

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА НА КОНВЕРСИЮ ФЕНОТИПА И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА *hTERT* Т-ЛИМФОЦИТАМИ РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

М.Б. Раев^{1,3}, С.А. Заморина^{1,3*}, Л.С. Литвинова², К.А. Юрова², О.Г. Хазиахматова², В.П. Тимганова¹,
М.С. Бочкова¹, М.Д. Кропанева², П.В. Храмцов^{1,3}

¹Пермский Федеральный Исследовательский Центр УрО РАН
Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского Отделения Российской Академии Наук,
Пермь, 614081, ул. Голева, 13; эл. почта: mantissa7@mail.ru

²Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград

³Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь

Изучали эффекты хорионического гонадотропина (ХГ) на экспрессию гена *hTERT* в сочетании с конверсией фенотипа наивных Т-клеток и Т-клеток иммунной памяти в системе *in vitro*. Установлено, что ХГ угнетал экспрессию мРНК гена *hTERT* в наивных Т-клетках (CD45RA⁺) и Т-клетках иммунной памяти (CD45RO⁺), что приводило к снижению репликативного потенциала клеток. Присутствие ХГ в культуре приводило к конверсии фенотипа Т-лимфоцитов. ХГ снижал число пролиферирующих Т-клеток иммунной памяти, оцениваемых по фенотипическим признакам методом дифференциального гейтирования, подавлял экспрессию маркера активации CD25 исследуемыми популяциями, не влияя на экспрессию CD71, ассоциированного с пролиферацией. Таким образом, ХГ снижал репликативный потенциал и подавлял активацию Т-клеток и Т-клеток иммунной памяти, что в контексте беременности может вносить вклад в формирование иммунной толерантности к полуаллогенному эмбриону.

Ключевые слова: хорионический гонадотропин, наивные Т-клетки, Т-клетки памяти, CD71, CD25, *hTERT*, пролиферация

DOI: 10.18097/PBMC20176306539

ВВЕДЕНИЕ

Беременность рассматривается как уникальное состояние, сопровождающееся постоянным контактом материнской иммунной системы с антигенами полуаллогенного плода, как на локальном, так и на системном уровнях. Известно, что в материнском кровотоке в период беременности циркулируют отдельные клетки плода, небольшие фрагменты ворсинок хориона и микрочастицы синцитиотрофобласта [1]. Наличие антигенной стимуляции запускает сложный многоступенчатый процесс дифференцировки клеток адаптивного иммунного ответа, при этом наивные лимфоциты после взаимодействия со специфическим антигеном дифференцируются в эффекторные клетки, и часть из них приобретают свойства клеток памяти [2]. Однако исследований, посвящённых дифференцировке Т-клеток в клетки памяти при беременности, крайне мало.

Известно, что хорионический гонадотропин (ХГ), являясь плацентарным аналогом лютеотропного гормона, продуцируется после оплодотворения клетками трофобласта. ХГ считается одним из основных факторов, формирующих иммунную толерантность во время беременности [3]. Важным аспектом исследования является тот факт, что гормон активно используется в клинической практике, прежде всего у небеременных женщин при дисменорее, дисфункции яичников, ановуляторном бесплодии, недостаточности желтого тела и “суперстимуляции” овуляции при проведении экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) [4]. Однако роль ХГ

в процессах дифференцировки Т-клеток памяти остается неисследованной. Вопрос о линейности дифференцировки Т-лимфоцитов до конца не изучен, тем не менее, считается, что изменение экспрессии изоформ молекул CD45 непосредственно ассоциировано с переходом клеток на различные этапы дифференцировки [5]. Т-лимфоциты, экспрессирующие CD45RA⁺, рассматриваются как наивные Т-клетки, а экспрессирующие CD45RO⁺ как Т-клетки иммунной памяти [6]. В период клональной экспансии происходит активация теломеразы, которая определяет репликативный потенциал клеток [7]. Теломераза состоит из теломеразной обратной транскриптазы (Human Telomerase Reverse Transcriptase, *hTERT*), теломеразной РНК и дискерина [8], а её активность определяется уровнем экспрессии мРНК *hTERT* [7, 9]. Известно, что между активностью теломеразы и степенью дифференцировки Т-клеток существует обратная корреляция [10]. В целом, экспрессия гена *hTERT* ассоциирована с пролиферацией клеток, которая, в свою очередь, сопровождается изменением фенотипических характеристик клеток (размер, гранулярность). Одновременно, в процессе дифференцировки на Т-клетках экспрессируются различные поверхностные маркеры, свидетельствующие об активации (CD25) и пролиферации (CD71) и формирующие определённый фенотип клеток [11].

В связи с вышесказанным, целью исследования являлось изучение влияния ХГ на уровень относительной экспрессии мРНК *hTERT* наивными Т-клетками (CD45RA⁺) и Т-клетками иммунной

* - адресат для переписки

памяти (CD45RO⁺) с параллельной оценкой конверсии фенотипа по пролиферативному статусу и мембранной экспрессии CD25 и CD71 в исследуемых субпопуляциях Т-клеток.

МЕТОДИКА

Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской Декларацией ВМА 2000 г. и протоколом Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г.; оно было одобрено этическим комитетом ИЭГМ УрО РАН (IRB00010009) от 12.06.2016. Со всеми пациентами было подписано добровольное информационное согласие на исследование.

Объекты исследования

В работе использовали фракционированные мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) практически здоровых доноров, которыми являлись небеременные женщины репродуктивного возраста (n=13). МПК получали центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографина (1,077 г/см³) ("Pharmacia", Швеция). Экспериментальная модель, используемая в работе, включала получение изолированных фракций наивных Т-клеток и Т-клеток памяти и культивирование их с исследуемым гормоном в условиях активации с последующей оценкой экспрессии активационных маркеров и мРНК таргетного гена, а также соотношения пролиферирующих и непролиферирующих клеток.

Сепарация CD45RA⁺- и CD45RO⁺-клеток

Монокультуры наивных Т-клеток (CD45RA⁺) и Т-клеток памяти (CD45RO⁺) получали методом иммуномагнитной позитивной сепарации с использованием магнитных частиц CD45RA/CD45RO, human, MACS[®]MicroBeads, колонок MS Columns, сепаратора MiniMACS

Separator и магнитного штатива MultiStand ("Miltenyi Biotec", Германия) из суспензии МПК. В эксперименте использовали клеточные культуры, содержащие CD3⁺CD45RA⁺CD14⁻CD19⁻CD16⁻ и CD3⁺CD45RO⁺CD14⁻CD19⁻CD16⁻ Т-клеток в которых составляло в среднем 98,5±1,5% (рис. 1). Выделенные клетки с фенотипом CD45RA⁺ или CD45RO⁺ (1×10⁶ кл/мл) культивировали в 48-луночных планшетах в полной питательной среде (ППС): RPMI-1640 ("Sigma-Aldrich", США) с добавлением 10% ЭТЦ ("Sigma", США), 10 mM HEPES ("ICN Ph.", США), 2 mM L-глутамин ("ICN Ph.") 5×10⁻⁵ М β-меркаптоэтанол ("AcrosOrganics", США), и 30 мкг/мл гентамицина ("KRKA", Словения) в течение 48 ч при 37°C, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. В работе использовали физиологические концентрации ХГ ("Московский эндокринный завод", Россия) 10 МЕ/мл и 100 МЕ/мл, приближенные к его содержанию в периферической крови во II-III и I триместре беременности, соответственно [12]. В качестве контроля использовали образец, где вместо гормона добавляли ППС.

В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали T-Cell Activation/Expansion Kit human (Ac/Exp) ("Miltenyi Biotec") – антибиотинные частицы MACSiBead[™] с биотинилированными антителами против CD2, CD3, CD28 человека. Определение поверхностных молекул (CD71 FITC, CD25 APC, "Miltenyi Biotec") на CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-клетках проводили на проточном цитофлуориметре MACS Quant ("Miltenyi Biotec"). Гейтирование CD25⁺- и CD71⁺-популяций в культурах клеток представлено на рисунке 2.

Для оценки пролиферативного статуса использовали метод дифференциального гейтирования на графике светорассеяния по размеру и гранулярности клеток [13]. Так, после 48 ч культивирования активированные CD45RO⁺- и CD45RA⁺-клетки были представлены тремя популяциями:

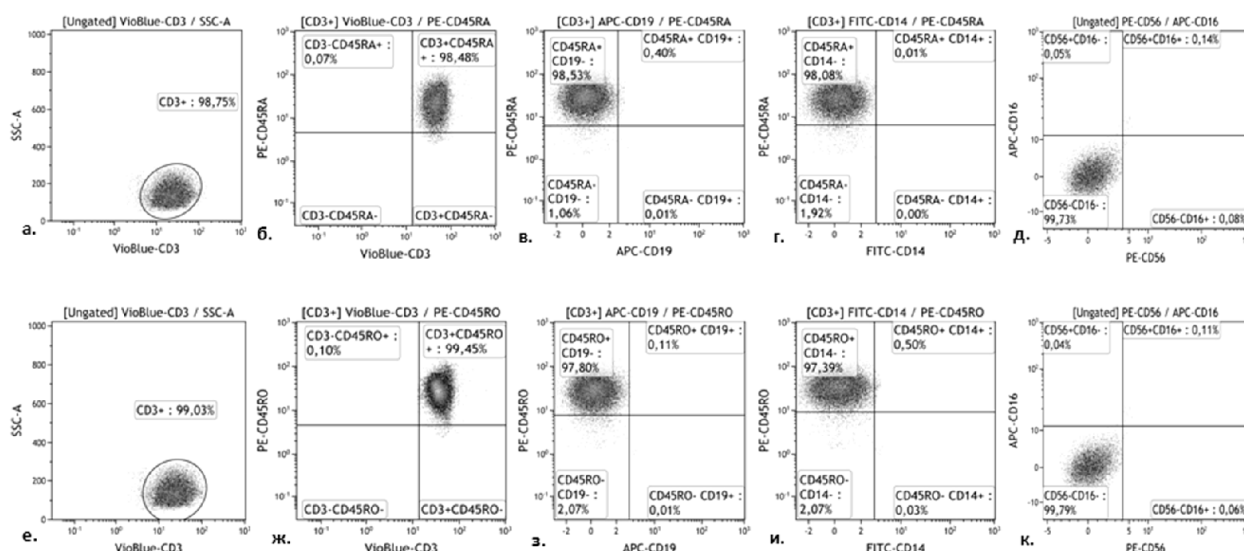


Рисунок 1. Анализ клеточного состава CD45RA⁺ (а-д) и CD45RO⁺ (е-к) популяций, полученных методом иммуномагнитной позитивной сепарации. Показано отсутствие В-лимфоцитов, CD19⁺ (в,з), моноцитов, CD14⁺ (г,и) и NK-клеток, CD56⁺CD16⁺ (д,к).

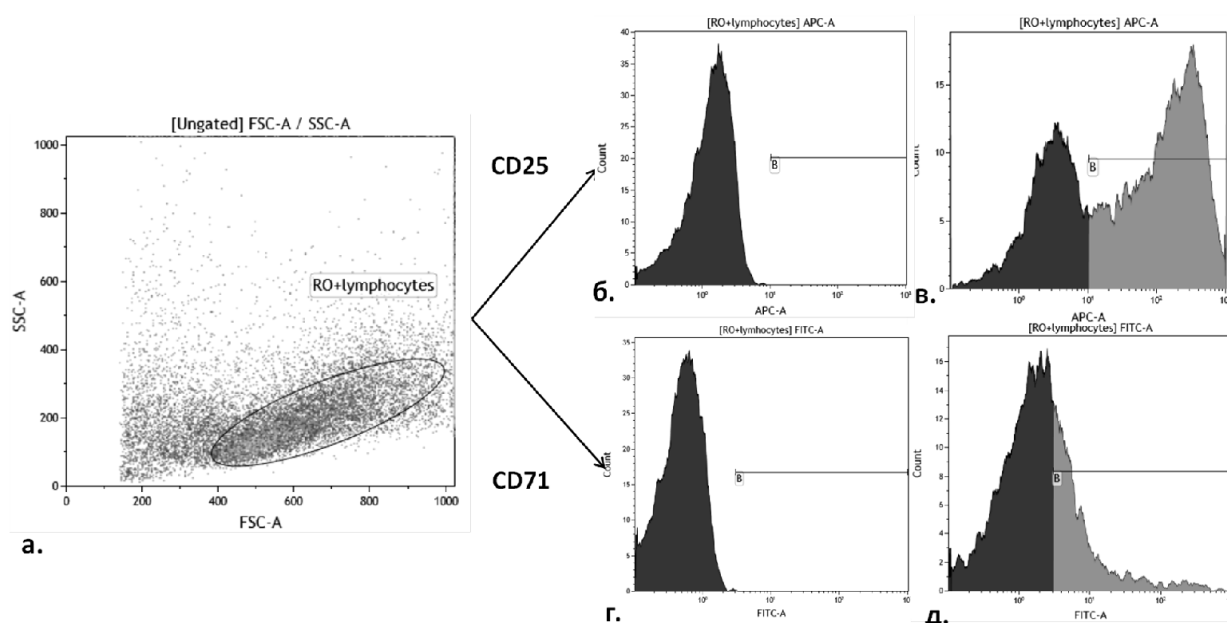


Рисунок 2. Анализ экспрессии поверхностных маркеров CD25 и CD71. Пример гейтирования CD45RO⁺-лимфоцитов после 48-часовой инкубации с активатором на графике светорассеяния (а), CD25⁺-клеток (в) и CD71⁺-клеток (д) на гистограммах. Гейтирование на гистограммах проводили при помощи маркеров, выставленных по FMO (fluorescence minus one) - контролям (б - контроль для CD25, г - контроль для CD71). Анализ поверхностных маркеров RA⁺-лимфоцитов проводили аналогичным образом.

неделяющиеся клетки в характерном для них регионе, пролиферирующие клетки, образующие характерное смещение вправо и вверх [14] и апоптотирующие клетки (рис. 3). Количество клеток внутри каждой популяции выражали в процентах от общего количества клеток. Файлы данных проточной цитометрии были проанализированы с помощью программы “KALUZA Analysis Software” (“Beckman Coulter”, США).

Мультиплексный ПЦР анализ

Оценивали экспрессию мРНК гена каталитической субъединицы *hTERT*, косвенно отражающей активность фермента теломеразы. Выделение тотальной РНК из полученных образцов проводили с использованием реагента ExtractRNA kit (“Евроген”, Россия) согласно протоколу производителя. Реакцию обратной транскрипции осуществляли с использованием праймера oligo(dT)23-primer (20 мкМ) (“Beagle”, Россия) и обратной транскриптазы MMLV (“Евроген”, Россия). Мультиплексный анализ ПЦР проводили с использованием реагентов qPCRMixHS (“Евроген”), специфических зондов TaqMan и праймеров в концентрации 10 пМ (“Beagle”). В качестве матрицы использовались 5 мкл кДНК, в качестве референсного гена – ген GAPDH. Последовательности олигонуклеотидных праймеров представлены в таблице 1.

ПЦР была проведена в трёх повторах с использованием амплификатора LightCycler 480 Real-Time PCR (“Roche”, Швейцария) в следующем режиме: 95°C, 5 мин; 95°C, 20 с; 60°C, 30 с; 72°C, 60 с – 45 циклов, 72°C, 5 мин. Уровень экспрессии мРНК в контрольных и опытных пробах определяли относительно экспрессии референсного

гена с использованием метода $2^{-\Delta C_t}$, вычисляя значение $2^{-(C_t \text{ целевого гена} - C_t \text{ референсного гена})}$, где C_t – пороговый цикл реакции [15]. Результаты выражали в относительных единицах (отношение числа циклов амплификации исследуемого гена к количеству циклов амплификации гена “домашнего хозяйства” GAPDH).

Статистическую обработку полученных результатов для данных проточной цитометрии проводили с помощью парного t-критерия Стьюдента, данные представлены в виде $M \pm \sigma$. Данные, полученные в мультиплексном ПЦР-анализе, представлены в виде медианы с нижним и верхним квартилем $Me(Q1-Q3)$, статистическая обработка проведена с помощью u-критерия Манна-Уитни. Поскольку оценка экспрессии *hTERT* и изучение поверхностных маркеров (CD25, CD71) на клетках проводилась параллельно, между этими данными рассчитали коэффициент корреляции Пирсона. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки эффектов ХГ на молекулярно-генетические характеристики наивных Т-клеток и Т-клеток иммунной памяти использовали активационную модель, которая отражает процесс взаимодействия Т-лимфоцитов с АПК. Присутствие в культуре частиц, имитирующих АПК (Ac/Exp), активирует Т-клетки через молекулы CD2, CD3 и CD28. Вследствие этого формируется иммунный синапс и происходит активация лимфоцитов с последующей дифференцировкой. Наличие интактных проб (без Ac/Exp) позволило нам оценить самостоятельный эффект активации клеток.

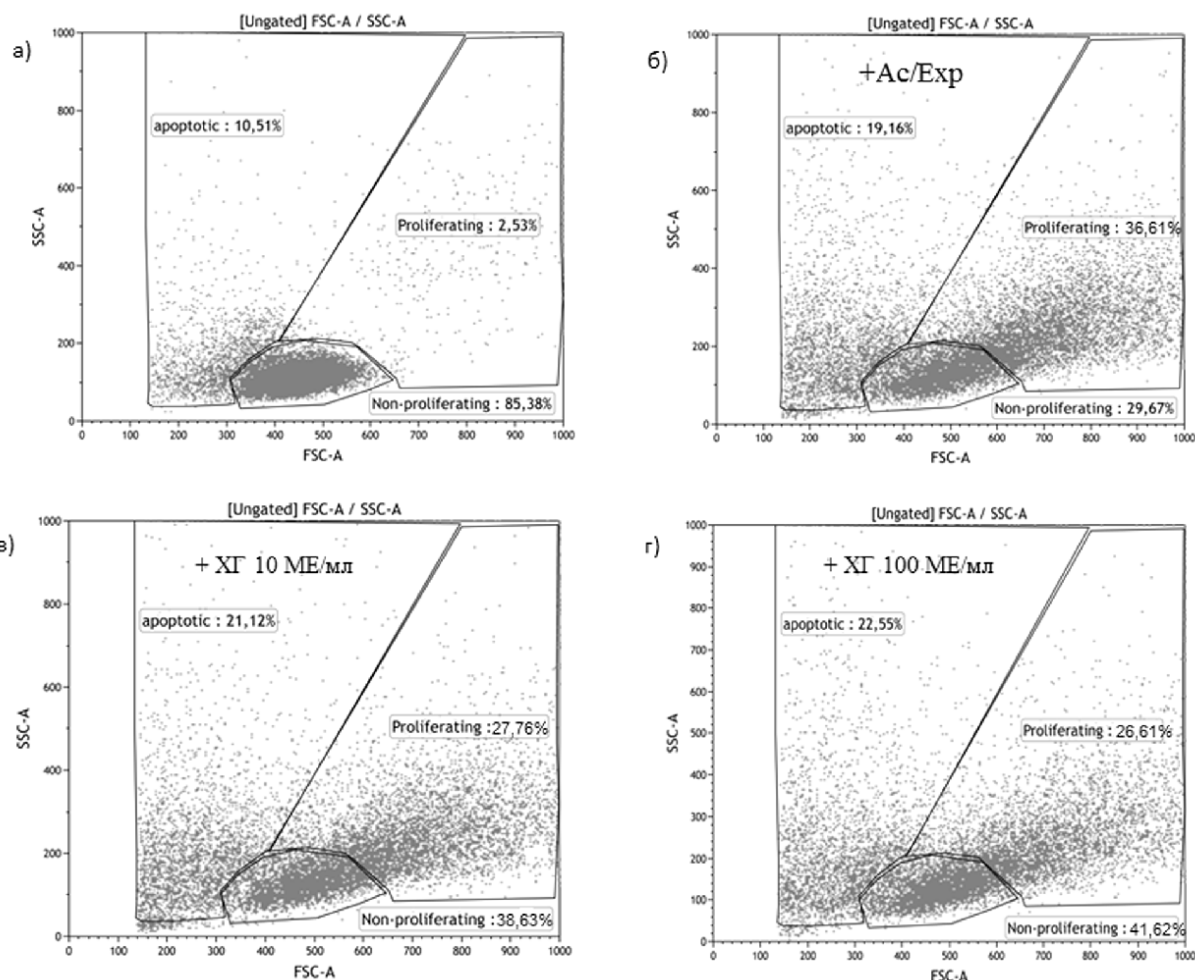


Рисунок 3. Оценка пролиферативного статуса клеток методом дифференциального гейтирования. Показаны изменения процентного состава популяций непродлиферирующих, пролиферирующих и апоптотирующих клеток CD45RO⁺ в контроле без активатора (а), под действием активатора (б) и ХГ (в,г) на примере одного эксперимента. Цифрами указан процент клеток внутри каждой популяции относительно общего количества клеток, принятого за 100%. Анализ пролиферации RA⁺-лимфоцитов проводили аналогичным образом.

Таблица 1. Последовательность нуклеотидов в праймерах, используемых для оценки экспрессии мРНК hTERT

Ген	Последовательность нуклеотидов прямого (for) и обратного (rev) праймеров
hTERT	for 5'-TGACACCTCACCTACCCAC-3' rev 5'-CACTGTCTTCCGCAAGTTCAC-3' probe FAM-5'-ACCCTGGTCCGAGGTGTCCCTGAG-3'-BHQ-1
GAPDH	for 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' rev 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3' GAPDH_probe HEX-5'-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-3'-BHQ-1

Экспрессия мРНК hTERT достоверно повышалась под воздействием Ac/Exp (рис. 4). Это свидетельствует о повышении активности теломеразы в исследуемых субпопуляциях Т-лимфоцитов в условиях активации клеток и подтверждает адекватность выбранной экспериментальной модели. Важно отметить, что не выявлено корреляционных взаимосвязей между показателями экспрессии hTERT и CD25, CD71 в интактных пробах.

Известно, что активность теломеразы определяет репликативный потенциал клеток, в том числе и высокопролиферирующей популяции лимфоцитов

[16]. Резкое увеличение активности hTERT происходит при первичной стимуляции Т-лимфоцитов; последующие циклы активации вызывают меньшую экспрессию hTERT [17]. При изучении влияния ХГ на экспрессию мРНК hTERT установлено, что гормон снижал уровень экспрессии hTERT как на уровне наивных Т-клеток, так и в Т-клетках иммунной памяти (рис. 4). Важно отметить, что в наивных Т-клетках ХГ оказывал супрессивные эффекты в концентрациях 10 МЕ/мл и 100 МЕ/мл, в то время как в Т-клетках памяти экспрессию hTERT угнетала только высокая концентрация гормона.

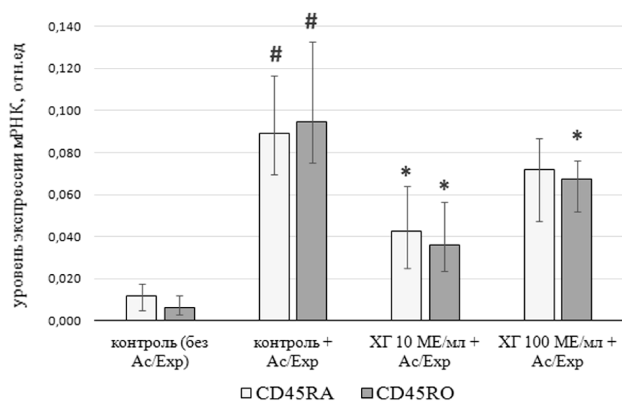


Рисунок 4. Изменение относительного уровня транскрипции гена каталитической субъединицы фермента теломеразы hTERT в наивных Т-клетках (CD45RA⁺) и Т-клетках иммунной памяти (CD45RO⁺) под влиянием активатора (Ас/Ехр) и ХГ (10 и 100 МЕ/мл), М (Q1-Q3, n=10). # - достоверные (p<0,05) по u-критерию Манна-Уитни различия между контролем без Ас/Ехр и контролем+Ас/Ехр, * - между контролем+Ас/Ехр и ХГ+Ас/Ехр.

Пролиферативную активность клеток оценивали при помощи метода дифференциального гейтирования, основанного на разделении клеток по размеру и гранулярности, который позволяет проанализировать именно те клетки, в которых мы оцениваем остальные показатели без дополнительных процедур [13]. Присутствие в культурах активирующих частиц Ас/Ехр приводило к существенному изменению пролиферативного статуса CD45RA⁺- и CD45RO⁺-клеток (рис. 3). Так, количество пролиферирующих клеток достоверно увеличивалось, а число непролиферирующих клеток снижалось, что свидетельствовало об адекватной активации клеток в данных экспериментальных условиях (табл. 2). В отношении апоптотических клеток установлено, что их уровень не изменялся в присутствии как активирующих частиц, так и гормона (табл. 2).

При анализе влияния ХГ на пролиферативный статус клеток установлено, что гормон (10 МЕ/мл и 100 МЕ/мл) снижал количество пролиферирующих CD45RO⁺-клеток, в то же время

не изменяя соотношение пролиферирующих и непролиферирующих клеток в культуре CD45RA⁺-клеток (табл. 2). Важно отметить, что ХГ на уровне наивных Т-клеток (CD45RA⁺) снижал экспрессию hTERT, но не влиял на внешние признаки пролиферативной активности клеток, в то время как на уровне Т-клеток иммунной памяти (CD45RO⁺) гормон снижал количество пролиферирующих клеток и экспрессию hTERT. Так как экспрессия hTERT предшествует видимой пролиферации клеток на уровне наивных Т-клеток, эти процессы, вероятно, разнесены во времени в сравнении со зрелыми Т-клетками. Тем не менее, в целом мы наблюдали снижение репликативного потенциала исследуемых клеток под воздействием ХГ, которое, по-видимому, имеет значение для реализации механизмов иммунной толерантности к антигенам эмбриона.

Известно, что функциональная активность Т-лимфоцитов тесно связана с экспрессией CD25 и CD71 [11]. CD25 (α-цепь рецептора ИЛ-2) представляет собой ранний маркер активации, отражающий способность клетки к дифференцировке и пролиферации, функционально связанный с продукцией ИЛ-2. Молекула CD71, экспрессирующаяся на пролиферирующих клетках, является рецептором к трансферрину, обеспечивающему поступление Fe(III) в клетки [11]. Показано, что самостоятельный эффект активации клеток при помощи Ас/Ехр заключался в значительном повышении экспрессии CD25 и CD71 на поверхности наивных Т-клеток и Т-клеток памяти (рис. 5, 6), что свидетельствует как о ранней активации этих клеток (CD25), так и о запуске пролиферативных процессов (CD71).

ХГ (10 МЕ/мл и 100 МЕ/мл) снижал экспрессию CD25 как в активированных наивных Т-лимфоцитах (CD45RA⁺), так и в активированных Т-клетках иммунной памяти (CD45RO⁺) (рис. 5). Не выявлено корреляционных связей между показателями экспрессии hTERT и CD25 в исследуемых популяциях Т-клеток, как в контроле, так и под воздействием ХГ. Очевидно, что снижение экспрессии CD25 приводит к подавлению взаимодействия с ИЛ-2. Основная роль ИЛ-2 заключается в обеспечении перехода антиген-примированных Т-лимфоцитов из G1 в S-фазу

Таблица 2. Влияние ХГ на пролиферативный статус CD45RA⁺- и CD45RO⁺-лимфоцитов (М±σ, n=13)

Тип клеток (% от общего количества)	Контроль без активатора	Контроль гормона (+Ac/Exp)	Концентрация ХГ, МЕ/мл (+Ac/Exp)	
			10	100
CD45RA ⁺				
Непролиферирующие клетки	70,10±6,11	32,55±14,27 p* $<0,05$	31,80±16,22	32,67±15,25
Пролиферирующие клетки	5,77±1,99	31,90±8,75 p* $<0,05$	30,62±8,49	31,12±8,58
Апоптотирующие клетки	19,39±5,04	22,20±7,26	23,83±8,47	23,57±8,31
CD45RO ⁺				
Непролиферирующие клетки	73,28±7,78	36,84±10,98 p* $<0,05$	40,54±8,81	40,81±10,04
Пролиферирующие клетки	3,59±2,56	32,99±8,04 p* $<0,05$	25,77±6,06 p** $<0,05$	23,84±6,06 p** $<0,05$
Апоптотирующие клетки	18,23±6,91	22,09±4,71	23,17±4,86	24,72±5,39

Примечание: p*<0,05 - достоверные по t-критерию Стьюдента различия между контролем без активатора (Ас/Ехр) и контролем гормона+Ас/Ехр, p**<0,05 - между контролем гормона+Ас/Ехр и ХГ.

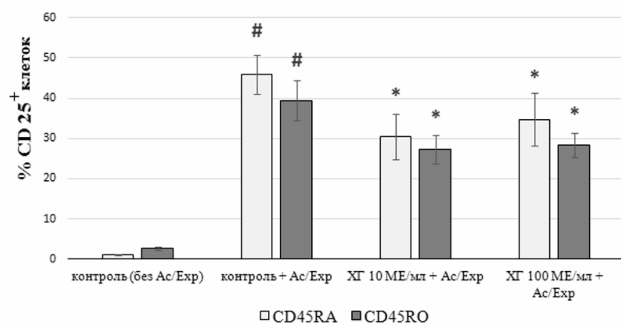


Рисунок 5. Содержание CD25⁺ клеток (%) в культурах наивных Т-клеток и Т-клеток иммунной памяти, культивируемых с Т-клеточным активатором (Ас/Ехр) и разными концентрациями ХГ (М±σ, n=13). # - достоверные (p<0,05) по t-критерию Стьюдента различия между контролем без Ас/Ехр и контролем+Ас/Ехр, * - между контролем+Ас/Ехр и ХГ+Ас/Ехр.

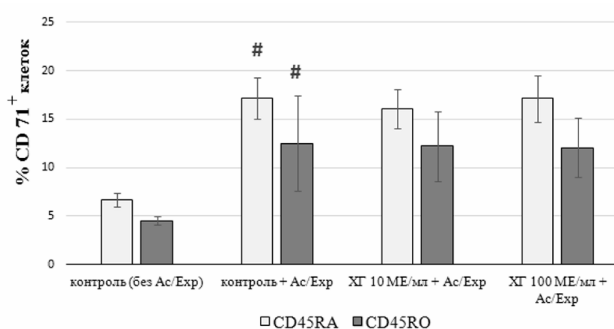


Рисунок 6. Содержание CD71⁺ клеток (%) в культурах наивных Т-клеток и Т-клеток иммунной памяти, культивируемых с Т-клеточным активатором (Ас/Ехр) и разными концентрациями ХГ (М±σ, n=13). # - достоверные (p<0,05) по t-критерию Стьюдента различия между контролем без Ас/Ехр и контролем+Ас/Ехр, * - между контролем+Ас/Ехр и ХГ+Ас/Ехр.

клеточного цикла, что в итоге приводит к их пролиферации [18]. Таким образом, снижение экспрессии CD25 формирует относительную рефрактерность к ИЛ-2, что в итоге может отобразиться и на пролиферативной активности клеток. ХГ не влиял на экспрессию маркера пролиферации CD71 наивными Т-клетками и Т-лимфоцитами иммунной памяти (рис. 6). Однако, корреляционный анализ показал наличие тесной положительной взаимосвязи между экспрессией hTERT и CD71 в Т-клетках памяти (CD45RO), которая появляется под воздействием высокой концентрации гормона (r=0,88; p<0,05).

Как уже было отмечено выше, в нашем исследовании ХГ не влиял на уровень клеток, находящихся в апоптозе (рис. 3, табл. 2). Известно, что активность теломеразы в лимфоцитах человека зависит от активности апоптотических эндонуклеаз, в частности, EndoG [19]. Апоптотическая EndoG принимает участие в процессе альтернативного сплайсинга hTERT, причем сплайс-форма hTERT ингибирует теломеразную активность [цит. по 20]. Сверхэкспрессия EndoG в CD4⁺-лимфоцитах приводит к снижению синтеза полноразмерного активного варианта hTERT, но увеличению экспрессии сплайс-формы [20]. Можно предположить, что в наших экспериментах существует определённый фоновый уровень экспрессии сплайс-формы hTERT в пуле апоптотических клеток, но ХГ, по-видимому, не участвует в регуляции этого процесса.

Ранее нами было показано, что ХГ стимулировал продукцию ИЛ-2 наивными Т-клетками и Т-клетками иммунной памяти [21]. Предполагается, что ИЛ-2-зависимая активация промотора гена hTERT может быть необходима для предотвращения репликативного старения в результате интенсификации пролиферативной активности клеток [7]. Однако очевидно, что под воздействием ХГ этого не происходит, прежде всего, из-за снижения экспрессии CD25.

Известно, что ХГ стимулирует синтез половых стероидных гормонов, в частности, эстрадиола [12].

Ранее нами в аналогичной экспериментальной модели было показано, что β-эстрадиол в концентрациях, соответствующих беременности (10⁻⁷-10⁻⁶ М), угнетал экспрессию мРНК hTERT активированными Т-клетками иммунной памяти [22]. По-видимому, синергичные эффекты ХГ и эстрадиола формируют иммуносупрессию в период беременности, за счёт снижения репликативного потенциала Т-клеток памяти, что подразумевает ограничение иммунной реакции на фетоплацентарные антигены.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При изучении влияния ХГ на репликативный потенциал Т-клеток разной степени дифференцировки, было показано, что гормон (10 МЕ/мл и 100 МЕ/мл) угнетал экспрессию мРНК гена hTERT в наивных Т-клетках (CD45RA⁺), оказывая аналогичный эффект в Т-клетках иммунной памяти (CD45RO⁺), но только в концентрации 100 МЕ/мл. При анализе пролиферативного статуса клеток методом дифференциального гейтирования установлено, что ХГ (10 МЕ/мл и 100 МЕ/мл) снижал количество пролиферирующих Т-клеток иммунной памяти, в то же время, не влияя на пролиферацию клеток в культуре наивных Т-клеток. Одновременно ХГ (10 МЕ/мл и 100 МЕ/мл) подавлял экспрессию CD25 исследуемыми популяциями, формируя, таким образом, резистентность клеток к ИЛ-2. В данной работе впервые установлена роль ХГ в регуляции активности наивных Т-клеток, ассоциированная с подавлением экспрессии hTERT и CD25, а на уровне Т-клеток иммунной памяти не только со снижением экспрессии вышеуказанных показателей, но и с подавлением пролиферации клеток.

Таким образом, в присутствии ХГ происходит конверсия фенотипа наивных Т-клеток и Т-клеток иммунной памяти в менее активные и менее способные к пролиферации. Можно предположить, что в ситуации *in vivo* ХГ снижает количество и активность циркулирующего пула Т-клеток памяти, способных к осуществлению антиген-специфических цитотоксических реакций в отношении антигенов

эмбрионального происхождения. Полученные данные расширяют представления о формировании иммунной толерантности в период беременности и о роли ХГ в этом процессе.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование поддержано грантом РФФИ 16-44-590049, а также программой повышения конкурентноспособности (“дорожной карты”) и субсидией “Организация проведения научных исследований 20.4986.2017/6.7.” БФУ им. И. Канта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Germain S.J., Sacks G.P., Sooranna S.R., Sargent I.L., Redman X.W. (2007) J. Immunol., **178**, 5949-5956.
2. Geginat J., Lanzavecchia A., Sallusto F. (2003) Blood, **101**, 4260-4266.
3. Schumacher A., Heinze K., Witte J., Poloski E., Linzke N., Woidacki K., Zenclussen A. (2013) J. Immunol., **6**, 2650-2658.
4. Casarini L., Brigante G., Simoni M., Santi D. (2016) Prog. Mol. Biol. Transl. Sci., **143**, 85-119.
5. Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A. (2004) Annu. Rev. Immunol., **22**, 745-763.
6. Кудрявцев И.В. (2014) Российский иммунологический журнал, **4**, 947-964.
7. Matsumura-Arioka Y., Ohtani K., Hara T., Iwanaga R., Nakamura M. (2005) Int. Immunol., **2**, 207-215.
8. Cohen S., Graham M., Lovrecz G., Bache N., Robinson P., Reddel R. (2007) Science, **315**, 1850-1853.
9. Benko A.L., Olsen N.J., Kovacs W.J. (2012) Mol. Cell. Endocrinol., **1-2**, 83-88.
10. Henson S.M., Akbar A.N. (2010) Adv. Exp. Med. Biol., **684**, 189-197.
11. Shipkova M., Wieland E. (2012) Clin. Chim. Acta, **17-18**, 1338-1349.
12. Cole L.A. (2012) Reprod. Biol. Endocrinol., **10**, 24.
13. Vesela R., Dolezalova L., Pytlik R., Rychtrmocova H., Mareckova H., Trneny M. (2011) Cellular Immunology, **271**, 78-84.
14. MacDonald H.R., Zaech P. (1982) Cytometry, **3**, 55-58.
15. Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) Methods, **4**, 402-408.
16. Arish N., Cohen P.Y., Golan-Gerstl R., Fridlender Z., Dayan M.R., Zisman P., Breuer R., Wallach-Dayana S.B. (2015) PLoS One, **10**, DOI: 10.1371/journal.pone.0126730.
17. Barsov E.V. (2011) Immunotherapy, **3**, 407-421.
18. Saparov A., Wagner F.H., Zheng R., Maeda H., Hockett R.D., Weaver C.T. (1999) Immunity, **3**, 271-280.
19. Васина Д.А., Жданов Д.Д., Орлова Е.В., Орлова В.С., Покровская М.В., Александрова С.С., Соколов Н.Н. (2017) Биохимия, №1. 76-91.
20. Жданов Д.Д., Васина Д.А., Орлова Е.В., Орлова В.С., Покровская М.В., Александрова С.С., Соколов Н.Н. (2016) Биомед. химия, **5**, 544-554. DOI: 10.18097/pbmc20166205544.
21. Заморина С.А., Литвинова Л.С., Юрова К.А., Дунец Н.А., Хазиахматова О.Г., Тимганова В.П., Бочкова М.С., Храмов П.В., Раев М.Б. (2017) Вестник Пермского университета. Серия: Биология, №1, 104-111.
22. Khaziakhmatova O.G., Shupletsova V.V., Yurova K.A., Sokhnevich N.A., Litvinova L.S. (2014) in: The Third European Conference on Biology and Medical Sciences, 184-189.

Поступила: 13. 06. 2017.
Принята к печати: 08. 09. 2017.

THE INFLUENCE OF CHORIONIC GONADOTROPIN ON PHENOTYPE CONVERSION AND hTERT GENE EXPRESSION BY T-LYMPHOCYTES OF DIFFERENT DEGREES OF DIFFERENTIATION

M.B. Rayev^{1,3}, S.A. Zamorina^{1,3}, L.S. Litvinova², K.A. Yurova², O.G. Khaziakhmatova², V.P. Timganova¹,
M.S. Bochkova¹, M.D. Kropaneva³, P.V. Khramtsov^{1,3}

¹Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS,
13 Goleva str., Perm, 614081 Russia; e-mail: mantissa7@mail.ru

²Kant Baltic federal university, Kaliningrad, Russia

³Perm State National Research University, Perm, Russia

The effects of chorionic gonadotropin (hCG) on the expression of the hTERT gene in combination with the conversion of the phenotype of naive T-cells and T-cells of immune memory *in vitro* were studied. hCG inhibited expression of hTERT mRNA in naive T-cells (CD45RA⁺) and immune memory T cells (CD45RO⁺), causing a decrease in the replicative potential of the cells. The presence of hCG in the culture led to the conversion of the phenotype of T-lymphocytes. hCG reduced the number of proliferating T-cells of immune memory, estimated by phenotypic signs by differential gating. hCG (10 IU/ml and 100 IU/ml) inhibited expression of CD25 by the studied populations, but did not modulate expression of the CD71 proliferation marker. Thus, hCG inhibited the functional activity of naive T-cells and T-cells of immune memory, which, in the context of pregnancy, can contribute to the formation of immune tolerance to the semi-allogenic fetus.

Key words: human chorionic gonadotropin (HCG), naive T cells, memory T-cells, CD71, CD25, *hTERT*, proliferation