки цитотрофобласта человека и дендритные клетки человека.

2. Исследовать влияние цитотрофобласта плаценты на морфологические свойства дендритных клеток.

3. Оценить фенотип дендритных клеток, созревающих в присутствии цитотрофобласта.

4. Оценить влияние сокультивирования с цитотрофобластом на продукцию дендритными клетками ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-10 и ИЛ-12p70.

5. Исследовать действие цитотрофобласта на способность дендритных клеток индуцировать пролиферацию и продукцию цитокинов лимфоцитами.

6. Оценить влияние дендритных клеток, культивировавшихся в присутствии цитотрофобласта, на экспрессию молекул, отвечающих за миграцию Т-лимфоцитов.

Научная новизна

Установлено впервые, что дендритные клетки человека участвуют в формировании цитокинового сдвига и изменении миграционных свойств Т-клеток при беременности.

Создана *in vitro* экспериментальная модель фето-плацентарного микроокружения, включающая клетки цитотрофобласта, дендритные клетки, лимфоциты и, в ряде экспериментов, децидуальные фибробласты.

Проведено исследование влияния цитотрофобласта на морфологические, функциональные и фенотипические свойства дендритных клеток.

Установлено, что сокультивирование дендритных клеток и цитотрофобласта приводит к повышению адгезивности дендритных клеток и существенному изменению их морфологии в культуре.

Продемонстрировано, что дендритные клетки, росшие в присутствии цитотрофобласта, частично сохраняют экспрессию моноцитарного маркера CD14, в то время как экспрессия HLA-DR и количество несущих данную молекулу клеток снижается.

Показано, что в смешанных культурах лимфоцитов дендритные клетки, росшие с цитотрофобластом, в значительной степени утрачивают способность стимулировать продукцию интерферона- γ Т-лимфоцитами, сохраняя способность поддерживать их пролиферацию.

Продемонстрировано, что Т-лимфоциты, стимулированные дендритными клетками, росшими с трофобластом, слабее утрачивают молекулу CD62L, отвечающую за миграцию Т-клеток в лимфатические узлы.

Практическая значимость

Получение новых данных о защитных механизмах, реализуемых при взаимодействии клеток плаценты и иммунной системы матери, необходимо для понимания процессов поддержания толерантности к плоду при нормальной беременности, а также для разработки методов диагностики и коррекции патологий беременности, в основе которых лежат нарушения иммунных процессов.

Внедрение результатов работы

Материалы диссертационной работы вошли в аналитический обзор “Методы выделения, культивирования и оценки функциональной активности дендритных клеток новорожденных”.

Апробация материалов диссертации

Диссертация апробирована на совместном заседании 1) Ученого Совета ФГУН “Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной” Роспотребнадзора, 2) кафедры молекулярной биологии и иммунологии биологического факультета ГОУ ВПО «Нижегородский Государственный Университет им. Н.И. Лобачевского» Федерального агентства по образованию 3) расширенного межлабораторного научного семинара ФГУН “Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной” Роспотребнадзора (протокол № 11 от 30.06.10).

Основные материалы работы были доложены на 14-й Нижегородской сессии молодых ученых (Нижний Новгород, 2009 г.) и на XVII международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2010» (Москва, 2010 г.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 18 научных работ, в том числе 9 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 2 публикации в сборниках статей и 7 публикаций в материалах отечественных конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 145 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных данных, выводов и списка литературы, который содержит 18 отечественных и 295 зарубежных источников. Диссертация иллюстрирована 28 рисунками.

Содержание работы

Материалы и методы исследований

Объектами исследования являлись моноцитарные дендритные клетки и лимфоциты периферической крови беременных женщин, а также клетки цитотрофобласта. Клетки цитотрофобласта были выделены из 18 плацент,

полученных при плановых медицинских абортах. Срок беременности составлял 5-11 недель. Все беременные женщины были практически здоровыми. Дендритные клетки были получены из моноцитов периферической крови 39 здоровых беременных женщин, Т-лимфоциты выделены из венозной крови 33 здоровых взрослых доноров. Образцы плаценты и крови были предоставлены МЛПУ «Родильный дом № 1» г. Нижнего Новгорода.

Этапы экспериментов, связанные с характеристикой мононуклеарных клеток периферической крови проводить на базе лаборатории кафедры молекулярной биологии и иммунологии биологического факультета ГОУ ВПО ННГУ им. Н.И. Лобачевского. Этапы экспериментов, связанные с совместным культивированием дендритных клеток и цитотрофобласта, а также функциональным и фенотипическим анализом лимфоцитов и дендритных клеток в условиях *in vitro* проводить на базе лаборатории клеточной иммунологии ФГУН ННИИЭМ им. акад. И.Н. Блохиной. Все исследования выполнены лично соискателем.

Клетки цитотрофобласта (Троф) выделяли с помощью ферментативного разрушения фрагментов хориона плаценты добавлением 2 мл 2,5% раствора трипсина (активность 1000-1500 BAEE/mg, «Sigma», USA) и 18 мл 0,2% раствора ЭДТА, либо 20 мл готового 0.25% раствора трипсина с 1мМ ЭДТА (Gibco, «Invitrogen», USA). Затем проводили разделение клеток на ступенчатом градиенте плотности перколла («Amersham-Pharmacia», Sweden) с концентрациями слоев 40, 30, 25 и 15%. Клетки цитотрофобласта собирали в слое 30% перколла и границе слоев 25-30%, разводили до нужной концентрации в среде DMEM с 10% эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамином, пируватом натрия и гентамицином (полная питательная среда - ППС). Клетки цитотрофобласта засеивали на 24-луночные планшеты в концентрации $3-5 \times 10^5$ клеток/мл и культивировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Оценку чистоты выделения клеток трофобласта проводили по наличию характерного для них цитокератина-7 с помощью иммуноферментного

окрашивания мазков клеток и по отсутствию на клетках классических молекул главного комплекса гистосовместимости (HLA) с помощью иммунофлюоресцентного окрашивания и проточной цитометрии. В работе использовали культуры клеток трофобласта, содержащие не менее 95% цитокератин-7⁺HLA-I-клеток.

МНПК выделяли из стерильных проб венозной крови здоровых беременных женщин над слоем Histopaque-1077 («Sigma», USA) и засевали в ППС. Для засева готовили суспензию мононуклеарных клеток с концентрацией $3-5 \times 10^6$ кл/мл.

Дендритные клетки получали из моноцитов периферической крови здоровых беременных женщин культивированием в присутствии рекомбинантных интерлейкина-4 (ИЛ-4) и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) в течение 6 суток. Для получения моноцитов суспензию МНПК засевали на 24-луночные планшеты («Costar», USA) по 1 мл на лунку и инкубировали в течении 3 часов при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. За это время моноциты адгезировались к поверхности пластика. Неприлипшие клетки смывали с поверхности пластика теплой средой DMEM, а в лунки вносили ППС. Через сутки моноциты снимали с пластика пипетированием, пересеивали на новый 24-луночный планшет и в часть лунок с моноцитами добавляли клетки цитотрофобласта (соотношение моноцитов и клеток цитотрофобласта 4:1).

В отдельных экспериментах нами применялись системы ThinCerts («Greiner Bio-One», Germany) для пространственного разделения созревающих ДК и клеток трофобласта. Системы представляют собой цилиндрические пластиковые вставки примерным объемом 300 мкл, доньшко которых является мембраной с порами. Вставки помещаются в лунки 24-луночного планшета. Моноциты помещаются в лунки планшета, клетки трофобласта – во вставки. Также применялось культивирование созревающих ДК в присутствии 25% кондиционированной трофобластом

среды (среда из 2-х суточных культур цитотрофобласта, засеянных в концентрации 5×10^5 /мл).

Для индукции созревания ДК к культурам моноцитов с Троф или без него добавляли ИЛ-4 - по 20 нг/мл и ГМ-КСФ - по 100 нг/мл. Цитокины добавляли на 1 и 4 сутки культивирования, первыми сутками считалась дата посева цитотрофобласта к моноцитам. В отдельные контрольные лунки засевали клетки цитотрофобласта без моноцитов. Длительность культивирования с цитокинами составляла 6 суток, при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. На 7-е сутки среду в лунках заменяли и вносили стимулятор дозревания ДК - липополисахарид (ЛПС) *S. typhi* в концентрации 1 мкг/мл.

После культивирования с ЛПС активированные ДК снимали с пластика пипетированием, дважды отмывали в 3-5 мл DMEM, подсчитывали и использовали для цитофлюорометрического определения фенотипа, а также оценки их функциональных свойств в 96-часовой смешанной культуре лимфоцитов.

Изменение фенотипа ДК оценивалось цитофлюорометрически с помощью меченых конъюгированными с флюорофором моноклональными антителами, а также с помощью иммуногистохимического окрашивания. Для иммунофлюоресцентного окрашивания клеток использовались моноклональные антитела к HLA-DR, меченные FITC, к CD14, меченные PE («Иммунсорбент», Россия); к CD80 и CD86, меченные FITC («Beckman Coulter Corp», France); к CD83, меченные PE («BD Biosciences, USA»). Для цитофлюорометрического исследования клетки собирали, отмывали в 3-5 мл DMEM, после чего осаждали и ресуспендировали в 0.09% растворе NaN₃ на PBS(A). Клетки инкубировали с антителами при температуре 4°C в течение 30 минут. Анализ фенотипа проводили с помощью лазерного проточного цитофлюориметра FACS-Canto II («Becton Dickinson», USA).

Имуногистохимическое окрашивание проводили с применением антител к HLA-DR («МедБиоСпектр», Москва) и тест-системы LSAB-2 («DakoCytomation Inc.», USA).

Влияние Троф на спектр продукции цитокинов дендритными клетками проводили, измеряя концентрации ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-10 и ИЛ-12p70 в надосадках культур ДК, используя твердофазный иммуноферментный анализ. Нами использовались надосадки как незрелых культур, не стимулированных ЛПС (6-е сутки культивирования), так и зрелых, стимулированных ЛПС в течение суток (7-е сутки культивирования), росших с цитотрофобластом и без него. Для измерения концентрации цитокинов применяли наборы реагентов «Интерлейкин 1-бета-» и «Интерлейкин -6-ИФА-БЕСТ» («Вектор-Бест», Новосибирск), набор для оценки концентрации ИЛ-10 («Цитокин», Санкт-Петербург) и набор для оценки продукции ИЛ-12p70 («Biosource», USA).

Влияние Троф на способность ДК стимулировать пролиферативный ответ, продукцию цитокинов и изменять миграционные свойства отвечающих лимфоцитов оценивали в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ). В качестве отвечающих клеток нами использовались аллогенные по отношению к ДК и трофобласту лимфоциты (неприлипшие клетки, получаемые после адгезии суспензии МНПК на пластике), засеянные в концентрации 1×10^6 в ППС. В качестве стимулирующих клеток использовались: 1) ДК, росшие без трофобласта; 2) ДК, росшие в присутствии Троф без вставок (ДК-Троф), с Троф во вставках «ThinCerts» (ДК-ThinCerts) или с кондиционированной трофобластом средой (ДК-КС); 3) ДК, росшие без трофобласта, и смешанные с трофобластом лишь в момент внесения к отвечающим клеткам (ДК+Троф). Использовались следующие соотношения стимулирующих клеток и лимфоцитов: 1:10, 1:25, 1:50, 1:100. Контролем служили нестимулированные лимфоциты, а также лимфоциты, смешанные с Троф или с нестимулированными моноцитами в указанных соотношениях.

Способность ДК индуцировать пролиферацию аллогенных лимфоцитов и влияние клеток трофобласта на данную способность оценивали по включению клетками в состав ДНК меченого тритием метилтимидина («Изотоп», Санкт-Петербург). Метку добавляли в СКЛ по 0,5 мкКюри на

лунку через 96 часов после начала культивирования на срок 18-20 часов. Клетки разрушали замораживанием и размораживанием, хроматин переносили на стекловолокнистые фильтры («Titertek», USA) с помощью харвестера. Фильтры высушивали, помещали во флаконы с 10 мл сцинтилляционной жидкости и анализировали их радиоактивность с помощью β -сцинтилляционного счетчика Beckman (USA).

Влияние клеток трофобласта на способность ДК индуцировать продукцию лимфоцитами интерферона- γ (ИНФ- γ) и ИЛ-4 оценивали с помощью ИФА. Для этого собирали надосадки из СКЛ после 96 часов культивирования и измеряли в них концентрации ИНФ- γ и ИЛ-4. Нами применялись наборы реагентов «гамма-Интерферон-» и «Интерлейкин-4-ИФА-БЕСТ» («Вектор-Бест», Новосибирск) в соответствии с инструкцией производителя.

Для изучения индуцированных ДК изменений типов миграции Т-клеток определяли количество $CD3^+CD62L^+$ и $CD3^+CD62L^-$ Т-клеток среди отвечающих клеток СКЛ. Для этого клетки из 96-часовой СКЛ собирали, переносили в круглодонные 96-луночные планшеты («Costar», USA) и осаждали центрифугированием при 1500 об/мин в течение 4 минут. К осадку добавляли 6 мкл анти-CD3-FITC и 16 мкл анти-CD62L. Инкубировали клетки при 4°C в течение 45 минут. Окрашенные клетки отмывали с помощью PBS(A) с 0,09% NaN_3 и фиксировали 1%-ным раствором параформальдегида. Анализ фенотипа проводили с помощью лазерного проточного цитофлюориметра FACS-Canto II («Becton Dickinson», USA). Для статистической обработки данных использовали дисперсионный анализ и парный двухвыборочный t-тест для средних. Данный метод используется для проверки гипотезы о различии средних для двух выборок данных при естественной парности наблюдений в выборках. Данные на рисунках представлены в виде $M \pm m$.

Результаты исследования и их обсуждение

На начальном этапе исследований нами были отработаны методики выделения клеток цитотрофобласта, а также контроля чистоты их выделения. Выделенные клетки цитотрофобласта обладали морфологией, типичной для низкодифференцированных клеток: это были крупные, гетерогенные по размерам клетки с крупным округлым, центрально расположенным ядром и небольшим количеством крупных гранул в цитоплазме. Цитокератин-7 после проведения иммуноферментного окрашивания определялся в виде нежной сетчатой структуры, равномерно распределенной в цитоплазме клеток цитотрофобласта. При окрашивании клеток антителами изотипического контроля окраска не наблюдалась. Иммунофлюоресцентное окрашивание не выявляло на поверхности клеток цитотрофобласта классических молекул HLA I класса (рис.1).

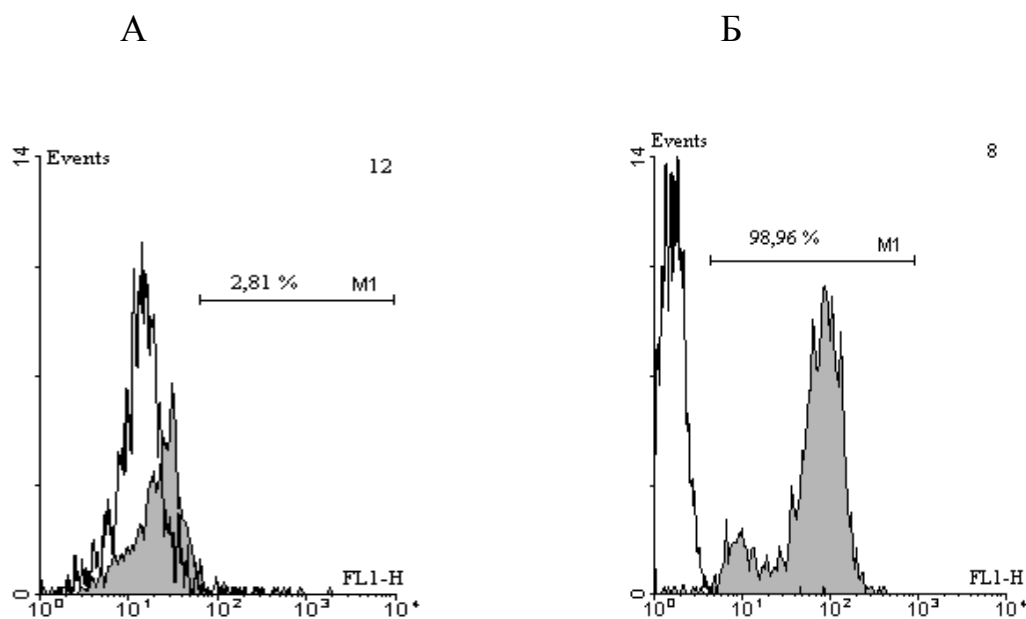


Рис. 1. Отсутствие молекул главного комплекса гистосовместимости I класса на клетках цитотрофобласта (рис.А). На рис. Б – экспрессия молекул HLA I класса на лимфоцитах. Результаты получены с помощью лазерной проточной цитометрии. Неокрашенные графики – изотипический контроль. Над маркером M1 – количество клеток, экспрессирующих HLA-A/B/C (%).

Клетки цитотрофобласта хорошо адгезировались на пластик, причем в первые 3-5 суток культивирования наблюдалась высокая интенсивность пролиферации цитотрофобласта.

Целью нашего исследования являлось изучение действия трофобласта на созревание и функциональные свойства дендритных клеток человека. В мировой научной литературе известны различные способы получения дендритных клеток – выделение ранних костномозговых предшественников и их дальнейшее культивирование (Randolph G.J., et al, 2008, Stephen T.L., et al., 2009) выделение зрелых ДК из различных тканей (Ban Y.L., et al., 2008), а также индукция созревания дендритных клеток в культуре моноцитов путем добавления ИЛ-4 и ГМ-КСФ (Johansson S.M., et al, 2007). Нами был избран метод индукции созревания ДК в культуре моноцитов, как весьма эффективный и физиологичный, позволяющий минимизировать дополнительные воздействия экспериментатора на клетки, а также получить достаточное их количество.

В работу нами брались лишь те культуры моноцитов, где клетки образовывали плотный монослой (рис. 2). Это объясняется тем, что в условиях длительного (7 суток) культивирования культуры с недостаточной плотностью засева погибали к 3-4 суткам. Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Индукция созревания ДК достигалась внесением в культуры рекомбинантных ИЛ-4 и ГМ-КСФ.

Уже на 2-3 сутки в культурах были заметны характерные изменения морфологии, свойственные процессу превращения моноцитов в незрелые ДК. Моноциты существенно увеличивались в размерах, их поверхность покрывалась множеством тонких недлинных отростков-дендритов, крупные ядра располагались асимметрично и имели форму полукруга. Снижалась адгезивность клеток, в результате чего они собирались в грибовидные кластеры, возвышающиеся над поверхностью культуральной посуды. Различий между культурами ДК и ДК-Троф на данном этапе не наблюдалось.

Однако, начиная с 5 дня культивирования, нами были отмечены значительные различия между культурами ДК и ДК-Троф. В культурах ДК-Троф кластеры буквально рассыпались по поверхности пластика веером

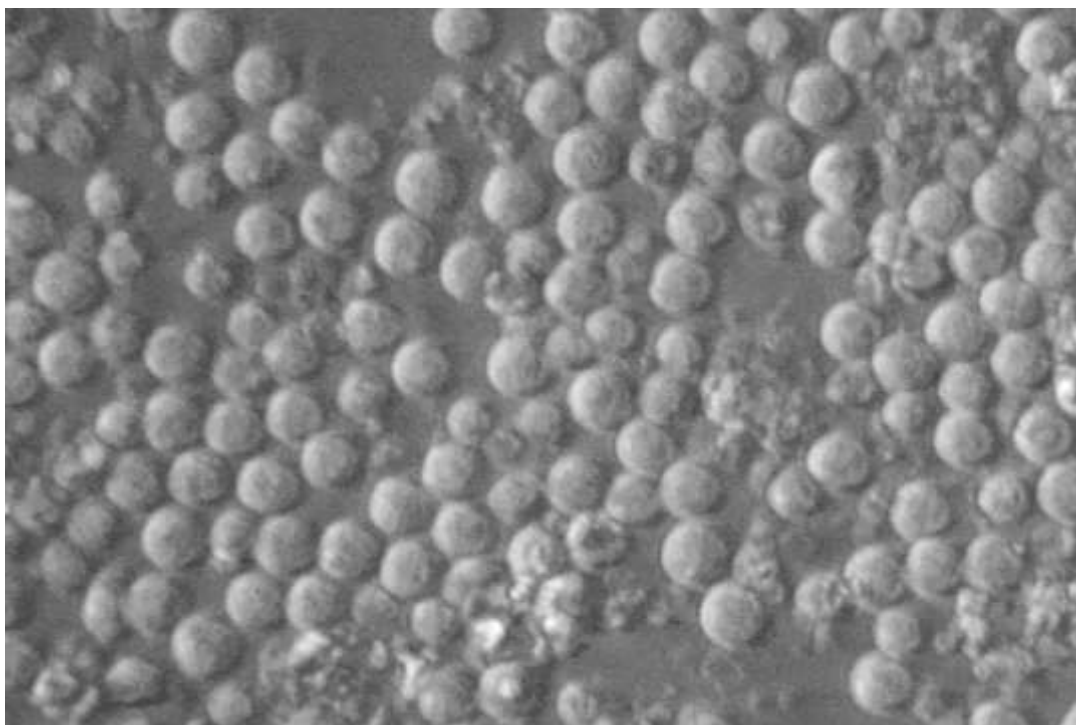


Рис. 2. Моноциты в культуре, первые сутки после выделения. Модуляционный фазовый контраст Хоффмана, увеличение x 200.

очень крупных распластанных веретенообразных клеток, очень сильно отличающихся от ДК, созревающих без Троф. Сильнее всего различия проявлялись после активации ДК липоплисахаридом *S. typhi*. Различия между ДК и ДК-Троф были столь выражены, что культуры клеток, полученные из одних и тех же моноцитов, но созревавшие с трофобластом и без него не имели никаких сходных морфологических черт (рис. 3). Подобные изменения, хотя и несколько более слабые, наблюдались в культурах ДК, созревавших в присутствии кондиционированной трофобластом среды или в культурах ДК,

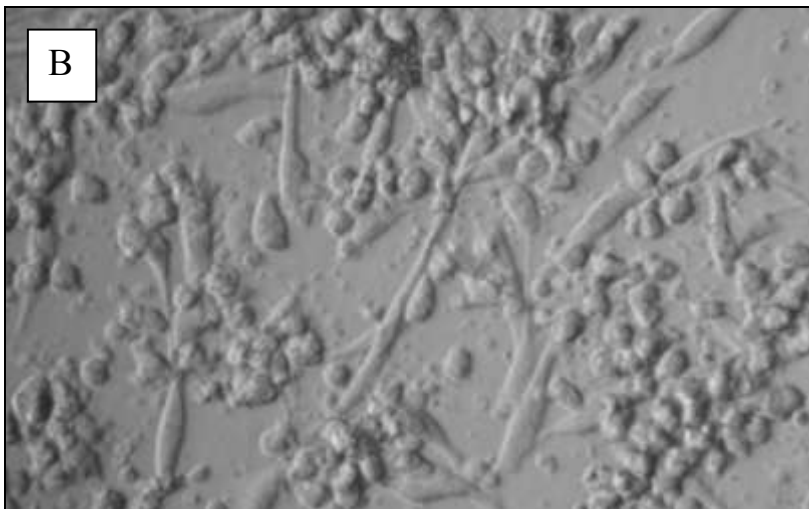
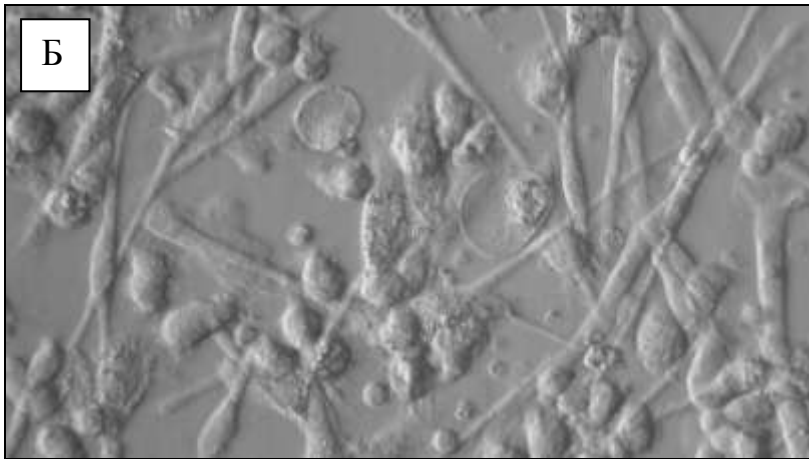
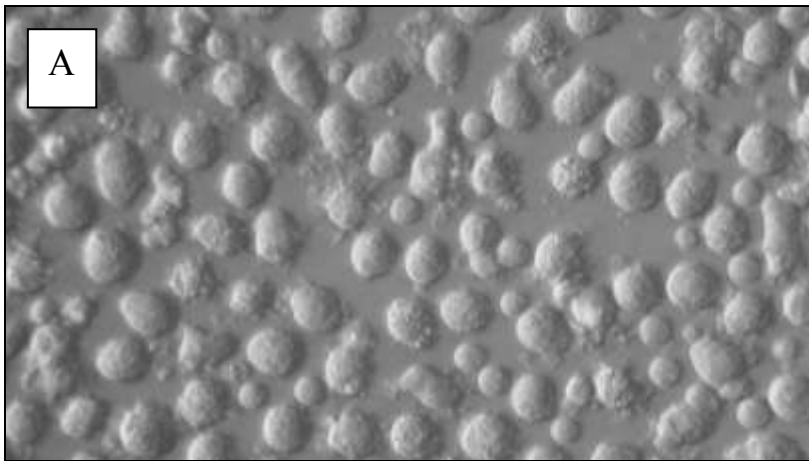


Рис. 3. Морфологические черты культур ДК и ДК-Троф после активации. А – культура ДК, Б – культура ДК-Троф, В – ДК, росшие в присутствии трофобласта, отделенного от них вставкой ThinCerts. Клетки культивировали в течение 6 суток с ИЛ-4 и ГМ-КСФ и 1 суток с ЛПС. Модуляционный фазовый контраст Хоффмана, увеличение x 200.

отделенных от клеток трофобласта вставками ThinCerts. Добавленные в культуры клетки трофобласта не могли являться источником описанных выше фибробластоподобных клеток: контрольные культуры Троф содержали крупные отдельные клетки с мелким ядром и большим количеством цитоплазматических включений. Данная морфология сохранялась как при добавлении цитокинов и ЛПС, так и без такового. Подобные изменения морфологии наводят нас на предположение о значительном повышении адгезивных свойств созревших ДК-Троф по сравнению с ДК.

Представляется возможным, что рост адгезивности может вносить свой вклад в сохранение плода, затрудняя миграцию зрелых ДК из децидуальной оболочки в лимфатические узлы и транспорт поглощенных антигенов для их представления Т-лимфоцитам. Таким образом, контакт Т-клеток матери и зрелых ДК, несущих антигены плода, может быть ограничен.

Специфический поверхностный фенотип обуславливает многие функциональные свойства ДК и является критерием, по которому ДК относят к профессиональным АПК. На основании анализа фенотипа можно сделать вывод о степени зрелости ДК и их готовности к взаимодействию с лимфоцитами. Мы оценивали влияние клеток трофобласта на экспрессию дендритными клетками молекул, напрямую связанных с исполнением иммунорегуляторных функций: МНС II и костимуляторных молекул (CD80, CD83, CD86). Также нами проводился анализ уровня экспрессии CD14. Данная молекула является маркером моноцитарной популяции, что, принимая во внимание моноцитарное происхождение используемых в эксперименте дендритных клеток, делает ее значимым маркером степени зрелости полученных клеток.

Для моноцитов, росших без стимуляторов созревания и используемых нами в качестве контроля, характерна довольно высокая экспрессия молекул HLA-DR, сравнивая с экспрессией на зрелых ДК (рис. 4). В то же время, экспрессия молекул костимуляции CD80, CD83 и CD86 моноцитами невысока. Также подавляющее большинство их несет на мембране

значительное количество молекул CD14 (рис. 4, данные репрезентативного эксперимента).

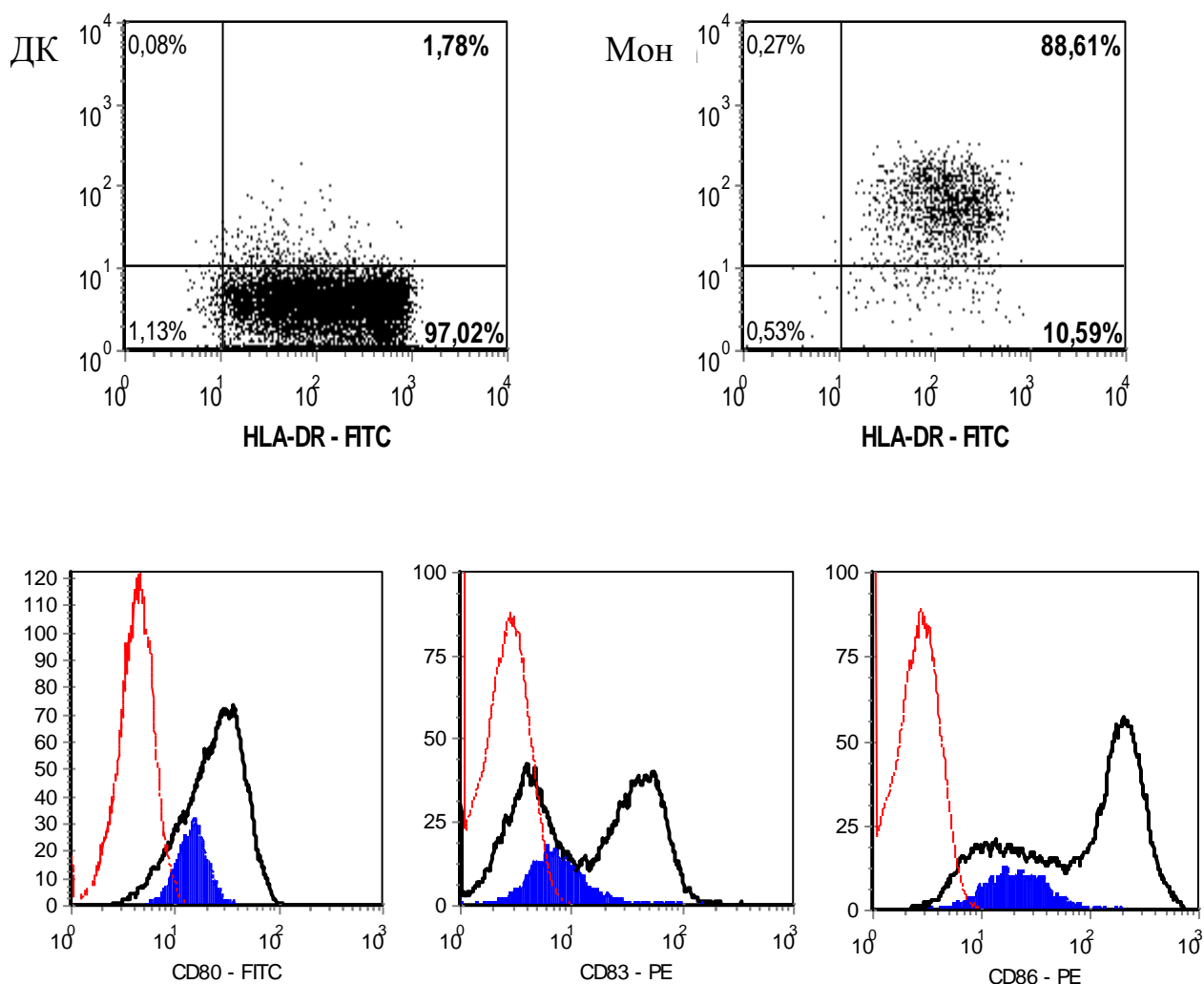


Рис. 4. Экспрессия основных маркеров фенотипического созревания на зрелых дендритных клетках и моноцитах (результат репрезентативного эксперимента). Верхний ряд – процент клеток, несущих CD14 и HLA-DR в культурах зрелых дендритных клеток (ДК) и моноцитов (Мон). Нижний ряд – экспрессия молекул костимуляции. Маркеры и тип флюорофора на применявшихся в окрашивании антителах указан под графиками. Тонкая линия – изотипический контроль, закрашенная диаграмма – экспрессия на моноцитах, толстая линия – экспрессия на ДК.

Процесс созревания моноцитов в дендритные клетки характеризуется значительным снижением экспрессии CD14 в культуре - на рисунке оно заметно как перемещение облака клеток в нижний правый квадрант диаграммы (HLA-DR⁺CD14⁻). В репрезентативном эксперименте 88,61% моноцитов, росших 7 суток без добавления ИЛ-4, ГМ-КСФ и ЛПС, несли CD14, в то время как в культурах дендритных клеток детектируемый уровень экспрессии этого маркера обнаруживали лишь 1,78 % клеток. Плотность экспрессии молекулы HLA-DR на созревающих ДК, наоборот, возрастает. Также в культурах ДК повышается экспрессия молекул костимуляции. Данная картина соответствует классическим представлениям о созревании ДК, полученным многочисленными отечественными и зарубежными авторами (Пашенков М.В., Пинегин Б.В., 2006, Kammerer U., et al., 2008), и воспроизведение ее в наших условиях свидетельствует об адекватности используемых условий культивирования ДК. Сокультивирование ДК с клетками трофобласта, по видимому, приводит к замедлению фенотипического созревания. Наши исследования показали, что ДК, созревавшие в присутствии цитотрофобласта, имели признаки фенотипической незрелости (рис. 5, N=30). Они сохраняли экспрессию молекулы CD14, свойственной предшественникам ДК – моноцитам, в то время, как экспрессия молекулы HLA-DR, необходимой для эффективной презентации поглощенного антигена, была снижена в сравнении с обычными зрелыми ДК. HLA-DR несло 94,91±1,44% ДК, для ДК-Троф данное значение составляло 91,17±1,18%. CD14 был присущ 4,95±1,75% ДК, в то время как 14,23±1,88% ДК-Троф его сохраняла (различия достоверны при p<0,05 и P<0,005 соответственно). Итоговая плотность экспрессии молекулы HLA-DR на ДК-Троф падала в сравнении с ДК в 1,29 раза (p<0,05). В тоже время для зрелых ДК, росших без трофобласта, была характерна очень высокая экспрессия HLA-DR и очень низкие уровни CD14.

Также было показано, что присутствие цитотрофобласта во время созревания не ведет к статистически достоверному изменению количества клеток, несущих CD80, CD83 и CD86.

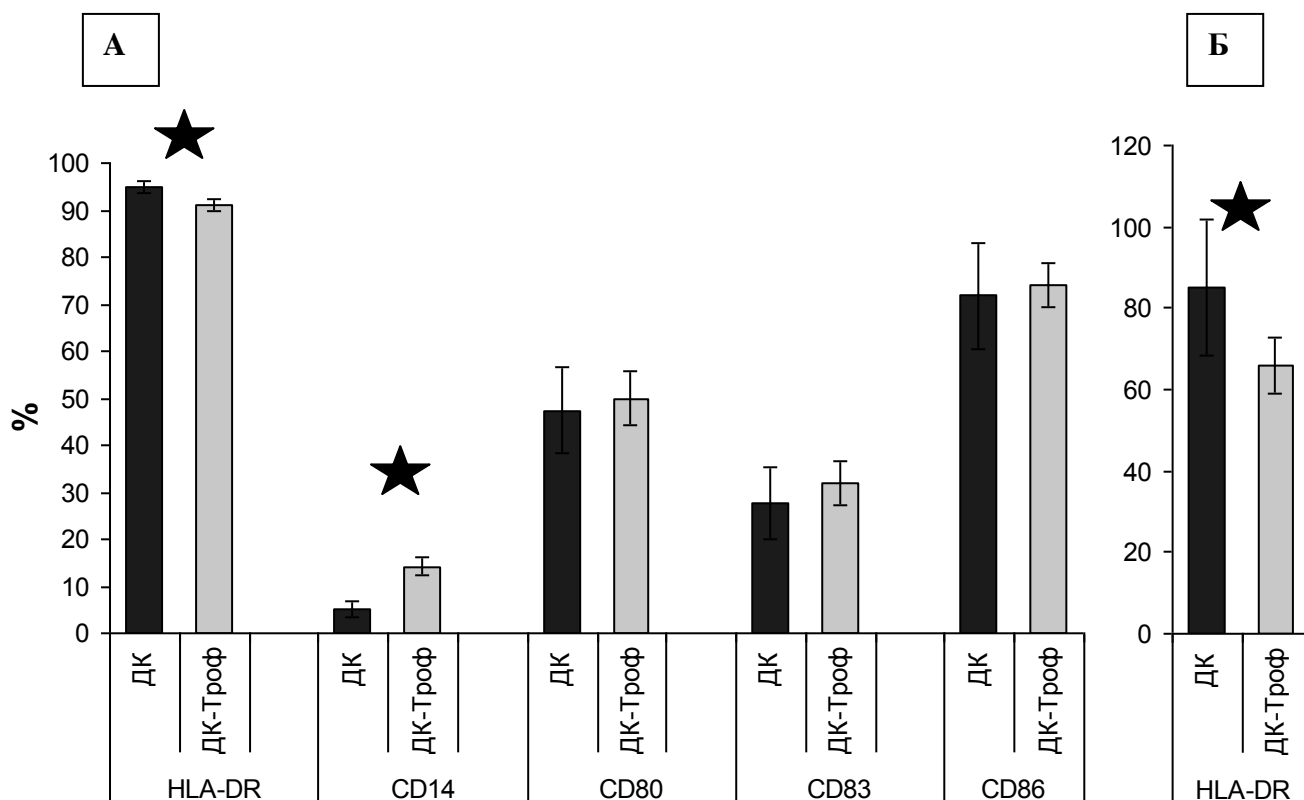


Рис. 5. Экспрессия HLA-DR, CD14, CD80, CD83, CD86 на ДК и ДК-Троф. А – процент клеток, несущих указанные маркеры. Б – плотность экспрессии HLA-DR. Маркеры обозначены под диаграммой. Статистически достоверное отличие ДК от ДК-Троф обозначено ★ ($p < 0.05$ в парном t-тесте).

Известно, что фенотипическая зрелость коррелирует со способностью ДК эффективно запускать иммунный ответ, а незрелые клетки являются слабыми индукторами ответа. Таким образом, обнаруженное замедление созревания ДК в присутствии цитотрофобласта может играть определенную роль в защите плода от атак иммунной системы матери.

Не менее важным нам представлялось оценить влияние цитотрофобласта на продукцию дендритными клетками цитокинов, так как именно цитокины во многом определяют дальнейшую судьбу Т-клеток, взаимодействующих с ДК и, в том числе, их дифференцировку в сторону Тх-1 или Тх-2 (Пащенко М.В., Пинегин Б.В., 2006, Hilkens С.М., et al. 1997, Langenkamp А., et al., 2000). Кроме того, некоторые цитокины являются факторами, критически влияющими на исход беременности. Данные об экспрессии незрелыми и зрелыми дендритными клетками ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ИЛ-10 представлены на рисунке 6. Концентрации ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ИЛ-10 в надосадках из 6-суточных культур незрелых ДК были достоверно выше, чем в супернатантах из культур, собранных через сутки после пересева и стимуляции ЛПС. Концентрация ИЛ-1 β снизилась с $245,6 \pm 33,81$ пг/мл в культуре незрелых ДК до $101 \pm 17,49$ пг/мл в культуре зрелых ДК (снижение в 2,43 раза, $p < 0,05$). Для ИЛ-6 снижение концентрации составило 1,55 раза, для ИЛ-10 – 3,36 раз. Цитотрофобласт не оказывал влияния на продукцию данных факторов. Мы не отметили сколько либо значимой продукции ИЛ-12p70 при использованных условиях культивирования, что согласуется с данными некоторых иностранных авторов (Geijtenbeek Т.В.Н., 2003).

Как известно, основной функцией дендритных клеток в организме является индукция и регуляция адаптивного иммунного ответа. Исход регуляторных взаимодействий и, в конечном итоге, последующий иммунный ответ во многом зависит от функциональных особенностей ДК. Функциональные свойства полученных ДК оценивались в СКЛ по способности стимулировать пролиферацию и продукцию цитокинов аллогенными лимфоцитами.

По полученным данным, уровень пролиферации, индуцируемой дендритными клетками, зависел от соотношения стимулирующих клеток и отвечающих лимфоцитов – он почти линейно нарастал, начиная от соотношения ДК к лимфоцитам 1:50 до соотношения 1:10. При соотношении 1:100 уровень пролиферации был статистически неотличим от уровня

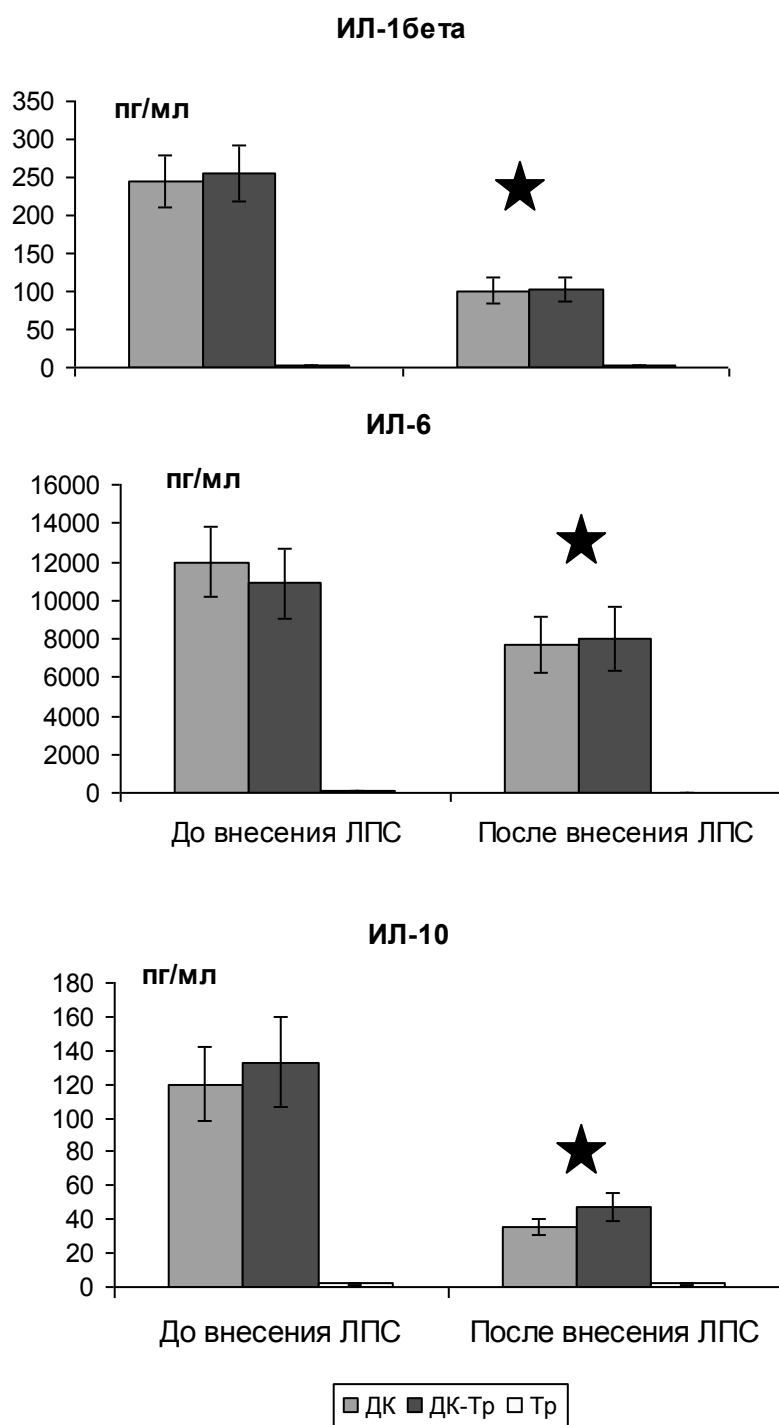


Рис. 6. Концентрация ИЛ-1β, ИЛ-6 и ИЛ-10 в надосадках культур незрелых и зрелых ДК и ДК-Троф, а также контрольных культур цитотрофобласта (Троф). Клетки культивировали 6 суток с ИЛ-4 и ГМ-КСФ и 1 сутки с ЛПС *S. typhi*.

★ - достоверное различие концентрации до и после внесения ЛПС, $p < 0,05$.

спонтанной пролиферации нестимулированных лимфоцитов. Было установлено, что ДК, созревшие в присутствии трофобласта, стимулировали пролиферацию лимфоцитов столь же эффективно, как и ДК, росшие без трофобласта (рис. 7).

Очень интересные, с нашей точки зрения, результаты были получены при оценке действия трофобласта на способность ДК определять спектр цитокинопродукции активированных лимфоцитов. Как известно, моноцитарные ДК при традиционных условиях созревания являются мощными стимуляторами клеточных форм ответа и продукции их ключевого цитокина - ИНФ- γ . Полученные ДК эффективно стимулировали аллогенные лимфоциты к продукции ИНФ- γ . Эффект регистрировался начиная с соотношения дендритных клеток к отвечающим лимфоцитам 1:50 и дозозависимо нарастал. Культивирование созревающих ДК с трофобластом приводило к существенному статистически достоверному снижению их способности индуцировать ИНФ- γ – цитокина, ответственного за наиболее опасные для плода клеточные формы иммунных реакций (рис. 8). При соотношении ДК и лимфоцитов 1:10 продукция интерферона в культурах с ДК-Троф была в $2,88 \pm 0,54$ раза ниже, чем в культурах с обычными ДК ($p < 0,00001$ в парном т-тесте, $N=42$). Чтобы определить, не является ли наблюдаемый эффект (снижение продукции ИНФ- γ) следствием непосредственного действия Троф на отвечающие лимфоциты, использовалось одновременное добавление к отвечающим лимфоцитам дендритных клеток и цитотрофобласта, культивировавшихся отдельно. При этом наблюдалось лишь слабое снижение продукции ИНФ- γ , достоверно менее выраженное, чем при использовании ДК-Троф ($p < 0,002$). Эти результаты доказывают, что снижение продукции ИНФ- γ в культурах ДК-Троф было следствием не супрессивного действия цитотрофобласта на отвечающие лимфоциты, а результатом изменения свойств ДК под действием цитотрофобласта. Также были проведены эксперименты, оценивающие вклад растворимых факторов, продуцируемых цитотрофобластом, в изменения

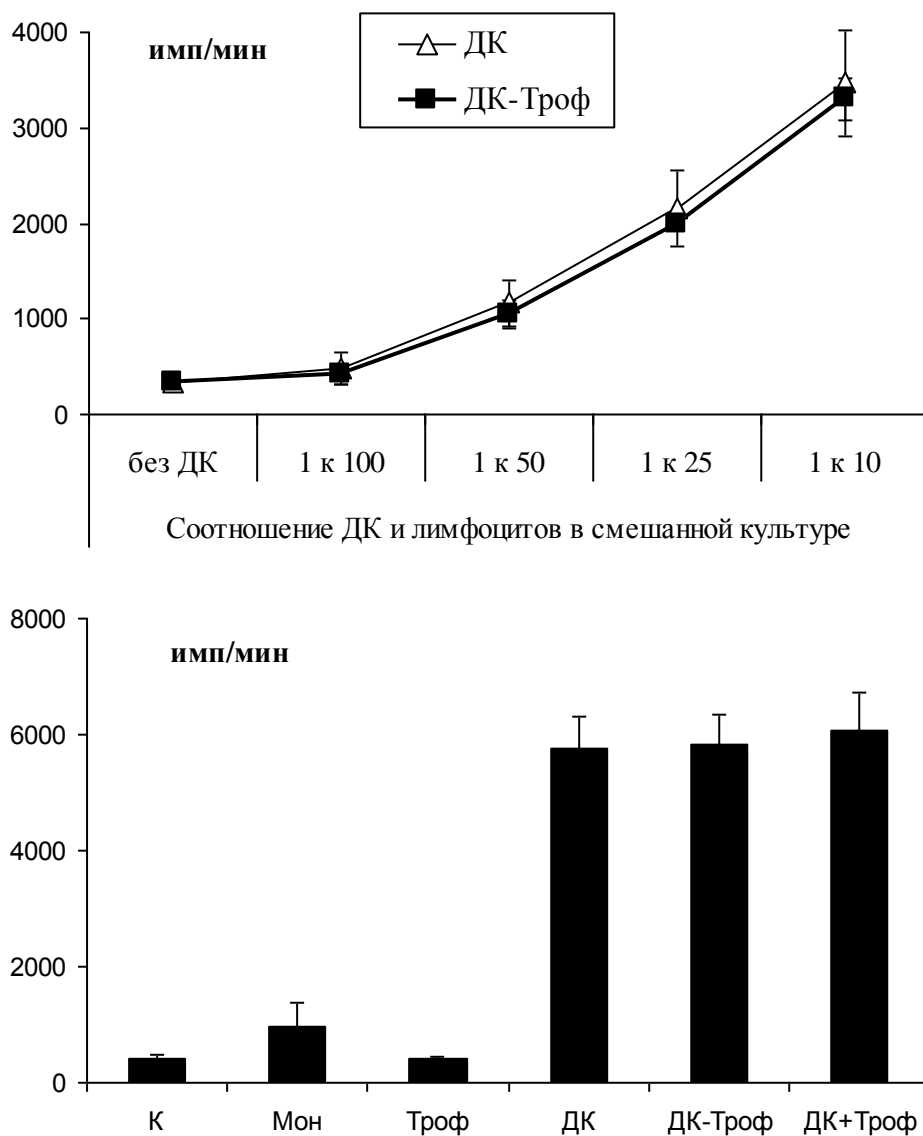


Рис. 7. Пролиферация лимфоцитов, индуцированная дендритными клетками, росшими без трофобласта (ДК) и с трофобластом (ДК-Троф). Верхний рисунок – дозовая зависимость. По оси X – соотношение ДК и лимфоцитов в смешанной культуре. По оси Y – включение меченного тритием метилтимидина (имп./мин.). Нижний рисунок – значения при соотношении ДК к лимфоцитам 1:10. Обозначения: лимфоциты без стимуляции (К), лимфоциты с моноцитами (Мон), с клетками трофобласта (Троф), с дендритными клетками (ДК), и с дендритными клетками, созревшими в присутствии трофобласта (ДК-Троф). ДК + Троф – контрольный вариант СКЛ, в которую добавлены ДК, росшие без трофобласта, и клетки трофобласта, росшие без ДК.

функциональных свойств ДК. Для этого мы использовали два метода: 1) культивирование ДК в присутствии среды, кондиционированной трофобластом (КС); 2) разделение ДК и клеток трофобласта в процессе культивирования системами «ThinCerts», пропускающими растворимые факторы, но не допускающими прямого контакта клеток (рис. 9).

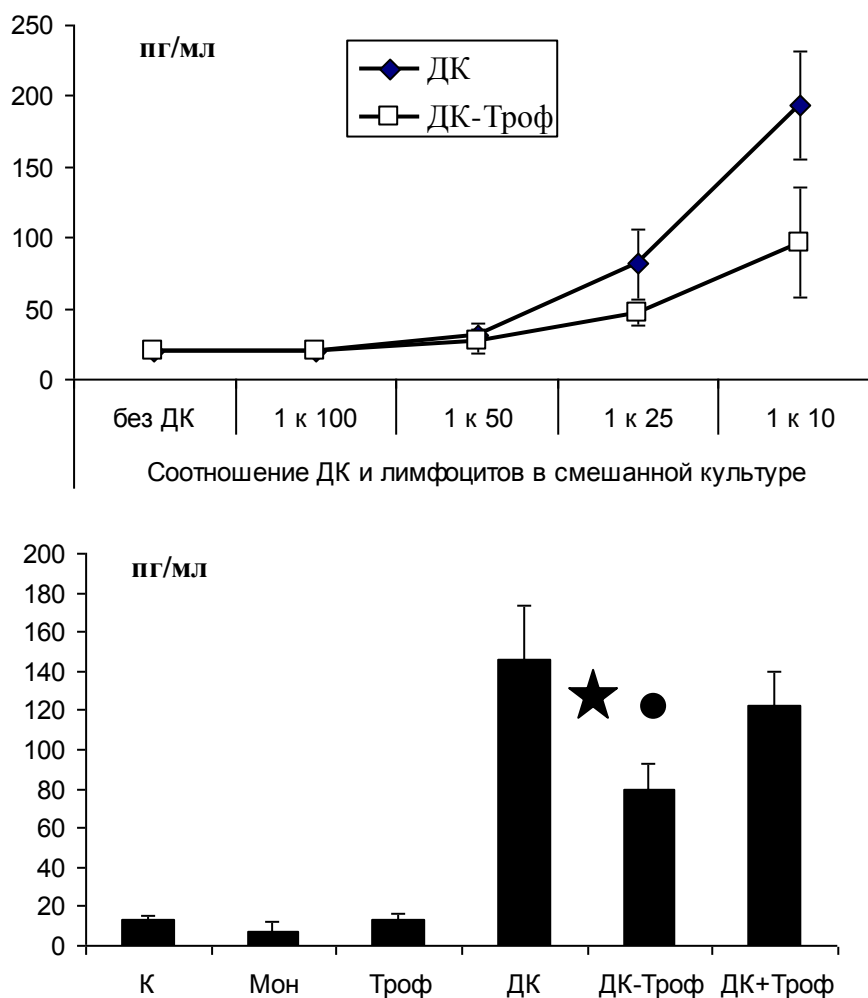


Рис. 8. Продукция ИФН-γ в смешанной культуре лимфоцитов. Верхний рисунок – дозовая зависимость. По оси X – соотношение ДК и лимфоцитов в смешанной культуре. По оси Y – концентрация ИФН-γ в пг/мл. Нижний рисунок – значения при соотношении ДК к лимфоцитам 1:10. Обозначения вариантов культур аналогичны рисунку 7. Отличие между ДК и ДК-Троф обозначено ★ ($p < 0,000001$ в парном т-тесте), между ДК-Троф и ДК+Троф – ● ($p < 0,005$ в парном т-тесте).

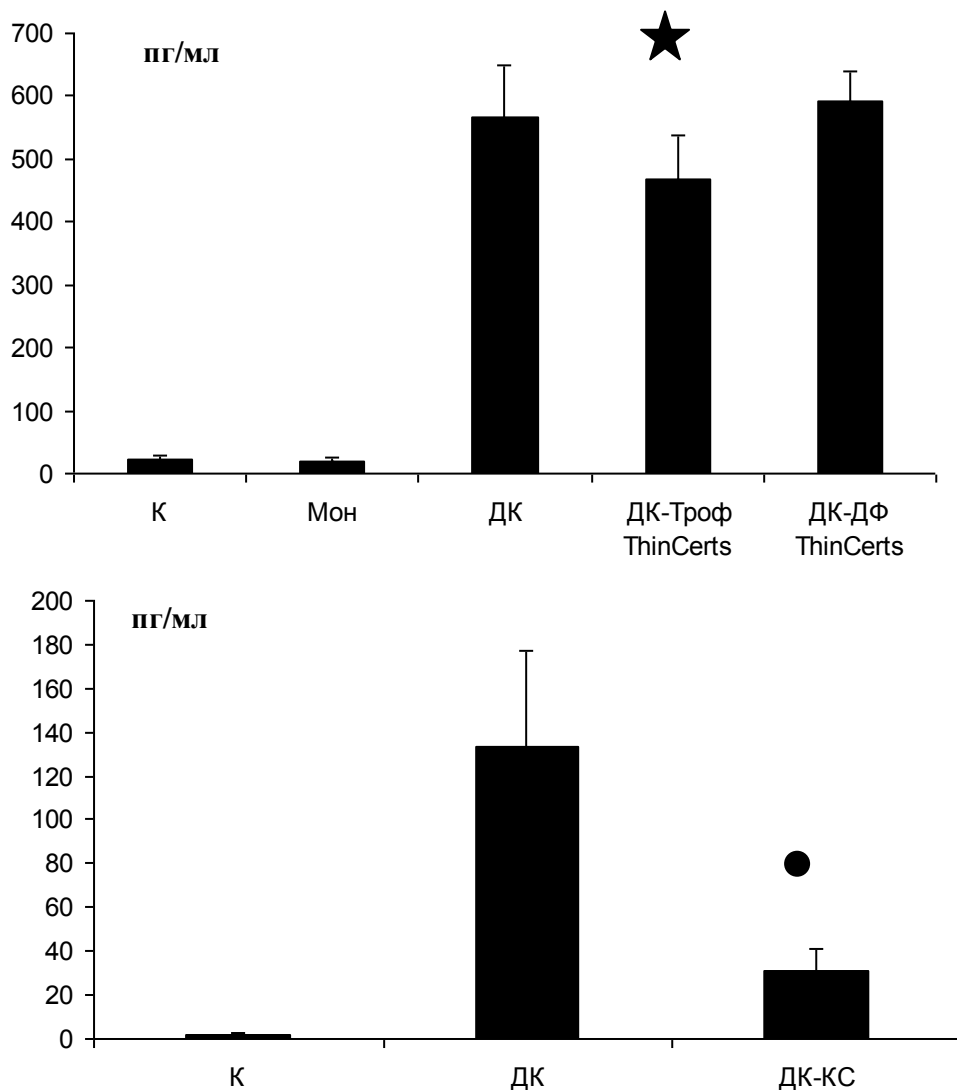


Рис. 9. Влияние клеток цитотрофобласта на способность ДК стимулировать продукцию ИНФ- γ при использовании системы «ThinCerts» (верхний рисунок) и кондиционированной цитотрофобластом среды (нижний рисунок). Обозначения вариантов культур: лимфоциты без стимуляции (К), с моноцитами (Мон), с дендритными клетками (ДК), с дендритными клетками, созревшими в присутствии трофобласта во вставках (ДК-Троф ThinCerts), с дендритными клетками, созревшими в присутствии децидуальных фибробластов во вставках (ДК-ДФ ThinCerts), ДК-КС – с дендритными клетками, созревшими в присутствии 25% среды, кондиционированной цитотрофобластом. Отличие между ДК и ДК-КС обозначено ● ($p < 0,005$ в парном т-тесте). Отличие от ДК и ДК-ДФ обозначено ★ ($p < 0,005$ в парном т-тесте). Соотношение ДК к лимфоцитам 1:10.

Полученные обоими способами ДК использовали как стимулирующие клетки в СКЛ. Как у ДК, росших в присутствии КС (ДК-КС), так и у ДК, созревающих в присутствии трофобласта в системах «ThinCerts», отмечалось статистически достоверное снижение способности стимулировать продукцию ИНФ- γ в сравнении с ДК, росшими без трофобласта. Это доказывает, что, по крайней мере, частично модулирующее влияние трофобласта на ДК опосредуется растворимыми факторами.

Миграционные свойства напрямую влияют на способность исполнения лимфоцитами эффекторных функций. Не имея возможности попасть в лимфатический узел или воспаленную ткань, лимфоцит не сможет вступить в иммунные реакции, даже имея весь остальной необходимый для этого молекулярный инструментарий. Поэтому для нас было весьма интересно изучить изменение миграционных свойств лимфоцитов и степени их дифференцировки под действием ДК-Троф. Для проведения анализа отвечающие лимфоциты сокультивировали с ДК, ДК-Троф и ДК+Троф в течение 120 часов. Контролем служили нестимулированные лимфоциты. В качестве маркера дифференцировки, связанного с миграционными свойствами, использовалась молекула CD62L. Данная молекула свойственна наивным клеткам, она направляет их миграцию в лимфатические узлы и утрачивается при созревании. Для выделения популяции Т-лимфоцитов при цитофлюорометрическом анализе применялась молекула CD3. Было показано, что стимуляция отвечающих Т-клеток с помощью ДК-Троф ведет к достоверно меньшему падению экспрессии CD62L в сравнении с культурами, стимулированными ДК и ДК+Троф ($p < 0,001$), то есть взаимодействие с ДК-Троф ведет к ослаблению созревания отвечающих Т-клеток (рис. 10). По нашему мнению, подобный механизм может предотвращать миграцию распознавших антигены активированных Т-лимфоцитов из лимфатических узлов в матку и, таким образом, защищать плод от их атаки.

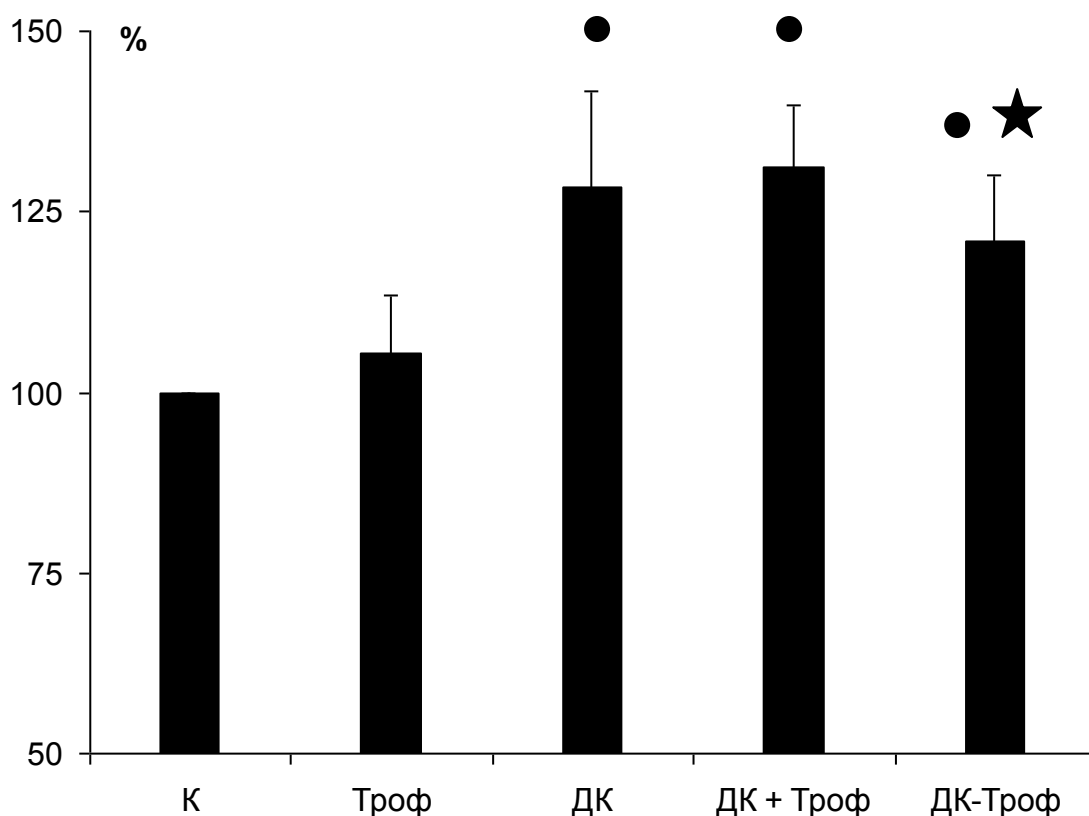


Рис. 10. Влияние цитотрофобласта на изменение количества $CD62L^+$ Т-клеток среди Т-лимфоцитов, активированных дендритными клетками. По оси Y показана кратность увеличения количества $CD62L^+$ Т-лимфоцитов в процентах относительно контроля. Обозначения вариантов культур: лимфоциты, росшие без стимуляции (К), с цитотрофобластом (Троф), с дендритными клетками (ДК), с дендритными клетками, созревшими в присутствии трофобласта (ДК-Троф). ДК + Троф – контрольный вариант смешанной культуры лимфоцитов, в которую добавлены ДК, росшие без трофобласта, и клетки трофобласта, росшие без ДК. Достоверное отличие ДК-Троф от ДК обозначено ★ ($p < 0,001$ в парном т-тесте), отличие от контроля обозначено ● ($p < 0,05$ в парном т-тесте)

Выводы

1. Успешно создана *in vitro* экспериментальная модель фето-плацентарного барьера, содержащая клетки цитотрофобласта плаценты человека и дендритные клетки человека
2. Показано, что культуры дендритных клеток, созревшие в присутствии трофобласта, имеют значительные морфологические отличия от культур дендритных клеток, созревших без трофобласта, свидетельствующие о возрастании их адгезивных свойств.
3. Дендритные клетки, рост которых проходил в присутствии трофобласта, имеют признаки фенотипической незрелости – они частично сохраняют экспрессию моноцитарного маркера CD14, в то время как количество клеток, несущих HLA-DR и плотность экспрессии данной молекулы снижается; клетки цитотрофобласта не влияют на экспрессию дендритными клетками молекул CD80, CD83 и CD86.
4. Дендритные клетки, модулированные трофобластом и дендритные клетки, росшие без трофобласта не отличаются по продукции ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ИЛ-10 и одинаково эффективно индуцируют пролиферацию аллогенных лимфоцитов.
5. Дендритные клетки, культивировавшиеся с трофобластом, частично утрачивают способность индуцировать продукцию интерферона- γ – ключевого цитокина Т-хелперов 1 типа. Данный эффект проявляется как при непосредственном контакте дендритных клеток и трофобласта, так и в условиях, допускающих воздействие лишь растворимых факторов.
6. Дендритные клетки, созревшие с трофобластом, вызывают меньшую утрату молекулы CD62L отвечающими Т-лимфоцитами, чем дендритные клетки, созревшие в отсутствии цитотрофобласта.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Матвейчев А.В., Цатуров М. Э., Бабайкина О.Н., Ломунова М. А., Талаев В. Ю., Добротина Н. А. Некоторые аспекты влияния дексаметазона на

- дендритные клетки. Материалы конференции “Биосистемы: организация, поведение, управление.”. (12-13 апреля 2007 г., Н. Новгород). Издательство ННГУ, 2007, с. 53-54.
2. Цатуров М.Э., Бабайкина О.Н., Ломунова М.А., Матвейчев А.В. Особенности созревания дендритных клеток новорожденных. Материалы конференции молодых ученых «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (X Всероссийская конференция «Человек и его здоровье» 20 – 21 апреля 2007, С-Петербург). С-Петербург, с. 490-491.
 3. Талаев В.Ю., Цатуров М.Э., Бабайкина О.Н., Ломунова М.А., Никонова М.Ф., Талаева Е.Б., Матвейчев А.В. Функциональные свойства моноцитарных дендритных клеток новорожденных. Материалы 2-ой республиканской конференции «Иммунология репродукции: теоретические и клинические аспекты». (15 - 18 мая 2007 г., Сочи). *Russian Journal of Immunology*, 2007, v. 9, suppl. 4, p. 116-117.
 4. Талаев В.Ю., Цатуров М.Э., Бабайкина О.Н., Ломунова М.А., Никонова М.Ф., Талаева Е.Б., Матвейчев А.В. Действие интерлейкина-7 и дексаметазона на созревание моноцитарных дендритных клеток новорожденных. *Иммунология*, 2007, т. 28. № 4, с. 208-211.
 5. Цатуров М.Э., Матвейчев А.В., Бабайкина О.Н., Ломунова М.А. Продукция интерлейкина-10 дендритными клетками новорожденных. Материалы конференции «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (XI Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей «Человек и его здоровье») (19 апреля 2008, С-Петербург). Издательство СПбГУ, С..
 6. Талаев В.Ю., Бабайкина О.Н., Ломунова М.А., Цатуров М.Э., Матвейчев А.В., Никонова М.Ф., Талаева Е.Б. Функциональные свойства моноцитарных дендритных клеток новорожденных в краткосрочных культурах. *Иммунология*, 2008, т. 29, № 3, с. 141-147.
 7. Талаев В.Ю., Матвейчев А.В., Ломунова М.А., Талаева Е.Б., Бабайкина О.Н., Цатуров М.Э., Заиченко И.Е. Клетки трофобласта плаценты

- человека угнетают способность дендритных клеток индуцировать продукцию интерферона- γ . Иммунология, 2009, т. 30, № 3, с. 148-152.
8. Матвейчев А.В., Ломунова М.А., Бабайкина О.Н., Цатуров М.Э., Талаева М.В., Заиченко И.Е., Талаев В.Ю.. Участие дендритных клеток в цитокиновом сдвиге беременности в экспериментальных моделях фетоплацентарного микроокружения. Материалы 14 нижегородской сессии молодых ученых. (естественнонаучные дисциплины). 19 — 23 апреля 2009 г., Нижний Новгород. Издательский салон, 2009, с. 139.
 9. Талаев В.Ю., Цатуров М.Э., Матвейчев А.В., Талаева М.В., Бабайкина О.Н., Ломунова М.А., Заиченко И.Е. Миелоидные дендритные клетки как объект исследований в инфекционной иммунологии. Медицинский альманах, 2009, № 2(7), с. 47-50.
 10. Матвейчев А.В., Ломунова М.А., Бабайкина О.Н., Цатуров М.Э., Талаева М.В., Заиченко И.Е., Талаев В.Ю. Влияние трофобласта ранней плаценты на функциональные свойства дендритных клеток. Статья в сборнике «Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения», 2009, с. 184 – 186.
 11. Цатуров М.Э., Матвейчев А.В., Талаева М.В., Бабайкина О.Н., Ломунова М.А., Талаев В.Ю. Свойства дендритных клеток, модулированных в ходе созревания дексаметазоном. Статья в сборнике «Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения», 2009, с. 199 – 202.
 12. В.Ю. Талаев, Е.И. Ефимов, М.В. Талаева, А.В. Матвейчев, М.Э. Цатуров, О.Н. Бабайкина, И.Е. Заиченко Разработка способа оценки действия вакцин на дендритные клетки *in vitro*. Медицинский альманах, 2010, № 3 (11), с. 255-258.
 13. А.В. Матвейчев, Талаев В.Ю., Ломунова М.А., Талаева М.В., Бабайкина О.Н., Цатуров М.Э., Заиченко И.Е. Роль дендритных клеток в предотвращении иммунологического конфликта матери и плода. Медицинский альманах, 2010, № 3 (11), с. 273-276.

14. Цатуров М.Э., Талаев В.Ю., А.В. Матвейчев, Талаева М.В., Бабайкина О.Н., Заиченко И.Е., Ломунова М.А. Толерогенные дендритные клетки – созревание и функции в экспериментах *in vitro*. Медицинский альманах, 2010, № 3 (11), с. 263-265.
15. Матвейчев А.В., Талаев В.Ю., Талаева М.В., Цатуров М.Э., Ломунова М.А., Заиченко И.Е., Бабайкина О.Н. Механизмы сохранения плода – роль дендритных клеток. Сборник тезисов III Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов ”Симбиоз-Россия 2010”. 2010, Издательство ННГУ, с. 102.
16. Талаев В.Ю., Матвейчев А.В., Ломунова М.А., Бабайкина О.Н., Заиченко И.Е., Цатуров М.Э., Талаева Е.Б. Действие клеток плацентарного барьера на созревание дендритных клеток *in vitro*. Иммунология, 2010, т. 31, №3, с. 125-131.
17. Матвейчев А.В., Ломунова М.А., Бабайкина О.Н., Цатуров М.Э., Талаева М.В., Заиченко И.Е. Взаимодействие дендритных клеток и цитотрофобласта – роль в сохранении плода. Материалы XVII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Секция “Биология”), (12 — 15 апреля 2010 г., Москва). Издательство МГУ, 2010, с. 277-278.
18. Talayev V.Yu., Matveichev A.V., Lomunova M.A., Talayeva M.V., Tsaturov M.E., Zaichenko I.Ye., Babaykina O.N. The effect of human placenta cytotrophoblast cells on the maturation and T-cell stimulating ability of dendritic cells *in vitro*. Clin. Exp. Immunol., 2010, vol. 162 (1), p.91-99.

Список сокращений

ДК – дендритные клетки

ГМ-КСФ – гранулоцитрано-макрофагальный колониестимулирующий фактор

ИЛ – интерлейкин

ИНФ – интерферон

ИФА – иммуноферментный анализ

ЛПС – липополюисахарид

Мон – моноциты

СКЛ – смешанная культура лейкоцитов

Троф – цитотрофобласт

Тх – Т-хелпер

FITC – флуоресцеинизотиоционат

PE – фикоэритрин