

©Коллектив авторов

РОЛЬ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА В РЕГУЛЯЦИИ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ АКТИВИРОВАННЫХ Т-ХЕЛПЕРОВ И ИХ КОНВЕРСИИ В ФЕНОТИП Th17

С.А. Заморина^{1,2}, В.П. Тимганова¹, Л.С. Литвинова³, Н.М. Тодосенко³, М.С. Бочкова¹, К.Ю. Шардина², П.В. Храпцов^{1,2,3}, М.Б. Раев^{1,2}, В.А. Черешнев^{1,2}*

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов – филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, 614081, Пермь, ул. Голева, 13; *эл. почта: mantissa7@mail.ru

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, 614990, Пермь, ул. Букирева, 15

³Балтийский федеральный университет им. И. Канта, 236016, Калининград, ул. А. Невского, 14

Исследовали влияние нативного (не рекомбинантного) препарата альфа-фетопротеина (АФП) на дифференцировку, пролиферацию и цитокиновый профиль активированных Т-хелперов 17 типа (Th17). Объектом исследования служили изолированные методом иммуномагнитной сепарации культуры “наивных” Т-хелперов (CD4⁺), которые индуцировали в фенотип Th17 при помощи TCR-активатора и провоспалительных цитокинов (IL-1β и IL-6). АФП не оказывал достоверного влияния на уровень Th17-клеток в культуре (CD4⁺ROR-γт⁺), и не влиял на пролиферацию этих клеток, оцениваемую по экспрессии Ki-67. При оценке цитокинового профиля по технологии “Luminex xMAP” установлено, что АФП не влиял на уровни IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-10, IL-17, IFN-γ и TNF-α, но в концентрациях 50 МЕ/мл и 100 МЕ/мл повышал продукцию IL-2 активированными Т-хелперами. В то же время АФП подавлял синтез G-CSF и GM-CSF (10 МЕ/мл), но стимулировал продукцию хемокинов CCL4/MIP-1β (100 МЕ/мл) и CCL2/MCP-1 (10 МЕ/мл и 50 МЕ/мл).

Ключевые слова: альфа-фетопротеин (АФП); цитокины; IL-17-продуцирующие лимфоциты (Th17); пролиферация; Т-хелперы; ROR-γт; Ki-67

DOI: 10.18097/PBMC20196504347

ВВЕДЕНИЕ

Во время беременности иммунная система матери подвергается аллоиммунизации фетоплацентарными антигенами. В результате формируется динамическое состояние иммунной толерантности, в поддержании которого важную роль играют белки, ассоциированные с беременностью. Альфа-фетопротеин (АФП) – одноцепочечный гликопротеин (с молекулярной массой 68-75 кДа и содержанием углеводов 3-5%), который синтезируется в период раннего развития эмбриона в желточном мешке, а затем в печени и желудочно-кишечном тракте плода. Во время беременности концентрация АФП в крови растёт, достигая значений 150-250 МЕ/мл, после родов его уровень резко снижается [1]. Известно, что АФП способен проникать через фетоплацентарный барьер в материнский кровоток, а изменение его уровня используется как диагностический тест для обнаружения некоторых аномалий развития плода. Помимо этого, АФП является также опухолевым маркёром, ассоциированным с первичным раком печени и гепатокарциномой [1].

Хотя иммуносупрессивные эффекты АФП известны [2-4], его роль в формировании иммунной толерантности в период беременности остаётся мало изученной [5]. Тем не менее, за последние годы было выявлено несколько новых фактов об иммуномодулирующем действии АФП. Так, Alisa и соавт. продемонстрировали, что АФП может содержать специфические эпитопы, которые активируют экспансию регуляторных Т-клеток (Treg),

продуцирующих индуцибельный трансформирующий фактор роста (TGF)-β [6]. Антигенпрезентирующие клетки (АПК) пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой с высоким сывороточным уровнем АФП дисфункциональны и склонны к апоптозу [7]. В отношении NK-клеток (NK – натуральные киллеры, NK-клетки; англ. Natural killer cells, NK cells) известно, что АФП способен подавлять их цитотоксическую активность, но эти эффекты фиксируются только в присутствии дендритных клеток (ДК) [8]. В 2016 году стало известно, что АФП в эмбриональных концентрациях участвует в контроле функций В-регуляторных лимфоцитов, вызывая апоптоз этих клеток [9].

Ранее нами показано, что нативный препарат АФП способен снижать количество не пролиферирующих Treg [10]. В то же время, АФП препятствовал конверсии наивных Т-хелперов в эффекторные субпопуляции Т-клеток памяти, одновременно снижая суммарную продукцию IL-4 и IFN-γ исследуемыми популяциями [11].

Однако до сих пор не исследована роль АФП в регуляции функций и дифференцировки провоспалительной субпопуляции продуцирующих IL-17 Т-хелперов (Th17). Известно, что физиологическая беременность сопровождается снижением Th17 в периферической крови в сравнении с небеременными женщинами [12]. Повышение уровня Th17, в свою очередь, ассоциировано с патологическими процессами и может приводить к преждевременным родам или спонтанному аборту [13]. IL-17, являясь основным цитокином Th17, индуцирует синтез

РОЛЬ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА В КОНВЕРСИИ Т-ХЕЛПЕРОВ В ФЕНОТИП Th17

IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 и ряда других воспалительных факторов, инициируя, таким образом, развитие воспалительной реакции. Известно, что IL-17 играет важную роль в патофизиологии ревматоидного артрита [14], а во время беременности симптомы этого заболевания становятся менее выраженными. Кроме этого, цитокиновая сеть непосредственно участвует в формировании иммунологической толерантности, выполняя функцию межклеточной коммуникации и интегративную роль в период беременности [15].

Таким образом, целью работы была оценка влияния АФП на конверсию наивных Т-хелперов в фенотип Th17, с одновременной оценкой цитокинового профиля этих клеток.

МЕТОДИКА

Объекты исследования

В работе использовали CD4⁺ клетки, выделенные из мононуклеаров периферической крови (МПК) небеременных женщин репродуктивного возраста (n=12), и физиологические концентрации (10 МЕ/мл, 50 МЕ/мл и 100 МЕ/мл) нативного (не рекомбинантного) препарата АФП (“Биалекса”,

Россия), полученного из сыворотки крови беременных женщин. Концентрации АФП соответствовали таковым в периферической крови матери в динамике беременности [16].

Выделение CD4-клеток

МПК получали центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографина (1,077 г/см³) (“Pharmacia”, Швеция). Для получения монокультур CD4⁺ Т-клеток из суспензии МПК был использован метод иммуномагнитной сепарации, в основе которого лежит технология MACS® (“Miltenyi Biotec”, Германия). После сепарации оценивали количество клеток и их жизнеспособность с использованием красителя Trypan blue 0,4% (“Invitrogen”, США). Далее в полученной суспензии CD4⁺ Т-клеток определяли количество Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) и остаточное количество моноцитов (CD14⁺), NK-клеток (CD3⁻CD16/56⁺), В-лимфоцитов (CD3⁻CD19⁺), цитотоксических лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺) (рис. 1). Жизнеспособность составляла не менее 95-98% от общего числа клеток. В эксперименте использовали клеточные культуры, содержание CD3⁺CD4⁺ Т-клеток в которых составляло в среднем 97,5 \pm 1,5%.

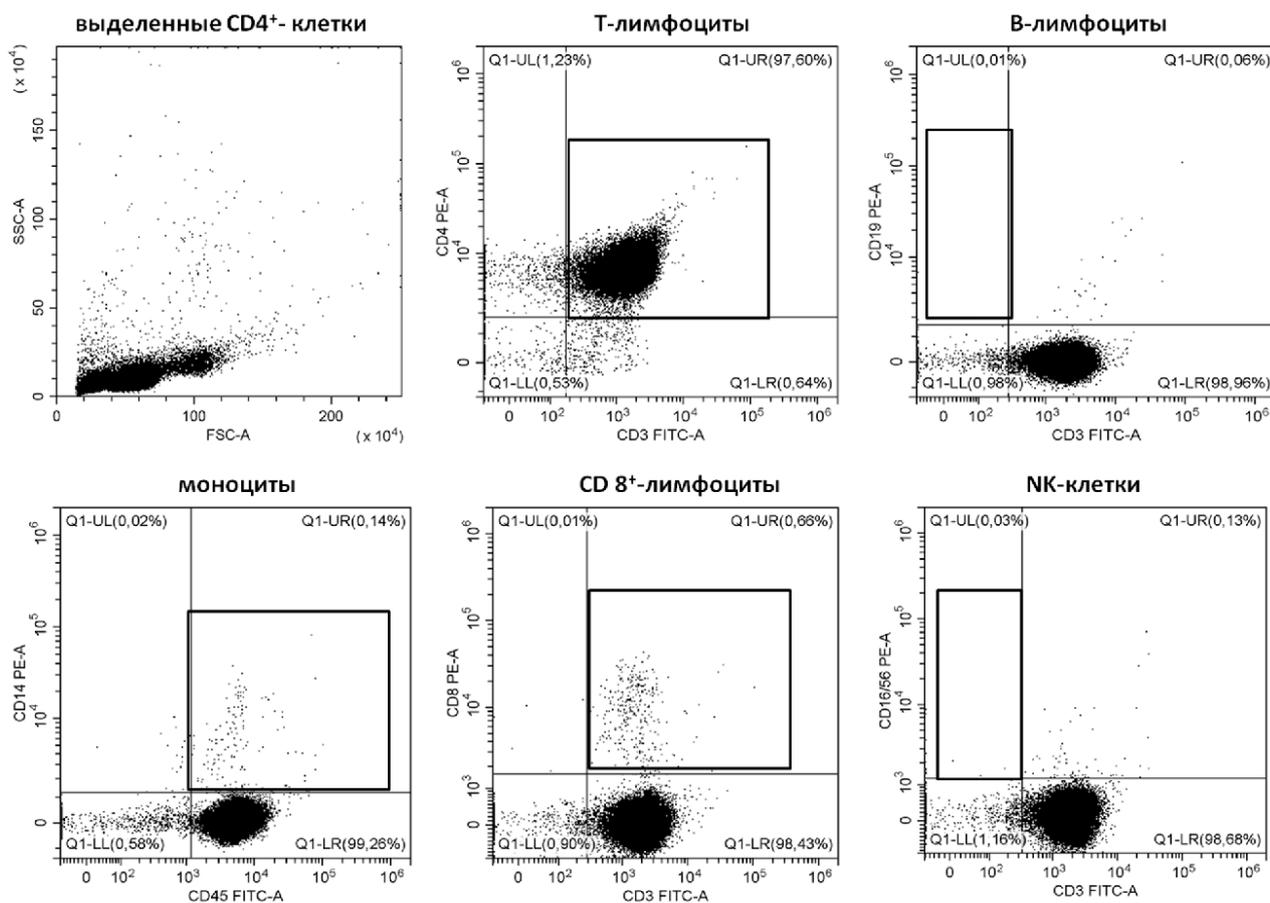


Рисунок 1. Подтверждение чистоты полученных при помощи иммуномагнитной сепарации суспензий CD4⁺ Т-клеток. Представлены репрезентативные двухпараметрические графики одного эксперимента. Показан процент Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) и примесь других клеток (В-лимфоцитов, моноцитов, CD8⁺-лимфоцитов, NK-клеток). Соответствующие популяции выделены прямоугольниками.

Культивирование CD4-клеток

Выделенные Т-хелперы культивировали в 48-луночных планшетах (концентрация 10^6 клеток/мл) в полной питательной среде (ППС), содержащей RPMI-1640 с L-глутамином, (“Sigma-Aldrich”, США), 10% ЭТС (“Sigma-Aldrich”), 10 мМ Hepes (“Amresco”, США) и 30 мкг/мл гентамицина (“KRKA”, Словения), в течение 48 ч при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂.

Индукция лимфоцитов в фенотип Th17

Для индукции лимфоцитов в фенотип Th17 в культуры вносили рекомбинантные цитокины IL-1β и IL-6 (конечная концентрация 10 нг/мл, “Miltenyi Biotec”) [17]. В качестве активатора Т-лимфоцитов через Т-клеточный рецептор (T-cell receptor, TCR) использовали “T-Cell Activation/Expansion Kit, human” (TCR-активатор) (“Miltenyi Biotec”) – частицы MACSiBead™, нагруженные антителами против CD2⁺, CD3⁺, CD28⁺ человека. Основным транскрипционным фактором Th17 является ROR-γт (retinoic acid receptor (RAR)-related orphan receptor) [18, 19]. Поэтому после 72 ч инкубации оценивали количество Th17 как процент CD4⁺-лимфоцитов (CD4-FITC, “Miltenyi Biotec”), экспрессирующих транскрипционный фактор ROR-γт (Anti RORγт-PE, “Miltenyi Biotec”). Экспрессию ROR-γт оценивали одновременно с маркером пролиферации Ki-67 (anti-Ki-67 PerCP-Vio700, “Miltenyi Biotec”) после пермеабилзации клеток согласно инструкции к буферам (“BioLegend”, США). Измерения проводили на проточном цитофлуориметре CytoFLEX S (“Beckman Coulter”, США).

В качестве контроля использовали культуру, в которую вместо АФП добавляли ППС. Контроль активации (клетки и ППС без TCR-активатора и цитокинов) использовали для подтверждения работы экспериментальной схемы.

Оценка пролиферативного статуса

Для оценки пролиферативного статуса использовали метод дифференциального гейтирования

на графике светорассеяния по размеру и гранулярности клеток [20]. После 48 ч культивирования CD4⁺-клетки были представлены тремя популяциями: неделяющиеся клетки (гейт Н) в характерном для них регионе, пролиферирующие клетки (гейт П), образующие характерное смещение вправо и вверх [21] и апоптотирующие клетки (гейт А) (рис. 2). TCR-активация клеток в присутствии провоспалительных цитокинов (IL-1β и IL-6) приводила к перераспределению клеток в пользу пролиферирующих. Количество клеток внутри каждой популяции выражали как процент от общего количества клеток. Файлы данных были обработаны в программе CytExpert 2.0 (“Beckman Coulter”).

Оценка цитокинового профиля

После 48 ч инкубации методом проточной флуориметрии (мультиплексный анализ, “Luminex xMAP”) в супернатантах культур Th17-клеток определяли содержание следующих цитокинов и хемокинов: IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-10, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, MCP-1, MIP-1β, TNF-α. Метод основан на мультиплексной иммунной реакции, протекающей на микрочастицах с сорбированными на них соответствующими антителами, с их последующим проточным флуоресцентным анализом и одновременным определением концентрации исследуемых цитокинов. Процедуры осуществляли согласно протоколу Bio-Plex Pro Human Th17 Cytokine Panel. Результаты регистрировали с помощью автоматического фотометра для микропланшетов Bio-Plex (Bio-Plex® 200 Systems, “Bio-Rad”, США) и программы Bio-Plex Manager (“Bio-Rad”).

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 6 при помощи критерия Вилкоксона. Результаты представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей (Me (Q1-Q3)). В ряде случаев рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

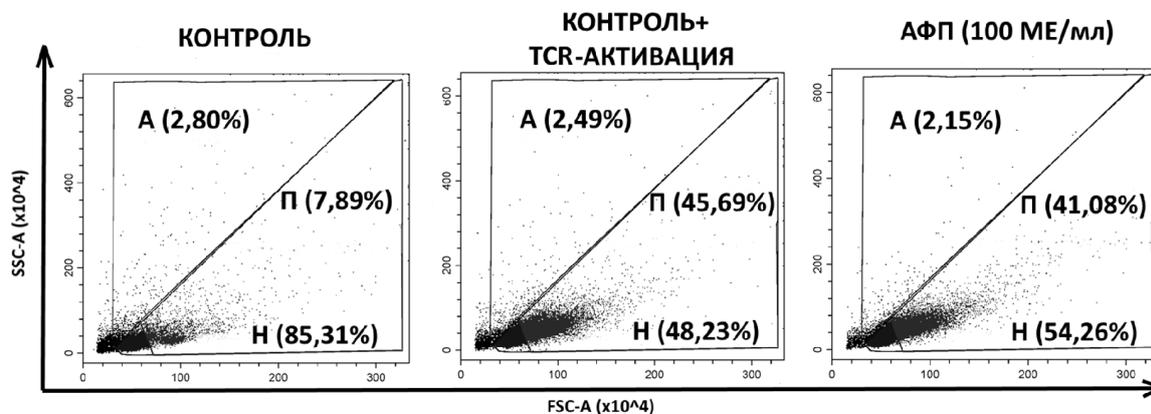


Рисунок 2. Оценка пролиферативного статуса методом дифференциального гейтирования. На точечных графиках показаны изменения процентного состава популяций не пролиферирующих (Н), пролиферирующих (П) и апоптотирующих (А) CD4⁺-клеток под действием активатора и АФП в концентрации 100 МЕ/мл на примере одного эксперимента. Цифрами указан процент клеток внутри каждой популяции относительно общего количества клеток, принятого за 100%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки эффектов АФП на дифференцировку, пролиферацию и продукцию цитокинов Т-хелперами использовали активационную модель (рис. 3), которая имитирует процесс взаимодействия Т-лимфоцитов с АПК в присутствии провоспалительных цитокинов (IL1β+IL6) [17]. Взаимодействие Т-хелперов с TCR-активатором, заменяющим в системе *in vitro* АПК, инициирует такие процессы, как активация, дифференцировка и продукция цитокинов.

Влияние АФП на пролиферацию и дифференцировку Th17

Первым этапом работы стало изучение влияния АФП на пролиферацию активированных Т-хелперов методом дифференциального гейтирования. Установлено, что самостоятельный эффект TCR-активации в присутствии провоспалительных цитокинов (IL-1β и IL-6) заключался в существенном увеличении процента пролиферирующих CD4⁺-клеток (с 11,32 (9,32-15,63) до 42,33 (34,03-50,14)), которое сопровождалось одновременным снижением процента не пролиферирующих клеток (с 83,56 (77,85-97,53) до 47,84 (39,47-53,57)); при этом уровень апоптотирующих клеток не изменялся. В целом,

это свидетельствует об адекватной активации CD4⁺-клеток в представленной экспериментальной модели (рис. 2; табл. 1). Важно отметить, что полученные данные согласуются с результатами аналогичных экспериментов, в которых мы изучали пролиферацию TCR-активированных Т-хелперов в присутствии IL-2 [11].

Внесение в культуры активированных лимфоцитов АФП в концентрациях 10 МЕ/мл, 50 МЕ/мл и 100 МЕ/мл не влияло на соотношение пролиферирующих и не пролиферирующих клеток (табл. 1). Таким образом, АФП в нашем исследовании не регулирует пролиферативный статус активированных CD4⁺-лимфоцитов, индуцированных в фенотип Th17.

При изучении влияния АФП на дифференцировку Th17 установлено, что АФП в концентрациях, соответствующих триместрам беременности, не влияет на количество CD4⁺-лимфоцитов, экспрессирующих транскрипционный фактор ROR-γт (табл. 2). Известно, что ROR-γт индуцируется во время дифференцировки антиген-стимулированных Т-хелперов в направлении Th17 в ответ на IL-6. IL-6, в свою очередь, опосредует своё действие с помощью активации сигнального белка и активатора транскрипции STAT3 [6]. Важным

ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ
[Активационная модель *in vitro*]

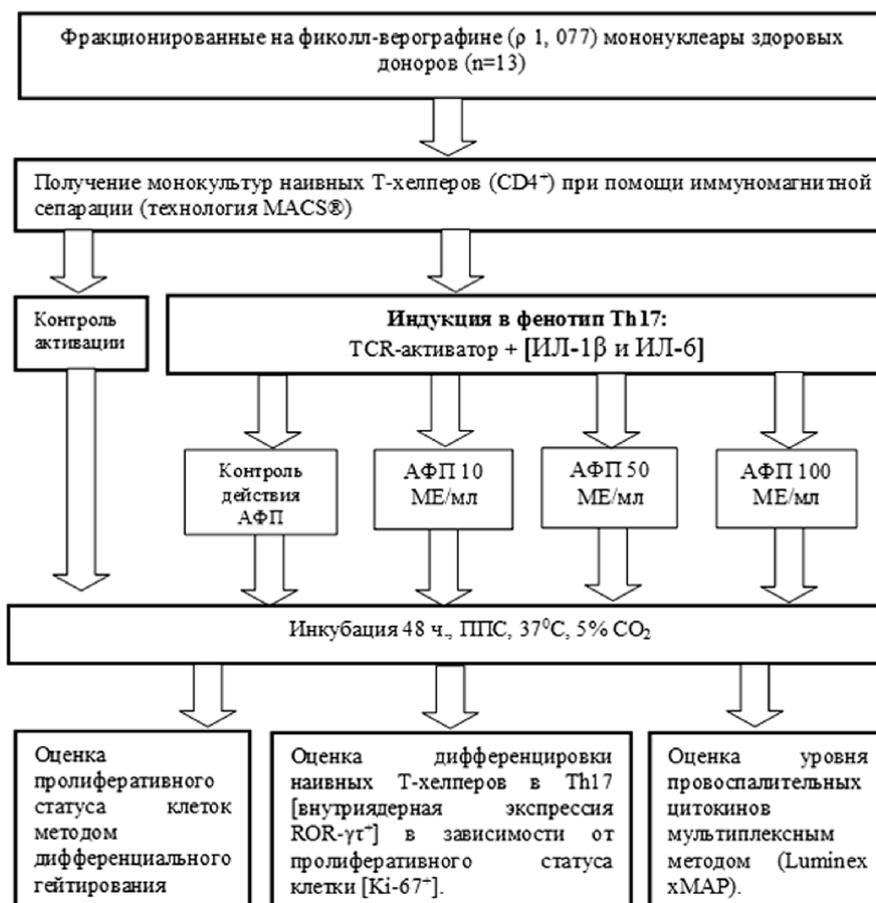


Рисунок 3. Экспериментальный дизайн изучения роли АФП в регуляции дифференцировки, пролиферации и цитокинового профиля Th17-клеток.

Таблица 1. Изучение влияния АФП на пролиферативный статус TCR-активированных CD4⁺-лимфоцитов (n=14, Ме (Q1–Q3))

% клеток	Контроль (без активаторов)	(+ TCR-активатор, IL-1β, IL-6)			
		Контроль	АФП 10 МЕ/мл	АФП 50 МЕ/мл	АФП 100 МЕ/мл
Не пролиферирующие клетки	83,56 (77,85–97,53)	47,84* (39,47–53,57)	43,62 (37,04–50,28)	42,34 (37,70–49,74)	45,26 (39,18–49,31)
Пролиферирующие клетки	11,32 (9,32–15,63)	42,33* (34,03–50,14)	44,76 (40,85–51,84)	46,26 (41,55–51,65)	43,15 (40,56–50,03)
Апоптозирующие клетки	8,12 (7,34–11,45)	9,88 (9,23–12,72)	9,63 (8,87–12,21)	9,19 (8,91–12,21)	9,78 (8,90–11,87)

Примечание: * – достоверные (p<0,05) по w-критерию Вилкоксона различия между контролем без активатора и контролем с активаторами.

Таблица 2. Влияние АФП на экспрессию ROR-γт и Ki-67 в популяции TCR-активированных CD4⁺-лимфоцитов (n=14, Ме (Q1–Q3))

	Контроль (без активаторов)	ROR-γт ⁺ , %	Ki-67 ⁺ , %	ROR- γт ⁺ Ki-67, %	ROR- γт ⁺ Ki-67 ⁺ , %
				12,77 (10,23–16,54)	0,93 (0,26–1,76)
(+TCR-активатор; +IL-1β и IL-6)	Контроль	77,25* (73,73–83,48)	64,20* (47,45–68,10)	11,83 (8,71–22,82)	63,53* (47,13–66,64)
	АФП 10 МЕ/мл	76,11 (73,74–78,42)	62,76 (61,09–68,01)	12,53 (8,78–16,95)	61,91 (60,10–67,30)
	АФП 50 МЕ/мл	75,86 (63,11–79,58)	64,21 (55,19–67,59)	10,55 (8,66–12,75)	63,26 (54,51–66,78)
	АФП 100 МЕ/мл	76,34 (69,60–80,24)	64,28 (39,95–66,99)	12,39 (8,57–16,32)	63,25 (39,03–66,51)

Примечание: представлено процентное содержание клеток в популяции CD4⁺-Т-лимфоцитов; * – достоверные (p < 0,05) по w-критерию Вилкоксона различия между контролем без активатора и контролем с активаторами.

фактором дифференцировки этих клеток является также IL-1β, который может усиливать действие IL-6 и IL-23. Из этих факторов складывается стимул для дифференцировки наивных Т-лимфоцитов в Th17 [13]. Для дифференцировки Th17-клеток, как и для любых других Т-хелперов, важны сигналы, поступающие от TCR, и его активация является ключевым фактором в индукции Th17. TCR-активация индуцирует транскрипционные факторы NFAT, NF-κB и AP-1, которые необходимы для продукции провоспалительных цитокинов Th17-клетками [22].

Процессы дифференцировки Th17 сопровождаются активной пролиферацией этих клеток [22]. Поэтому мы оценили также уровень внутриклеточной экспрессии Ki-67, который появляется в активно пролиферирующих клетках, вышедших из состояния покоя. Показано, что самостоятельный эффект TCR-активации в присутствии провоспалительных цитокинов (IL-1β и IL-6) заключался в значительном (более, чем в 60 раз) увеличении количества клеток, экспрессирующих Ki-67 (табл. 2). Однако АФП не оказывал достоверного влияния на экспрессию данного белка. В целом, эти и полученные методом дифференциального гейтирования данные подтверждают отсутствие способности АФП регулировать процессы пролиферации Т-хелперов.

Далее был проведен анализ влияния АФП на экспрессию ROR-γт в зависимости от пролиферативного статуса клеток. Для этого был определен процент ROR-γт-позитивных Т-хелперов

в пролиферирующих (Ki-67⁺) и в не пролиферирующих (Ki-67⁻) пулах клеток (рис. 4, табл. 2). Показано, что АФП не влияет на количество пролиферирующих и не пролиферирующих Th17-клеток.

Таким образом, АФП в условиях направленной индукции Т-хелперов в фенотип Th17 при помощи провоспалительных цитокинов и TCR-активатора не регулирует пролиферацию и дифференцировку Th17.

Влияние АФП на цитокиновый профиль Т-хелперов, индуцированных в фенотип Th17

Самостоятельный эффект активации клеток заключался в достоверном повышении продукции следующих цитокинов: IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, MIP-1β, TNF-α (данные не представлены), что свидетельствует об адекватности стимуляции клеток. Несмотря на то, что клеточные культуры активированных Т-хелперов более чем на 70% состояли из Th17 клеток (CD4⁺ROR-γт⁺; табл. 2), нельзя однозначно утверждать, что именно эти клетки продуцируют изучаемые цитокины. Для уточнения данного вопроса в ряде случаев был проведен корреляционный анализ между уровнем цитокинов и количеством Th17 клеток в контексте полученных достоверных эффектов, которые оказывал АФП в отношении цитокинов.

При анализе цитокинового профиля было установлено, что АФП не влиял на уровень IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-10, IL-17, IFN-γ и TNF-α. Однако под воздействием АФП в концентрациях 50 МЕ/мл и 100 МЕ/мл продукция IL-2

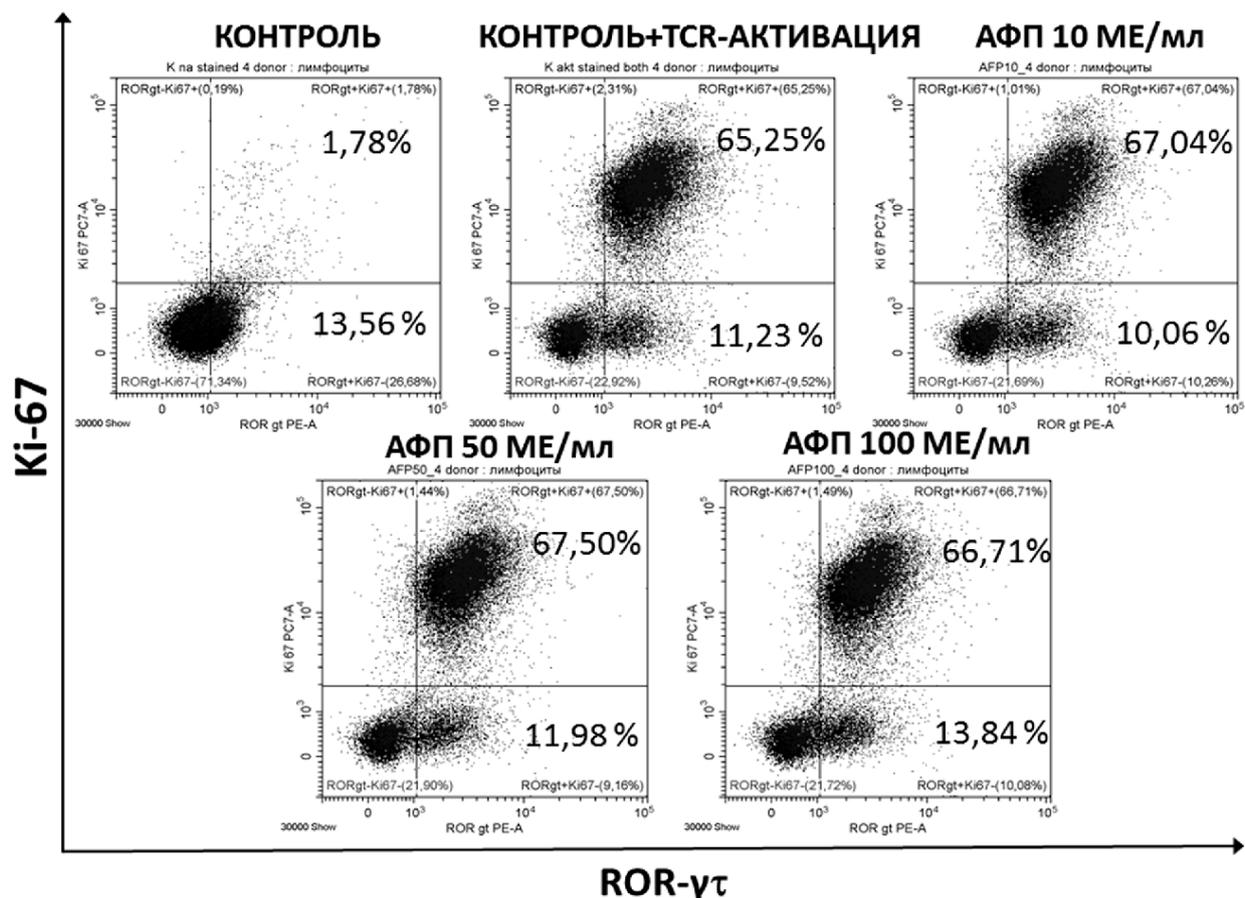


Рисунок 4. Изучение влияния АФП на уровень пролиферирующих (CD4⁺ROR-γt⁺Ki-67⁺) и не пролиферирующих (CD4⁺ROR-γt⁺Ki-67⁻) Th17-клеток. Представлены репрезентативные двухпараметрические графики одного эксперимента. Контроль – культура CD4⁺ клеток без АФП, цитокинов и TCR-активатора. Контроль+TCR-активация – контроль действия АФП, культуры с TCR-активатором, IL-1β и IL-6. В правом верхнем квадранте представлен процент CD4⁺ROR-γt⁺Ki-67⁺-клеток, в правом нижнем – процент CD4⁺ROR-γt⁺Ki-67⁻-клеток.

в культурах активированных Т-хелперов повышалась. Помимо этого, низкая концентрация АФП (10 МЕ/мл) снижала продукцию колониестимулирующих факторов G-CSF и GM-CSF (рис. 5). В отношении продукции хемокинов установлено, что высокая концентрация АФП (100 МЕ/мл) стимулировала продукцию CCL4 (MIP-1β), а низкие концентрации (10 МЕ/мл и 50 МЕ/мл) стимулировали продукцию CCL2 (MCP-1) (рис. 5).

В контексте данной работы важно отметить, что АФП не влиял на продукцию ключевого для Th17 цитокина IL-17, что согласуется с представленными выше данными о дифференцировке этих клеток. Кроме того, не выявлено достоверных корреляционных связей между уровнем IL-17 в супернатантах культур активированных Т-хелперов и уровнем экспрессии ROR-γt в этих клетках: контроль (r=0,06); АФП 10 МЕ/мл (r=-0,05); АФП 50 МЕ/мл (r=0,07); АФП 100 МЕ/мл (r=-0,24).

Известно, что активация Т-лимфоцитов тесно связана с аутокринной продукцией IL-2, который, в свою очередь, является одним из ключевых цитокинов, запускающим пролиферацию Т-клеток и их дифференцировку. IL-2 необходим для развития регуляторных Т-лимфоцитов, увеличение количества которых ассоциировано с успешной

беременностью [23]. Известно, что современная парадигма предполагает преобладание Treg над Th17 во время нормальной беременности, что необходимо для обеспечения фетопротекции [24]. Таким образом, повышение уровня IL-2 под воздействием АФП может играть важную роль в процессе формирования иммунной толерантности. Корреляционный анализ между уровнем IL-2 в супернатантах культур активированных Т-хелперов и процентом ROR-γt⁺-клеток в этих культурах показал наличие обратной корреляционной связи для АФП 50 МЕ/мл (r=-0,37; p<0,05) и АФП 100 МЕ/мл (r=-0,63; p<0,05). Это позволяет нам предположить, что основными продуцентами IL-2 в данном случае являются Th1-клетки.

Известно, что GM-CSF вовлечён в обеспечение имплантации и прогрессирования беременности *in vivo*, и его экспрессия повышается в матке и в сыворотке в период оплодотворения, имплантации и на ранних сроках беременности [25]. Экспрессия GM-CSF запускается хорионическим гонадотропином [25], основным гормоном беременности плацентарного происхождения. АФП, наряду с другими белками беременности, по-видимому, осуществляет реципрокную регуляцию синтеза GM-CSF. Не выявлено достоверных

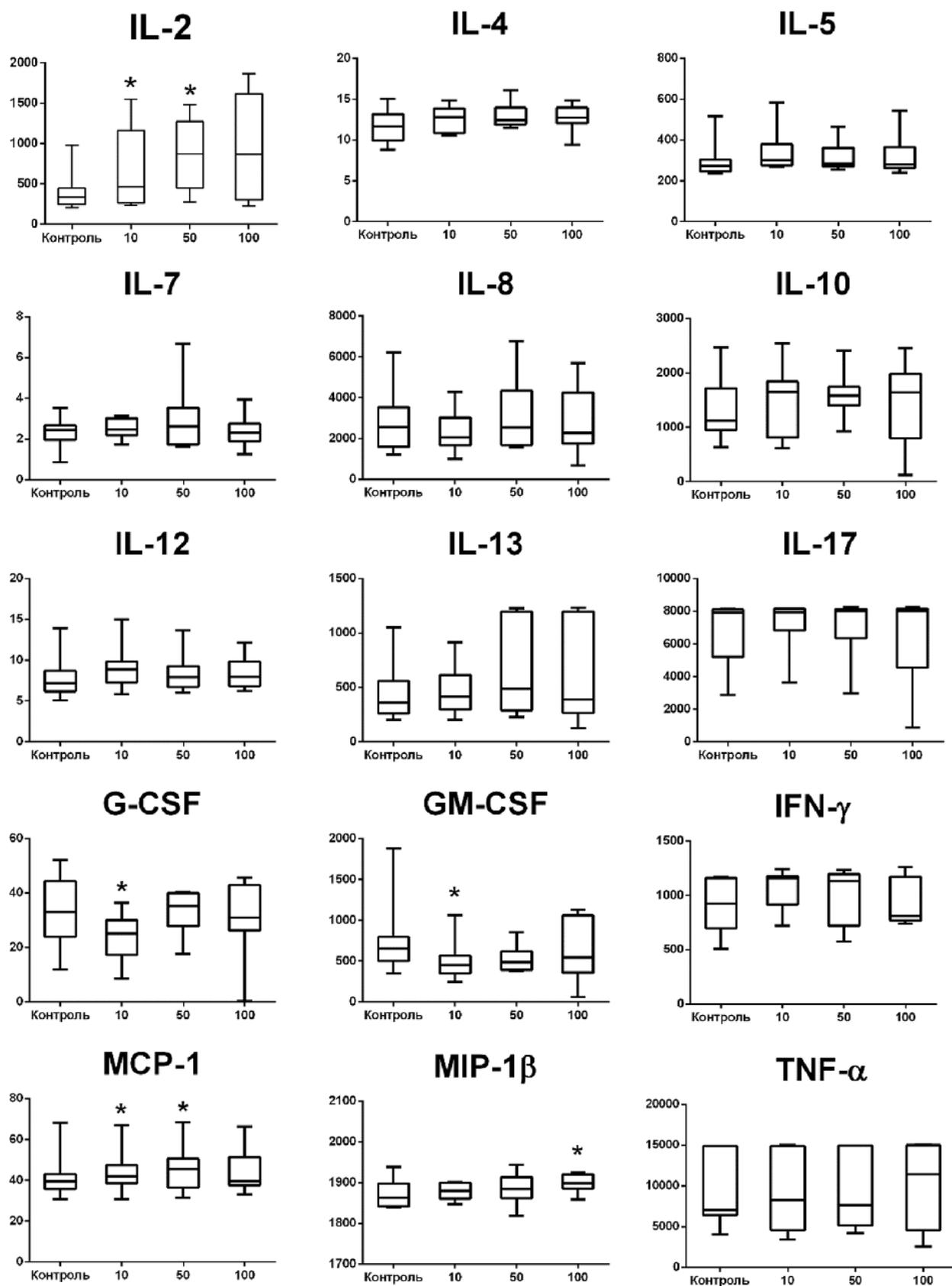


Рисунок 5. Влияние АФП на продукцию цитокинов и хемокинов TCR-активированными CD4⁺-клетками, индуцированными в фенотип Th17. По оси абсцисс – концентрация АФП в МЕ/мл, по оси ординат – концентрация цитокинов (пг/мл) * – достоверные (p<0,05) отличия по парному критерию Вилкоксона в сравнении с активированным контролем. Границами гистограммы показан межквартильный размах (Q1–Q3), линией в центре гистограммы – медиана (Me), “усами” – минимум и максимум.

корреляционных связей между уровнем GM-CSF и G-CSF в супернатантах культур активированных Т-хелперов и экспрессией этими клетками ROR-γт.

Одним из наиболее изученных СС-хемокинов является MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein, хемоаттрактантный белок моноцитов 1, CCL2), который является мощным хемоаттрактантным фактором для моноцитов, Т-клеток и NK-клеток, участвующим в процессах, характеризующихся сильной моноцитарной инфильтрацией [26]. CCL4 (MIP-1β (Macrophage inflammatory protein-1β, макрофагальный белок воспаления-1β)) является провоспалительным хемокином, связанным с клеточной адгезией и миграцией, который участвует в воспалительном процессе, является хемоаттрактантом для моноцитов, дендритных клеток и Т-лимфоцитов, преимущественно хелперных (CD4⁺ Т-клетки) [26]. Известно, что IL-8, MIP-1α, MIP-1β, RANTES и MCP-1 реализуют транзит клеток в норме и миграцию клеток при воспалении, а повышение их уровня во время беременности ассоциировано с развитием самопроизвольных аборт [27]. Довольно неожиданно, что АФП способен повышать продукцию этих факторов, в то время как трофобластический β1-гликопротеин (ТБГ), в наших предыдущих исследованиях, демонстрировал супрессивный эффект на продукцию СС-хемокинов [28]. Нами не выявлено достоверных корреляционных связей между уровнями CCL2 и CCL4 (MCP-1 и MIP-1β) в супернатантах культур активированных Т-хелперов и экспрессией этими клетками ROR-γт. По-видимому, фетоплацентарные белки, обладая разнонаправленными эффектами, формируют регуляторную сеть, которая осуществляет реципрокную регуляцию синтеза цитокинов.

Важно отметить, что в данной работе мы изучали нативный препарат АФП, полученный из крови беременных женщин, что позволяет интерпретировать полученные данные как роль сывороточного АФП в формировании периферической иммунной толерантности на уровне организма матери. Хотя АФП не влиял на дифференцировку Th17, известно, что он способен регулировать функции других CD4⁺ Т-клеток: в частности, угнетать количество не пролиферирующих Treg [10] и препятствовать конверсии наивных Т-хелперов в эффекторные субпопуляции Т-клеток памяти [11]. Известно, что рецептор АФП (AFPR) экспрессируется на эмбриональных и опухолевых клетках, а также на пролиферирующих после митогенного сигнала лимфоцитах [1]. По-видимому, отсутствие эффекта на уровне Th17 связано с особенностями рецепторного аппарата для АФП на этих клетках. Важным достижением 2018 г. стало открытие AFPR на миелоидных супрессорных клетках (MDSC) [29]. MDSC представляют собой гетерогенную популяцию незрелых миелоидных клеток, которые в норме дифференцируются в макрофаги, гранулоциты и дендритные клетки. Однако при беременности или патологических состояниях эти клетки приобретают супрессорный фенотип, подавляя иммунный ответ [30]. Вероятно, АФП реализует свои функции через

“управление” MSDC, которые являются истинными супрессорами иммунитета с точки зрения эволюционной биологии.

Таким образом, впервые установлено, что АФП не влияет на дифференцировку и пролиферацию Th17, но способен модулировать цитокиновый профиль активированных Т-хелперов. По-видимому, отсутствие выраженного эффекта на уровне Th17 связано с особенностями рецепторного аппарата для АФП на этих клетках.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: 01201353248 («ИЭГМ УрО РАН»), программы повышения конкурентоспособности (5-100) и субсидии «Организация проведения научных исследований 20.4986.2017/ВУ» БФУ имени И. Канта. Вклад «ИЭГМ УрО РАН» и БФУ имени И. Канта в финансирование работы равноценен.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование проводили в соответствии с Хельсинской Декларацией ВМА 2000 г. и протоколом Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г., на используемую экспериментальную схему получено разрешение Этического комитета «ИЭГМ УрО РАН» (IRB00010009) от 12.06.2016. От всех пациентов получено информированное согласие на участие в исследовании.

ЛИТЕРАТУРА

1. Terentiev A.A., Moldogazieva N.T. (2013) *Tumor Biol.*, **34**(4), 2075-2091.
2. Murgita R.A., Goidl E.A., Kontianen S., Wigzell H. (1977) *Nature*, **267**, 257-259.
3. Murgita R.A., Tomasi T.B., Jr. (1975) *J. Exp. Med.*, **141**, 269-286.
4. Peck A.B., Murgita R.A., Wigzell H. (1978) *J. Exp. Med.*, **148**, 360-372.
5. Schumacher A., Costa S.D., Zenclussen A.C. (2014) *Front. Immunol.*, **5**, 196.
6. Alisa A., Boswell S., Pathan A.A., Ayaru L., Williams R., Behboudi S. (2008) *J. Immunol.*, **180**, 5109-5117.
7. Um S.H., Mulhall C., Alisa A., Ives A.R., Karani J., Williams R., Bertoletti A., Behboudi S. (2004) *J. Immunol.*, **173**(3), 1772-1778.
8. Yamamoto M., Tatsumi T., Miyagi T., Tsunematsu H., Aketa H., Hosui T., Kanto T., Hiramatsu N., Hayashi N., Takehara T. (2011) *Clin Exp. Immunol.*, **165**(2), 211-219.
9. Fettke F., Schumacher A., Canellada A., Toledo N., Bekeredjian-Ding I., Bondt A., Wuhler M., Costa S.D., Zenclussen A.C. (2016) *Front Immunol.*, **7**, 495.
10. Черешнев В.А., Тимганова В.П., Заморина С.А., Бочкова М.С., Храмов П.В., Кропанева М.Д., Раев М.Б. (2017) Доклады академии наук, **477**(4), 496-499. [Chereshnev V.A., Timganova V.P., Zamorina S.A., Bochkova M.S., Khramtsov P.V., Kropaneva M.D., Raev M.B. (2017) *Doklady biological sciences*, **477**(1), 248-251.]

11. Заморина С.А., Тимганова В.П., Бочкова М.С., Храмов П.В., Фомичева К.А., Раев М.Б., Черешнев В.А. (2018) Доклады академии наук, **482**(4), 467-470. [Zamorina S.A., Timganova V.P., Bochkova M.S., Khramtsov P.V., Fomicheva K.A., Rayev M.B., Chereshnev V.A. (2018) Doklady biological sciences, **482**(1), 210-213.]
12. Santner-Nanan B., Peek M.J., Khanam R., Richarts L., Zhu E., Fazekas de St. Groth. B., Nanan R. (2009) J. Immunol., **83**(11), 7023-7030.
13. Saito S., Nakashima A., Shima T., Ito M. (2010) Am. J. Reprod. Immunol., **63**, 601-610.
14. Peck A.B., Murgita R.A., Wigzell H. (1978) J. Exp. Med., **148**, 360-372.
15. Wu J., Xie A., Chen W. (2014) Burns Trauma, **2**(1), 11-17.
16. Gagnon A., Wilson R.D.; Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada Genetics Committee (2008) J. Obstet. Gynaecol. Can., **30**(10), 918-932.
17. Paiva P., Hannan N.J., Hincks C., Meehan K.L., Pruysers E., Dimitriadis E., Salamonsen L.A. (2011) Hum. Reprod., **26**(5), 1153-1162.
18. Ivanov I.I., McKenzie B.S., Zhou L., Tadokoro C.E., Lepelley A., Lafaille J.J., Cua J., Littman D.R. (2006) Cell, **126**(6), 1121-1133.
19. Yang X.O., Pappu B.P., Nurieva R., Akimzhanov A., Kang H.S., Chung Y., Ma L., Shah B., Panopoulos A.D., Schluns K.S., Watowich S.S., Tian Q., Jetten A.M., Dong C. (2008) Immunity, **28**(1), 29-39.
20. Vesela R., Dolezalova L., Pytlik R., Rychtrmcova H., Mareckova H., Trneny M. (2011) Cellular Immunology, **271**, 78-84.
21. MacDonald H.R., Zaech P. (1982) Cytometry, **3**, 55-58.
22. Annunziato F., Cosmi L., Liotta F., Maggi E., Romagnani S. (2008) Int. Immunol., **20**(11), 1361-1368.
23. Schumacher A., Brachwitz N., Sohr S., Engeland K., Langwisch S, Dolaptchieva M., Alexander T., Taran A., Malfertheiner S.F., Costa S.D., Zimmermann G., Nitschke C., Volk H.D., Alexander H., Gunzer M., Zenclussen A.C. (2009) J. Immunol., **182**(9), 5488-5497.
24. Figueiredo A.S., Schumacher A. (2016) Immunology, **148**(1), 13-21.
25. Paiva P., Hannan N.J., Hincks C., Meehan K.L., Pruysers E., Dimitriadis E., Salamonsen L.A. (2011) Hum. Reprod., **26**(5), 1153-1162.
26. Hughes C.E., Nibbs R.J.B. (2018) FEBS J., **285**(10), 2944-2971.
27. Whitcomb B.W., Schisterman E.F., Klebanoff M.A., Baumgarten M., Rhoton-Vlasak A., Luo X.C. (2007) Amer. J. Epidemiol., **166**(3), 323-331.
28. Раев М.Б., Литвинова Л.С., Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Дунец Н.А., Тимганова В.П., Бочкова М.С., Храмов П.В., Заморина С.А. (2017) Доклады академии наук, **475**(3), 496-499. [Rayev M.B., Litvinova L.S., Yurova K.A., Dunets N.A., Khaziakhmatova O.G., Timganova V.P., Bochkova M.S., Khramtsov P.V., Zamorina S.A. (2017) Doklady biological sciences, **475**(1), 180-182.]
29. Belyaev N.N., Abdolla N., Perfilyeva Y.V., Ostapchuk Y.O., Krasnoshtanov V.K., Kali A., Tleulieva R. (2018) Cancer Immunol. Immunother., **67**(1), 101-111.
30. Gabrilovich D.I., Nagaraj S. (2009) Nat. Rev. Immunol., **9**, 162-174.

Поступила в редакцию: 08. 05. 2019.
 После доработки: 27. 05. 2019.
 Принята к печати: 29. 05. 2019.

THE ROLE OF ALPHA-FETOPROTEIN IN REGULATION OF THE CYTOKINE PROFILE OF ACTIVATED T-HELPERS AND THEIR CONVERSION IN Th17 PHENOTYPE

S.A. Zamorina^{1,2*}, V.P. Timganova¹, L.S. Litvinova³, N.M. Todosenko³, M.S. Bochkova¹, K.Y. Shardina², P.V. Khramtsov^{1,2,3}, M.B. Rayev^{1,2}, V.A. Chereshnev^{1,2}

¹Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch Russian Academy of Sciences, 13 Goleva str., Perm, 614081 Russia; *e-mail: mantissa7@mail.ru

²Perm State University, 15 Bukireva str., Perm, 614990 Russia

³Immanuel Kant Baltic Federal University, 14 Nevskogo str., Kaliningrad, 236016 Russia

We studied the effect of the native (non-recombinant) alpha-fetoprotein (AFP) on differentiation, proliferation, and cytokine profile of activated helper T cells 17 (Th17). The object of the study was a culture of isolated by immunomagnetic separation helper T cells (CD4⁺), induced into the Th17 phenotype by using TCR-activator and proinflammatory cytokines (IL-1 β and IL-6). AFP had not significant effect on the frequency of Th17 cells (ROR- γ t⁺) in the helper T cell culture, and did not affect proliferation of these cells, as measured by Ki-67 expression. Evaluation of the cytokine profile of culture supernatants by using the Luminex xMAP technology, revealed that AFP did not affect the levels of IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-10, IL-17, IFN- γ and TNF- α , but at concentrations of 50 IU/ml and 100 IU/ml it increased IL-2 production by activated helper T cells. At the same time, AFP suppressed the synthesis of G-CSF and GM-CSF (10 IU/ml), but stimulated the production of CCL4/MIP-1 β (100 IU/ml) and CCL2/MCP-1 chemokines (10 IU/ml and 50 IU/ml).

Key words: alpha-fetoprotein (AFP); cytokines; IL-17-producing lymphocytes (Th17); proliferation; T-helper cells; ROR- γ t; Ki-67

Funding. The work was performed as part of the state assignment, state registration number: 01201353248 (“IEGM UB RAS”), competitiveness improvement program (5-100) and “Organization of scientific research 20.4986.2017/VU” subsidy of Baltic Federal University named after I. Kant. The contribution of “IEGM UB RAS” and the Baltic Federal University to the financing of work is equal.

Received: 08.05.2019, revised: 27.05.2019, accepted: 29.05.2019.