На правах рукописи

ПАВЛОВ
Олег Владимирович

ПЛАЦЕНТАРНЫЕ МАКРОФАГИ: ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Санкт-Петербург 2016

Работа выполнена в лаборатории иммунологии с группой по диагностике СПИД Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О.Отта»

Научный консультант:
заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор
Сельков Сергей Алексеевич

Официальные оппоненты:

Анциферова Юлия Станиславовна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория клинической иммунологии, старший научный сотрудник

Мустафина Лилия Рамильевна, доктор медицинских наук, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии, профессор

Николаева Марина Аркадьевна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория клинической иммунологии, лаборатория клинической иммунологии, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация:
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук

Защита диссертации состоится «____» _____ 2016 г. в _____ часов на заседании дисертационного совета Д 001.022.02 при ФГБНУ ‹‹Институт экспериментальной медицины›› по адресу: 197376 Санкт-Петербург, ул. академика Павлова, д. 12.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБНУ ‹‹Институт экспериментальной медицины›› по адресу: 197376 Санкт-Петербург, ул. академика Павлова, д. 12 и на сайте http://iemspb.ru/science/diss/diss001-022-02/

Автореферат разослан «____» _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук, доцент Алешина Г.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

Макрофаги являются одним из основных клеточных типов в плаценте человека. Хотя история изучения плацентарных макрофагов имеет весьма солидный срок, эти клетки, составляющие достаточно многочисленную популяцию в строме плацентарных ворсин, остаются малоисследованными. В большинстве работ, посвященных исследованию плаценты, им зачастую отводилась роль второстепенных, вспомогательных элементов, и поэтому интерес к их изучению также носил в известной мере вторичный характер. Публикации, в которых плацентарные макрофаги являлись основным объектом интереса исследователей, довольно немногочисленны [Wynn, 1967; Castellucci et al, 1980; Bulmer, Johnson, 1984; Demir, Erbengi, 1984; Шатилова, 1999; Коржевский и др., 2005; Мустафина и др., 2015]. Благодаря этим и ряду других работ, в основном носящих характер исследований *in situ,* были сформированы основные представления о морфологии и локализации плацентарных макрофагов, охарактеризованы их ультраструктурная организация и цитохимические особенности.

Макрофаги привлекают особое внимание в связи с современными представлениями о роли иммунокомпетентных клеток в репродуктивных процессах. Если ранее центральная роль традиционно отдавалась клеткам адаптивного звена иммунной системы и их взаимодействиям со специфическим антигеном, то к настоящему времени существенное значение отводится сигналам, продуцируемым клетками врожденного звена иммунной системы, которые в значительной степени детерминируют развитие реакций адаптивного звена иммунной системы [Mellor, Munn, 2000]. В связи с этим возрастает значимость изучения физиологической и патогенетической роли клеток врожденного звена, в частности, участвующих во взаимодействии матери и плода при беременности [Сотникова и др., 2013].

Согласно современным представлениям, компоненты иммунной системы являются обязательными участниками процессов, происходящих в области маточно-плацентарного контакта на разных стадиях физиологической беременности. При этом взаимодействия генетически различных организмов матери и плода определяются как сформированные в процессе эволюции партнерские отношения, в которых иммунокомпетентные клетки действуют не антагонистически, а конструктивно, обеспечивая сохранение и нормальное развитие беременности [Moffett, Loke, 2004; Parham, 2004]

В то же время, становится все более очевидным, что роль макрофагов маточно-плацентарного комплекса не сводится к осуществлению лишь «классических» иммунных функций, таких как элиминация патогена, развитие воспаления и т.д. Накапливается все больше свидетельств того, что спектр выполняемых ими функций гораздо шире, и, благодаря разнообразию вырабатываемых сигналов, затрагивает различные процессы структурного характера, в частности формирование плаценты.

Необходимость исследования фенотипических и функциональных особенностей конкретной клеточной популяции особенно актуальна в отношении резидентных тканевых макрофагов, которые отличаются высокой чувствительностью к сигналам микроокружения и чрезвычайной пластичностью [Mosser, Edwards, 2008]. При наличии общих фундаментальных свойств (фагоцитоз, антибактериальная активность, продукция цитокинов и т.д.) макрофаги,

имеющие различную пространственно-временную локализацию, проявляют и существенные различия фенотипических и функциональных характеристик.

Актуальность изучения морфофункциональных характеристик плацентарных макрофагов продиктована необходимостью понимания физиологии и патофизиологии плаценты как важнейшего репродуктивного органа. Есть основания полагать, что макрофаги маточно-плацентарного комплекса при определенных условиях вносят свой вклад в развитие некоторых акушерских патологий, таких как невынашивание беременности и преэклампсия (гестоз) [Founds et al, 2009; Steinborn et al, 1998; Tang et al, 2013]. Идентификация изменений морфофункциональных характеристик макрофагов при этих нарушениях могла бы способствовать выявлению патогенетических механизмов на клеточно-молекулярном уровне и поиску путей их коррекции. Однако, это затруднено тем, что свойства этих клеток при нормальном (физиологическом) развитии беременности охарактеризованы в недостаточной степени, а имеющиеся данные, полученные разными исследователями, нередко плохо согласуются между собой или даже вступают в противоречие.

Для более полного понимания роли плацентарных макрофагов важно сопоставить их морфофункциональные характеристики в разные сроки физиологической беременности с теми процессами, которые происходят в плаценте на соответствующих стадиях ее развития. Имеющиеся в литературе разрозненные данные не позволяют провести корректное сравнение свойств и функций плацентарных макрофагов ранних и поздних сроков беременности из-за различий в методических подходах, используемых разными авторами.

В силу понятных ограничений в исследовании биологического материала, полученного от человека, ряд теоретических представлений о специфических функциях плацентарных макрофагов основаны на результатах экспериментов (особенно *in vivo*) с животными, главным образом, грызунами, имеющими, как и человек, плаценту гемохориального типа. Несмотря на очевидную ценность таких данных, их использование имеет ограниченный характер из-за существенных различий в физиологии человека и животных.

В связи с этим исследования *in vitro* во многих случаях представляют собой единственную возможность получения информации о клетках плаценты человека, в том числе и плацентарных макрофагах.

Настоящая работа является комплексным исследованием морфофункциональных характеристик макрофагов, изолированных из ворсинчатого хориона в разные сроки физиологической беременности.

Цель и задачи исследования

Цель исследования – охарактеризовать фенотипические и функциональные свойства плацентарных макрофагов в различные сроки физиологической беременности и оценить их роль в гестационном процессе.

Для достижения данной цели были поставлены и последовательно решены следующие задачи:

1. Разработать адекватную и воспроизводимую процедуру получения клеточных культур плацентарных макрофагов и органотипических культур ворсинчатого хориона ранних и поздних гестационных сроков, позволяющую проводить оценку их фенотипических и функциональных особенностей в условиях *in vitro*.

2. Охарактеризовать экспрессию молекул дифференцировки, факторов апоптоза, цитокинов, рецепторов цитокинов плацентарными макрофагами в I и III триместрах беременности и выявить изменения поверхностного антигенного фенотипа, связанные со сроком беременности.
3. Провести сравнительную оценку фенотипических особенностей плацентарных макрофагов и их возможных предшественников - моноцитов пуповинной крови.
4. Охарактеризовать цитокинпродуцирующую способность плацентарных макрофагов на ранних и поздних стадиях беременности (в последнем случае и при различных способах родоразрешения).
5. Оценить особенности базальной и индуцированной секреции цитокинов и их рецепторов клеточными культурами плацентарных макрофагов на ранних и поздних стадиях беременности и при различных способах родоразрешения.
6. Сравнить характер секреторной активности на уровне отдельной популяции (изолированные клеточные культуры плацентарных макрофагов) и органа (эксплантаты плаценты), и оценить возможный вклад макрофагов в общую продукцию цитокинов плацентой.

Научная новизна исследования

Впервые в одном исследовании изучен столь широкий спектр параметров, характеризующих особенности дифференцировки, экспрессию факторов апоптоза, рецепторный аппарат макрофагов плодной части плаценты.

Впервые охарактеризованы особенности разных этапов продукции (внутриклеточный синтез и секреция) широкого спектра цитокинов и их рецепторов, что дает возможность наиболее полно оценить участие данной клеточной популяции в межклеточной сигнализации в плаценте. Способность плацентарных макрофагов продуцировать ряд факторов (IL-11, IL-17F, sVEGFR1) продемонстрирована впервые.

Впервые в одном исследовании сравниваются характеристики клеток, полученных в I и III триместрах беременности и при разных способах родоразрешения (наличие или отсутствие спонтанной родовой деятельности), что позволяет сделать выводы о возможной регуляторной роли плацентарных макрофагов на протяжении беременности и в родовом акте.

Впервые проведен сравнительный анализ фенотипа плацентарных макрофагов и их предполагаемых предшественников - моноцитов пуповинной крови, что позволяет делать выводы о возможных изменениях функциональных характеристик в процессе дифференцировки тканевых макрофагов.

Установлено, что по мере прогрессирования беременности происходит ослабление регуляторной функции в отношении морфогенетических процессов и усиление провоспалительных свойств, обеспечивающих противоинфекционную защиту плода.

Впервые сопоставляются секреторная активность изолированной клеточной популяции и органотипических фрагментов плаценты, что позволяет оценить вклад плацентарных макрофагов в продукцию цитокинов плацентой в целом.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость работы заключается в определении роли плацентарных

макрофагов в гестационном процессе, в частности, участия этой клеточной популяции в противоинфекционной защите и регуляции морфогенеза плаценты. Уточняется место макрофагов плодного происхождения в структуре межклеточных взаимодействий при обеспечении иммунной толерантности в системе «мать-плод». Сравнительный анализ собственных результатов и литературных данных позволяет внести коррективы в современные теории активации, пластичности и гетерогенности системы мононуклеарных фагоцитов.

Разработанные модели на основе изолированных культур плацентарных макрофагов и органотипических культур плаценты разных гестационных сроков могут быть использованы для изучения фенотипических и функциональных характеристик отдельной клеточной популяции и ворсинчатого хориона в целом, как при физиологическом развитии беременности, так и при различных акушерских патологиях, а также для тестирования лекарственных препаратов.

Определение базовых характеристик одного из основных клеточных типов плаценты при физиологической беременности, осуществленное в данном исследовании, является необходимым условием для точного и объективного выявления их изменений, имеющих патогенетическое значение для некоторых акушерских патологий, что способствует разработке методов их предотвращения и коррекции.

Результаты данного исследования могут быть использованы в учебных курсах и пособиях по клеточной биологии, цитологии, гистологии, иммунологии, эмбриологии.

Методология и методы исследования. Методология *in vitro* была выбрана как наиболее адекватная при исследовании биологического материала человеческого происхождения. Для выполнения экспериментальной части исследования был использован набор современных методов, отвечающих поставленным целям и задачам.

Положения, выносимые на защиту.

1. Плацентарные макрофаги представляют собой клеточную популяцию, обладающую уникальными фенотипическими и функциональными свойствами, формирующимися под влиянием микроокружении и зависящими от пространственно-временных факторов.
2. С точки зрения общепринятой классификации плацентарные макрофаги при физиологической беременности имеют признаки «классической» (M1) и «альтернативной» (M2) активации. Развитие плаценты сопровождается усилением признаков обоих типов активации, что отражает функциональное созревание популяции макрофагов ворсин хориона. В то же время соотношение между уровнями активации конкретных популяций зависит от срока гестации.
3. Фенотипическая гетерогенность плацентарных макрофагов отражает их функциональные различия, связанные с выполнением различных задач. Сочетание провоспалительных и регуляторных свойств обусловливает, по крайней мере, две основные роли этих клеток: обеспечение противоинфекционной защиты и модуляцию свойств и функций других клеток маточно-плацентарного комплекса.
4. Динамика изменений морфофункциональных характеристик плацентарных макрофагов соответствует основным этапам физиологического развития плаценты. Выявленные нами характеристики свидетельствуют о том, что на ранних стадиях преобладает регуляторная функция в отношении структурных элементов формирующегося маточно-плацентарного

комплекса; при этом провоспалительный потенциал популяции макрофагов снижен, что обеспечивает развитие плаценты и сохранение беременности на этапе плацентации. Ослабление регуляторных и усиление провоспалительных свойств в III триместре беременности отражает снижение интенсивности морфогенетических процессов в зрелой плаценте, усиление противоинфекционного иммунитета и подготовку к родовому акту.

5. Подавление продукции провоспалительных цитокинов и экспрессии активирующих рецепторов представляют собой способы модуляции функций плацентарных макрофагов, обеспечивающие физиологическое развитие плаценты и сохранение беременности. Нарушение этих регуляторных взаимодействий может приводить к повышению уровня активации макрофагов, что представляет собой один из возможных патогенетических факторов при возникновении акушерских патологий.
6. Сопоставление секреторной активности плацентарных макрофагов и органотипических фрагментов ворсинчатого хориона указывает на то, что плацентарные макрофаги могут участвовать в регуляции воспалительных процессов и вне плаценты, тогда как регуляторные эффекты макрофагов в отношении неиммунных процессов носят преимущественно локальный характер.

Степень достоверности результатов. Достоверность полученных результатов обеспечивается достаточным объемом экспериментального материала, использованием современных методов исследования и адекватных методов статистического анализа.

Апробация и реализация работы. Диссертация выполнена на базе НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О.Отта. Результаты исследований внедрены в практическую и научную деятельность отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий НИИАГиР им. Д.О.Отта. Материалы диссертации использованы в учебном пособии для вузов «Руководство по нейроиммуноэндокринологии».

Материалы диссертационной работы были представлены на международном симпозиуме «Иммунология репродукции» (Киев, 1996), Пятой научной конференции с международным участием «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге 2001 (Санкт-Петербург, 2001), Международной научно-практической школы-конференции «Цитокины. Воспаление. Иммунитет» (Санкт-Петербург, 2002), Шестой научной конференции с международным участием «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге 2002 (Санкт-Петербург, 2002), II Всероссийской конференции «Молекулярные основы иммунорегуляции, иммунодиагностики и иммунотерапии» (Санкт-Петербург, 2003), VIII, X, XI, XIII, XIV Всероссийском научном Форуме с международным участием имени академика В.И.Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2004, 2006, 2007, 2009, 2011), III Международном научном конгрессе «Новые технологии в акушерстве и гинекологии» (Санкт-Петербург, 2007), Объединенном иммунологическом форуме (Санкт-Петербург, 2008), 4-й Всероссийской конференции «Иммунология репродукции» (Пермь, 2010), Научно-практической конференции с международным участием «Клиническая иммунология, иммуногенетика – междисциплинарные проблемы» (Ташкент, 2010), V Российской конференции по иммунологии репродукции» (Иваново, 2012), Объединенном иммунологическом форуме (Нижний Новгород, 2013), II Национальном конгрессе «Дискуссионные вопросы современного акушерства» и обучающем

преконгрессе-курсе XI Всемирного конгресса по перинатальной медицине (Санкт-Петербург, 2013), III Национальном конгрессе «Дискуссионные вопросы современного акушерства» (Санкт-Петербург, 2015).

Публикации. По материалам исследования опубликовано 44 печатные работы, в том числе монография «Плацентарные макрофаги», глава в учебном пособии «Руководство по нейроиммуноэндокринологии», 4 статьи в зарубежных научных журналах и 16 статей в отечественных журналах, включенных в Перечень ВАК Минобрнауки РФ для публикации материалов диссертационных исследований (из них 13 статей в изданиях, включенных в международные базы цитирования) и 22 тезиса докладов.

Личное участие автора заключалось в планировании, проведении всех лабораторных исследований, статистической обработке, обобщении и анализе полученных результатов, подготовке публикаций. Автором была определена цель и сформулированы задачи исследования, изучены данные литературы, составлена программа исследования, выполнен сбор и обработка материалов, проведено их обобщение и осуществлен анализ полученных результатов. В ходе выполнения исследования автором была отработана и стандартизована методика получения культур плацентарных макрофагов в I и III триместрах беременности.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы. Текст диссертации изложен на 300 страницах, содержит 33 таблицы и иллюстрирован 54 рисунками. Список литературы содержит 597 источников, из которых отечественных – 22, зарубежных -575.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объектами исследования являлись культуры плацентарных макрофагов и эксплантаты ворсинчатого хориона, полученные в I и III триместрах физиологически протекающей беременности. Материал ворсинчатого хориона в I триместре беременности получали в результате хирургического аборта. Материал плаценты в III триместре беременности получали в результате родоразрешения путем кесарева сечения при отсутствии спонтанной родовой деятельности (III триместр б.р.д.) или при спонтанных родах (III триместр с.р.д.). План исследования был одобрен Этическим комитетом НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О.Отта.

Получение культуры плацентарных макрофагов в I триместре беременности

3-6 г измельченного ворсинчатого хориона (9-12 недель беременности) отмывали в растворе Хенкса и помещали в 50 мл питательной среды DMEM/F-12, содержащей 0,2% коллагеназы камчатского краба, 60 ЕД/мл ДНКазы, 2 мл инактивированной ЭТС, 15 мМ HEPES. После инкубации с перемешиванием (1 час, 37ºС) надосадочную жидкость, содержащую отдельные клетки и клеточные агрегаты, пропускали ее через нейлоновый фильтр (100 мкм). Клетки осаждали центрифугированием, дважды отмывали и ресуспендировали в DMEM/F-12, содержащей 10% ЭТС. К недиссоциированному осадку добавляли 50 мл свежего диссоциирующего раствора того же состава, и процедуру повторяли. Полученную клеточную

суспензию центрифугировали в градиенте плотности, отбирали клетки из интерфазы, отмывали и ресупендировали в DMEM/F-12, содержащей 10% ЭТС и антибиотики. Жизнеспособность клеток определяли методом окрашивания в растворе трипанового синего. Подсчет клеток проводили с помощью гемоцитометра.Клеточную суспензию помещали в лунки пластиковых 6-луночных планшетов (~2-3×10^6 клеток) или на поверхность покровных стекол 18×18 мм (~2×10^5 клеток) и оставляли для прикрепления на ночь в CO_2-инкубаторе (37ºС, 5% CO_2). Неприкрепившиеся клетки удаляли встряхиванием и трехкратным промыванием культуральной средой.

Получение культуры плацентарных макрофагов в III триместре беременности

Около 20 г измельченного ворсинчатого хориона (38-40 недель) переносили в 100 мл питательной среды DMEM/F-12, содержащей 0,1% протеазы (Sigma, США), и инкубировали 20 мин при перемешивании (37ºС). После декантации осадок отмывали и помещали в 100 мл DMEM/F-12, содержащей 0,2% коллагеназы камчатского краба, 60 ЕД/мл ДНКазы, 4 мл инактивированной ЭТС, 15 мМ HEPES. После инкубации при перемешивании (1,5 часа, 37ºС) отбирали надосадочную жидкость и фильтровали (100 мкм). Клетки осаждали центрифугированием, отмывали и ресуспендировали в 5 мл DMEM/F-12, содержащей 10% ЭТС. К недиссоциированному осадку добавляли 100 мл свежего диссоциирующего раствора того же состава, и процедуру повторяли. Полученную клеточную суспензию центрифугировали в градиенте плотности. Отбирали клеточную суспензию из интерфазы, отмывали и ресуспендировали в DMEM/F-12, содержащей 10% ЭТС и антибиотики. Жизнеспособность клеток определяли, окрашивая их трипановым синим. Подсчет клеток проводили с помощью гемоцитометра.Клеточную суспензию помещали в лунки пластиковых 6-луночных планшетов (~1,5-2×10^6 клеток) или на поверхность покровных стекол 18×18 мм (~2×10^5 клеток) и оставляли для прикрепления на ночь (37ºС, 5% CO_2). Неприкрепившиеся клетки удаляли встряхиванием и трехкратным промыванием культуральной средой.

Культивирование плацентарных макрофагов

Полученные клеточные культуры содержали в CO_2-инкубаторе (37ºС, 5% CO_2) в течение 23 часов в отсутствии или присутствии 0,5 мкг/мл ЛПС. По окончании инкубации отбирали кондиционированную среду, которую центрифугировали, аликвотировали по 220 мкл и замораживали при -70ºС для дальнейшего определения секреторных продуктов. Клетки, предназначенные для определения поверхностных маркеров, снимали с поверхности лунок раствором версена. Клетки, предназначенные для анализа внутриклеточных антигенов, дополнительно культивировали в течение 4,5 часов в присутствии ингибитора внутриклеточного белкового транспорта и, соответственно, в присутствии или отсутствии ЛПС (37ºС, 5% CO_2).

Получение органотипической культуры ворсинчатого хориона

Фрагменты ворсинчатого хориона отмывали в стерильном растворе Хенкса с антибиотиками и измельчали до размера ~2-5 мм^3, после чего распределяли по лункам 4-луночных пластиковых планшетов. Культивирование эксплантатов проводили в 1 мл питательной среды DMEM/F-12, содержащей 10% ЭТС и антибиотики, в присутствии или отсутствии 1 мкг/мл ЛПС в течение 24 часов. По окончании инкубации отбирали кондиционированную среду, которую центрифугировали и замораживали (-70ºС) для

дальнейшего определения секреторных продуктов. Эксплантаты из каждой лунки осушали на фильтровальной бумаге и взвешивали на аналитических весах с целью стандартизации результатов.

Выделение фракции мононуклеарных клеток из пуповинной крови

Пуповинную кровь получали при родоразрешении в срок 37-40 недель беременности. К крови добавляли равный объем буфера Cell Wash (BD Biosciences, США). После центрифугирования в градиенте плотности отбирали мононуклеарную фракцию на границе раздела фаз.

Иммуноцитохимический анализ культуры плацентарных макрофагов

Клеточные культуры фиксировали раствором параформальдегида, затем помещали в холодный метанол (-20ºС) на 1 мин. Использовали моноклональных антитела к CD68, цитокератину 7 или соответствующий негативный контроль. Процедуру визуализации осуществляли с помощью стандартного набора EnVision®+ Dual Link System-HRP (DakoCytomation, Дания). Образцы анализировали при помощи фотомикроскопа Olympus CX31

Иммунофлуоресцентный анализ культуры плацентарных макрофагов.

Клеточные культуры инкубировали с моноклональными мышиными антителами против CD68 (PG-M1), антигенов MHC II класса (PdV 5.2, anti-HLA-D), Fc-рецепторов II типа (IV.3, anti-FcγRII) и рецепторов к C3bi компоненту комплемента (OK-M1, anti-CR3), а затем. с антителами против IgG мыши, меченные FITC. Анализировали с помощью люминесцентного фотомикроскопа Opton-Axiophot

Идентификация антигенных маркеров методом проточной цитофлуориметрии

Для анализа поверхностных антигенов к 50 мкл клеточной суспензии (~4-6×10^4 клеток – макрофаги; ~2,5×10^5 клеток – мононуклеары крови) добавляли меченные флуорохромом моноклональные антитела или соответствующие изотипические контроли. В исследовании были использованы моноклональные антитела производства BD Biosciences и R&D Systems (США) к следующим антигенам: HLA-DR, 25F9, TGF-β RII, TNFR2, IL-2R, IL-17R, IL-23R, VEGFR2 (флуорохром – FITC); CD11b, CD163, TRAIL, TWEAK, TNFR1, IL-10R, LAP(TGF-β1) , VEGFR1 (флуорохром – PE); CD18, CD206 (флуорохром – PE-Cy5); CD14 (флуорохром – PE-Cy7). Для детекции внутриклеточных антигенов проводили процедуру фиксации и пермеабилизации клеток с помощью набора BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit (BD Biosciences, США). К 50 мкл клеточной суспензии (~4-5×10^4 клеток) добавляли меченные флуорохромом моноклональные антитела или соответствующие изотипические контроли. Были использованы конъюгированные с FITC моноклональные антитела против CD68 (DakoCytomation, Дания) и моноклональные антитела производства BD Biosciences и R&D Systems к следующим антигенам: IL-15, IL-17F (флуорохром – FITC); IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17A, IL-17E, TNFα, LAP(TGF-β1), VEGF (флуорохром – PE). Анализ образцов проводили с помощью проточных цитофлуориметров FACScan и FACSCanto II (Becton Dickinson, США). Результаты анализа представляли в двух видах:

1) доля (в процентах) клеток, положительно окрашенных на данный антиген, от общего числа клеток в гейтируемом регионе;
2) коэффициент средней интенсивности флуоресценции (коэффициент MFI), определяемый

как отношение медианных значений интенсивности флуоресценции специфического антитела и соответствующего изотипического контроля.

Определение секреторных продуктов методом мультиплексного анализа

Кондиционированные среды, полученные в результате культивирования плацентарных макрофагов и эксплантатов плаценты, анализировали методом мультиплексного анализа с использованием тест-систем BD™ Cytometric Bead Array (BD Biosciences, США) и проточного цитофлуориметра FACSCanto II. Определяли следующие секреторные молекулы: IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, IL-17A, TNFα, sTNFR1, sTNFR2, TGF-β1, VEGF. Секреторную активность выражали в пикограммах (пг) определяемого аналита в расчете на 100000 клеток (для клеточных культур) или на миллиграмм (мг) ткани (для органотипических культур).

Определение sVEGFR1 методом иммуноферментного анализа

sVEGFR1 определяли в кондиционированных средах, полученные в результате культивирования плацентарных макрофагов и эксплантатов плаценты, методом иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием стандартных наборов Quantikine® ELISA kit (R&D Systems, США). Учет результатов проводили с помощью многолучевого планшетного фотометра Multiskan MCC/340 (Labsystems, Финляндия). Секреторную активность выражали в пикограммах (пг) sVEGFR1 в расчете на 100000 клеток (для клеточных культур) или на мг (для органотипических культур).

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерных программ «GraphPad Prism 4.01», «GraphPad InStat 3.06» и «PAST 2.17». Для анализа данных использовали непараметрические тесты Манна-Уитни и Краскела-Уоллиса, а также непараметрический метод ранговой корреляции Спирмена.

Результаты исследования и их обсуждение

Получение культуры плацентарных макрофагов: проблемы и решения

Нами была выработана эффективная и воспроизводимая процедура, которая, включает в себя диссоциацию ворсинчатого хориона и разделение полученной клеточной суспензии в градиенте плотности. Задачи нашего исследования требовали максимально возможной сохранности антигенов, расположенных на наружной стороне клеточной мембраны. Как и большинство исследователей, мы пришли к выводу о том, что ферментативная обработка ворсинчатого хориона является наиболее адекватным способом получения изолированных клеток плаценты. В отличие от аналогичных процедур, применямых зарубежными авторами, обычно использующими для этих целей коллагеназу бактериального происхождения, мы использовали коллагеназу, полученную из гепатопанкреаса камчатского краба, поскольку в проведенных нами предварительных экспериментах этот фермент давал гораздо лучшие результаты по выходу и жизнеспособности клеток.

Для дальнейшей «очистки» популяции макрофагов мы применили подход, основанный на различиях в адгезивной способности разных типов клеток. Модификация методики заключалась в увеличении периода прикрепления клеток к субстрату с 2 часов до 14-15 часов, в результате чего количество прикрепленных клеток увеличивалось, в среднем, на 20% без существенного снижения гомогенности культур. После 2-часовой адгезии количество $CD68^{+}$-клеток по

результатам иммуноцитохимического анализа составляло 95,3±3,1%, тогда как после прикрепления в течение ночи доля $CD68^+$ клеток была 93,5±3,4%. Поскольку абсолютное количество плацентарных макрофагов было лимитирующим фактором в наших исследованиях, для дальнейших экспериментов нами была выбрана процедура выделения, позволяющая получить наибольшее количество этих клеток.

По результатам иммунопероксидазного окрашивания доля клеток, имеющих положительную окраску на CD68, цитокератин 7 и виментин в культурах I триместра составила 93,3±3,9%, 5,2±3,9% и 94,6±1,7%, соответственно, а в культурах III триместра - 94,0±3,4%, 2,3±1,7% и 96,8±6,4%, соответственно. Дополнительно методом иммунофлуоресцентного окрашивания была продемонстрирована экспрессия CD68 (96±3%), HLA-D (92±3%), FcγRII (99±1%) и CR3 (80±12%). Эти результаты подтверждаются и дополняются данными проточной цитофлуориметрии, которые демонстрируют экспрессию CD14, HLA-DR (рисунок 1) и CD68 (рисунок 2).

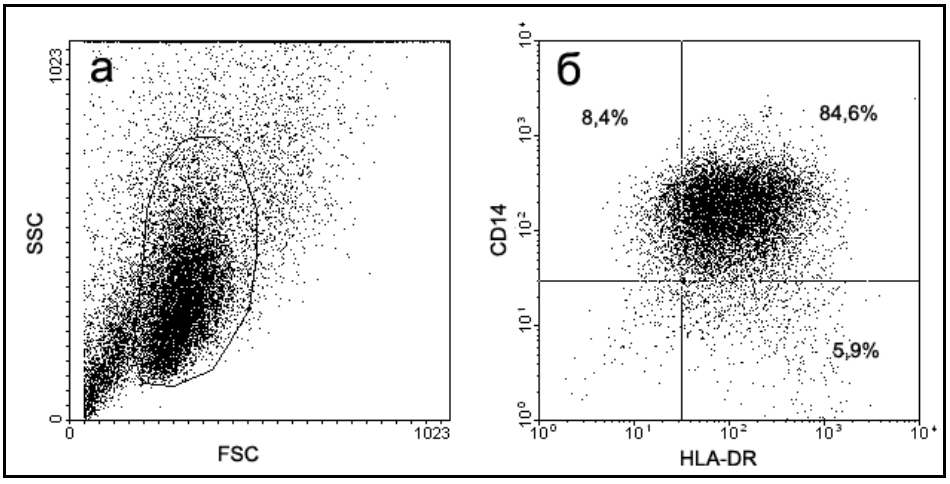


Рисунок 1 - Анализ культивируемой популяции плацентарных макрофагов методом проточной цитофлуорометрии: а – на точечной диаграмме прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния выделена область гейтирования; б – распределение событий в области гейтирования при окраске антителами против CD14 и HLA-DR.

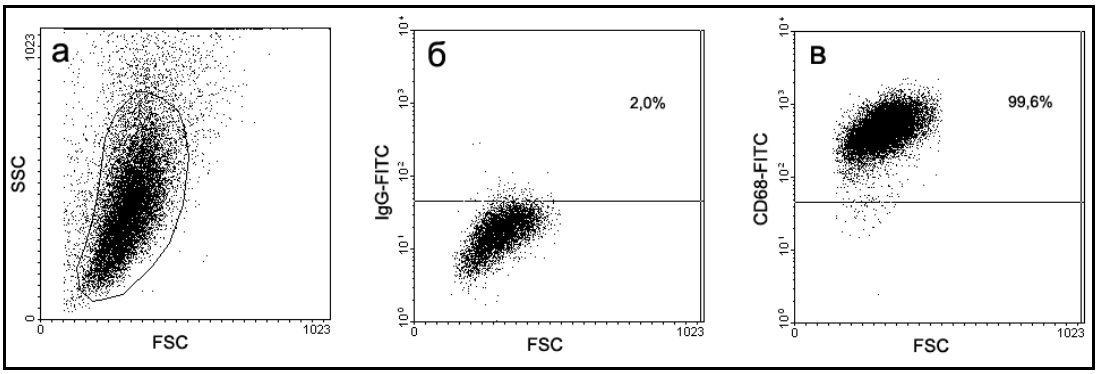


Рисунок 2 - Анализ культивируемой популяции плацентарных макрофагов методом проточной цитофлуорометрии: а –область гейтирования; б – изотипический контроль; в –экспрессия CD68.

В функциональных тестах с использованием сенсибилизированных эритроцитов барана полученные клеточные культуры демонстрировали высокую фагоцитарную активность, которая является одним из характерных свойств макрофагов.

Все эти данные позволяют считать, что полученные клеточные культуры, представляют собой гомогенную популяцию макрофагов плацентарных ворсин, которая может быть использована для изучения характеристик этих клеток *in vitro*.

Изучение поверхностного антигенного фенотипа плацентарных макрофагов в I и III триместрах беременности

Маркеры дифференцировки. В эту группу мы объединили молекулы, которые являются, в большей или меньшей степени специфичными для макрофагов и используются для идентификации этих клеток и/или характеристики степени их дифференцировки. Результаты анализа представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Экспрессия маркеров дифференцировки плацентарными макрофагами. Доля положительно окрашенных клеток, % (n=10-21)

Маркер	I триместр	III триместр б.р.д.	III триместр с. р.д.
CD14	$_{57,3}$ 60,8 $_{69,6}$	$_{78,4}$ 84,6 $_{90,0}$***	$_{60,0}$ 87,0 $_{94,8}$**
HLA-DR	$_{46,0}$ 68,1 $_{90,4}$	$_{56,1}$ 79,4 $_{86,2}$	$_{51,2}$ 65,0 $_{91,0}$
CD206	$_{32,5}$ 41,6 $_{46,1}$	$_{54,6}$ 65,4 $_{74,9}$**	$_{58,0}$ 72,3 $_{83,0}$ *
CD163	$_{2,2}$ 3,8 $_{9,0}$	$_{4,5}$ 8,5 $_{19,2}$	$_{7,5}$ 16,0 $_{22,1}$
CD11b	$_{39,0}$ 55,1 $_{72,1}$	$_{62,5}$ 70,3 $_{76,3}$	$_{67,4}$ 82,1 $_{87,6}$
CD18	$_{70,3}$ 87,4 $_{89,7}$	$_{88,8}$ 95,2 $_{98,5}$**	$_{87,1}$ 97,4 $_{98,8}$ **

* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001 vs I триместр

Данные представлены в виде медиан. Слева и справа подстрочным текстом указаны, соответственно, нижняя и верхняя границы 95%-го доверительного интервала для медиан.

Большинство макрофагов плацентарных ворсин экспрессировали маркер клеток моноцитарно-макрофагального ряда – CD14. Однако заметная часть клеток обладала фенотипом $CD14^-$, причем их доля была существенно выше на ранней стадии беременности (таблица 1). Поскольку практически все моноциты крови имеют фенотип $CD14^+$, увеличение доли клеток с таким фенотипом в строме плацентарных ворсин в III триместре может являться результатом рекрутирования и дифференцировки моноцитов крови плода.

Обнаружено, что уже в первом триместре около 70% макрофагов плаценты несет на своей поверхности молекулы HLA-DR. Количество положительно окрашенных клеток, и интенсивность экспрессии HLA-DR макрофагами не претерпевали существенных изменений с увеличением срока беременности, что является свидетельством стабильности антигенпрезентирующих свойств макрофагов на протяжении всей беременности.

Маннозный рецептор (CD206) является маркером «альтернативно активированных» (M2) макрофагов [Martinez et al., 2006; Schraufstatter et al., 2012]. Динамика экспрессии CD206 и CD14 имела сходный характер: доля положительно окрашенных клеток увеличивались

приблизительно в 1,5 раза от I к III триместру (таблица 1). Однако, интенсивность флуоресценции при этом возрастала более чем в 2 раза. Таким образом, с увеличением срока беременности происходило не только увеличение доли $CD206^+$ клеток, но и повышение количества молекул CD206, экспрессируемых на поверхности макрофагов.

Полученные результаты свидетельствуют об усилении «противовоспалительных» свойств плацентарных макрофагов с увеличением срока беременности. При спонтанных родах увеличение количества $CD206^+$ клеток не сопровождалось изменением средней флуоресценции (MFI), как это наблюдалось в группе без родовой деятельности. Это свидетельствует о пониженной экспрессии CD206 отдельной клеткой, что может отражать тенденцию к утрате противовоспалительного фенотипа (M2) при подготовке к родам, либо в процессе родового акта.

Еще один маркер «альтернативно активированных» макрофагов – скэвенджер-рецептор гемоглобина, CD163. Однако, уровень экспрессии CD163 в исследуемой нами популяции плацентарных макрофагов был существенно ниже, чем уровень экспрессии CD206, особенно на раннем этапе гестации (таблица 1).

Наблюдаемое различие в экспрессии двух маркеров «альтернативной» активации может являться проявлением «пластичности» макрофагов. Свойства макрофагов в значительной степени зависят от сигналов микроокружения, благодаря чему одни и те же клетки могут переходить из одного активационного состояния в другое, меняя паттерн экспрессируемых антигенных маркеров. Мы предполагаем, что подавление экспрессии CD163 при достаточно высоком уровне CD206 является проявлением этого феномена.

Рецептор комплемента CR3 (Mac-1) обеспечивает распознавание и связывание чужеродных клеток, опсонизированных C3-компонентом комплемента, а также опосредует клеточную адгезию и межклеточные взаимодействия. Молекула CR3 состоит из двух субъединиц CD11b и CD18. В нашем исследовании уровень экспрессии CD11b и CD18 плацентарными макрофагами увеличивался от I к III триместру, хотя статистически значимыми были только изменения CD18, при этом доля $CD18^+$ клеток превышала количество $CD11b^+$ клеток. (таблица 1). Полученные данные свидетельствуют о том, что экспрессия CR3 макрофагами начинается достаточно рано и сохраняется на относительно постоянном уровне на протяжении беременности, тогда как формирование других интегринов, содержащих в качестве субъединицы β2 (CD18), носит отсроченный характер.

Факторы апоптоза.. Нами была изучена экспрессия двух факторов суперсемейства TNF: TRAIL и TWEAK. Установлено, что лишь около 10% популяции плацентарных макрофагов несет на своей поверхности молекулу TWEAK независимо от срока гестации (таблица 2). TWEAK является стимулятором воспалительного ответа в поврежденных и патологически измененных тканях и играет роль в патогенезе заболеваний, носящих воспалительный и аутоиммунный характер [Burkly. et al., 2011; Zhu. et al., 2012; Nazeri et al., 2013]. Таким образом, низкий уровень экспрессии TWEAK макрофагами плаценты означает низкий уровень активации этих клеток по провоспалительному типу при физиологической беременности. Известно также, что TWEAK индуцирует продукцию IL-17 мононуклеарами периферической крови [Park et al., 2012]. И с этой точки зрения сниженная экспрессия TWEAK предотвращает развитие воспалительных реакций в плацентарных ворсинах на протяжении всей беременности.

Таблица 2 – Экспрессия факторов апоптоза плацентарными макрофагами. Доля положительно окрашенных клеток, % (n=11-18).

Маркер	I триместр	III триместр б.р.д.	III триместр с. р.д.
TRAIL	$_{4,0}$ 21,1 $_{37,0}$	$_{8,0}$ 17,5 $_{36,0}$	$_{5,5}$ 23,1 $_{46,0}$
TWEAK	$_{9,6}$ 12,0 $_{22,0}$	$_{5,8}$ 9,0 $_{14,0}$	$_{3,2}$ 6,0 $_{19,0}$

Данные представлены в виде медиан. Слева и справа подстрочным текстом указаны, соответственно, нижняя и верхняя границы 95%-го доверительного интервала для медиан.

Уровень экспрессии TRAIL составлял около 20% во всех трех исследуемых группах (таблица 2). Наши результаты в сочетании с данными литературы указывают на то, что хронологические изменения TRAIL-опосредованной регуляции в плацентарных ворсинах происходят не за счет изменения продукции лиганда синцитиотрофобластом и макрофагами, а благодаря модулированной экспрессии рецепторов цитотрофобластом. Мы полагаем, что молекулы TRAIL на поверхности плацентарной ворсины обеспечивает защиту от материнской иммунной системы, а молекулы TRAIL, продуцируемые клетками стромы, осуществляют регуляцию функций структурных элементов внутри самой плацентарной ворсины (рисунок 3). Предполагаемыми мишенями TRAIL макрофагального происхождения являются клетки цитотрофобласта и эндотелия сосудов, которые, в свою очередь, участвуют в регуляции апоптоза, экспрессируя функциональные и нефункциональные рецепторы в разных соотношениях.

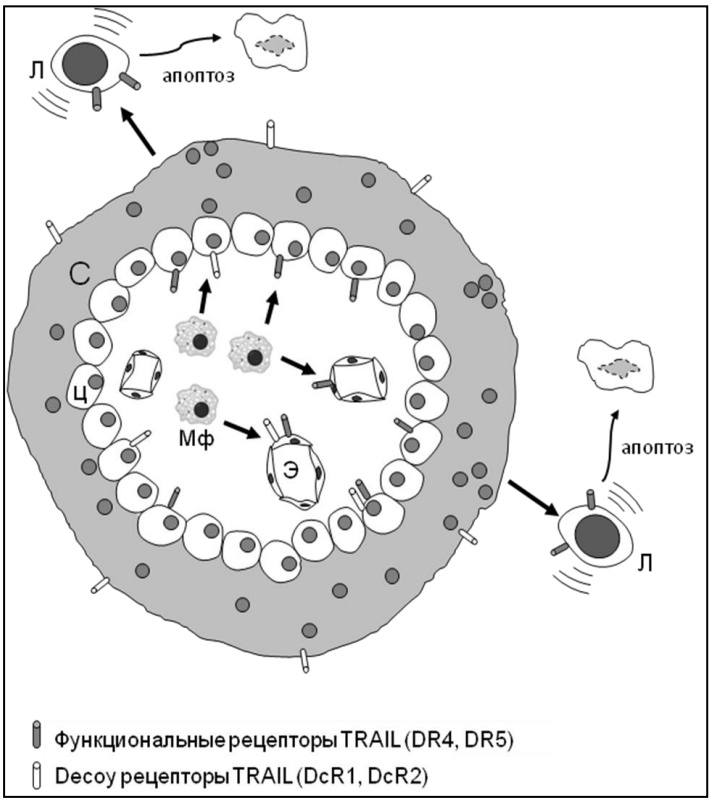


Рисунок 3 - TRAIL-опосредованная сигнализация в плацентарной ворсине. На схематическом срезе представлены основные структурные элементы. Черными стрелками показано действие TRAIL. TRAIL, вырабатываемый синцитиотрофобластом (С), вызывает апоптоз активированных лимфоцитов матери (Л), обеспечивая защиту плода. Экспрессия нефункциональных рецепторов на поверхности синцитиотрофобласта предотвращает влияние TRAIL на эту структуру. В строме ворсины TRAIL, продуцируемый макрофагами (Мф), регулирует апоптоз цитотрофобласта (Ц) и эндотелия сосудов (Э), связываясь с функциональными и нефункциональными рецепторами.

Рецепторы цитокинов. Изучение особенностей экспрессии цитокиновых рецепторов позволяет получить представление о возможности регуляторного воздействия цитокинов на функции самих плацентарных макрофагов. Результаты исследования представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Экспрессия рецепторов цитокинов плацентарными макрофагами. Доля положительно окрашенных клеток, % (n=8-18)

Маркер	I триместр	III триместр б.р.д.	III триместр с. р.д.
IL-2R	$_{3,1}$ 3,6 $_{5,0}$	$_{1,6}$ 2,8 $_{3,8}$	-
IL-17R	$_{4,6}$ 14,1 $_{16,6}$	$_{6,1}$ 11,0 $_{25,0}$	$_{4,0}$ 5,5 $_{14,0}$
IL-23R	$_{1,9}$ 2,7 $_{3,8}$	$_{1,8}$ 2,3 $_{3,1}$	$_{1,2}$ 1,5 $_{1,7}$
TNFR1	$_{9,1}$ 12,8 $_{16,2}$	$_{4,3}$ 16,8 $_{74,0}$	$_{3,4}$ 9,8 $_{18,5}$
TNFR2	$_{3,8}$ 4,9 $_{11,4}$	$_{4,2}$ 5,0 $_{9,0}$	$_{3,0}$ 5,6 $_{21,0}$
TGFβ RII	$_{0,8}$ 3,8 $_{5,3}$	$_{3,2}$ 4,0 $_{4,5}$	$_{1,5}$ 3,4 $_{4,0}$
VEGFR1	$_{4,3}$ 8,9 $_{10,5}$	$_{7,5}$ 16,9 $_{63,7}$	$_{2,0}$ 7,9 $_{50,0}$
VEGFR2	$_{0,5}$ 3,3 $_{3,5}$	$_{1,1}$ 2,1 $_{3,9}$	$_{1,5}$ 1,1 $_{5,9}$

Данные представлены в виде медиан. Слева и справа подстрочным текстом указаны, соответственно, нижняя и верхняя границы 95%-го доверительного интервала для медиан.

Как в I, так и в III триместре беременности плацентарные макрофаги не несли на своей поверхности ни IL-2R, ни IL-15R. Труднее сделать однозначные выводы относительно экспрессии IL-17R и TNFR2 плацентарными макрофагами, поскольку доля положительно окрашенных клеток была менее 15% для IL-17R и около 5% для TNFR2 (таблица 3). С другой стороны, относительно высокая доля IL-17R^{+}- и TNFR2^{+}-клеток в отдельных образцах и значения средней интенсивности флуоресценции свидетельствуют о способности макрофагов продуцировать эти рецепторы. Принимая во внимание тот факт, что IL-17 является индуктором продукции провоспалительных цитокинов IL-1β, TNFα, IL-6 [Jovanovic et al., 1998; Onishi, Gaffen S.L., 2010], мы считаем, что низкий уровень экспрессии рецептора для IL-17 при физиологической беременности является одним из способов предотвращения выраженной воспалительной реакции.

Макрофаги, являясь продуцентами TNFα, обладают и высокой чувствительностью к этому цитокину. Взаимодействие TNFα с его рецепторами в макрофагах, затрагивает регуляцию пролиферативной активности, жизнеспособности, дифференцировки, активации, апоптоза [Parameswaran, Patial, 2010]. Аутокринный способ играет немаловажную роль в TNFα-опосредованной регуляции, влияя на выживаемость макрофагов [Lombardo, 2007]. В нашем исследовании значения, характеризующие процентное содержание TNFR1^{+}- клеток, были сравнительно невелики, однако, они не дают полного представления об экспрессии этого рецептора. Характерной чертой экспрессии TNFR1 оказалась чрезвычайно высокая вариабельность: в разных образцах количество положительно окрашенных клеток варьировало от 2,8 до 82%, а значения интенсивности окраски (коэффициент MFI) – от 1,1 до 6,4. Различия

между исследуемыми группами не достигали статистической значимости, однако при ранжировании полученных результатов различия между группами становились очевидными. Так примерно равное количество исследованных образцов в I и III триместрах беременности (около двух третей) содержали более 10% $TNFR1^{+}$- клеток. В то же время, более 50% положительно окрашенных клеток было обнаружено лишь в 8% образцов в I триместре, и в 40% образцов в III триместре. Это свидетельствует о наличии регуляторных связей, предотвращающих эффекты, опосредованные TNFα, в первую очередь, активацию макрофагов по M1 типу, - и эта регуляция имеет особое значение в I триместре, когда осуществляются важнейшие морфогенетические события: рост плаценты, процессы пролиферации и диференцировки клеток, васкуляризация ворсин и т.д. В этот период как чрезмерная активация, так и апоптоз макрофагов формирующихся плацентарных ворсин могут иметь критическое значение для нормального развития плаценты.

Сходный характер носила экспрессия VEGFR1: количество положительно окрашенных клеток варьировало от 1,4 до 92%, значения коэффициента MFI от 0,9 до 6,8. Более 10% $VEGFR1^{+}$- клеток было обнаружено в 23% и 67% образцов I и III триместров беременности, соответственно. Все образцы I триместра содержали менее 50% положительно окрашенных клеток, тогда как в 28% образцов III триместра $VEGFR1^{+}$ клетки, составляли более 50%. Различия в экспрессии VEGFR1 между разными образцами могут являться проявлением регуляторной функции плацентарных макрофагов по поддержанию уровня VEGF в плацентарных ворсинах. Экспрессия VEGFR1, очевидно, находится под более строгим контролем на ранних стадиях беременности, что позволяет избежать активации макрофагов, последствием которой может стать неконтролируемый рост сосудов плаценты.

В целом изменения поверхностного антигенного фенотипа плацентарных макрофагов от ранних к поздним стадиям гестации, характеризуются увеличением экспрессии молекул, свидетельствующих о функциональной зрелости макрофагов, а также маркеров «альтернативной активации».

Сравнительная характеристика антигенных фенотипов моноцитов пуповинной крови и плацентарных макрофагов в III триместре беременности

Согласно современным представлениям, пул макрофагов плацентарных ворсин может пополняется за счет рекрутированных моноцитов плода. Сравнительная характеристика моноцитов плода и плацентарных макрофагов позволяет выявить сходства и различия этих клеток, а также возможные изменения, происходящие при дифференцировке моноцитов крови в тканевые макрофаги. Результаты сравнения поверхностных антигенных фенотипов двух клеточных популяций представлены в таблице 4.

Практически все моноциты имели фенотип $HLA\text{-}DR^{+}$, тогда как $HLA\text{-}DR^{+}$ клетки составляли лишь три четверти популяции плацентарных макрофагов. Мы связываем сниженную экспрессию HLA-DR в резидентных макрофагах с влиянием локальных регуляторных факторов, действие которых направлено на обеспечение состояния иммунной толерантности в маточно-плацентарном комплексе.

$CD206^{+}$ клетки составляли около 70% популяции плацентарных макрофагов и менее 5% моноцитов, а CD163 экспрессировался небольшой фракцией плацентарных макрофагов (9%) и

практически отсутствовал на поверхности моноцитов пуповинной крови (таблица 4). Эти результаты указывают на то, что дифференцировка моноцитов, попадающих в плацентарные ворсины, происходит в направлении противовоспалительного фенотипа.

Таблица 4. Экспрессия поверхностных антигенов в моноцитах пуповинной крови и плацентарных макрофагах. Доля положительно окрашенных клеток, %

Маркер	Моноциты пуповинной крови (n=18-21)	Плацентарные макрофаги (n=11-33)	*Уровень значимости различий*
Маркеры дифференцировки			
HLA-DR	$_{96,8}$ 98,8 $_{99,7}$	$_{61,6}$ 75,6 $_{83,0}$	***P=4,7·10^{-7}***
CD206	$_{2,3}$ 4,5 $_{7,0}$	$_{57,8}$ 69,9 $_{74,9}$	***P=1,5·10^{-6}***
CD163	$_{0,8}$ 1,6 $_{3,2}$	$_{5,4}$ 9,0 $_{19,2}$	***P=1,6·10^{-5}***
Факторы апоптоза			
TRAIL	$_{3,0}$ 14,8 $_{52,1}$	$_{10,9}$ 22,2 $_{36,0}$	*P=0,578*
TWEAK	$_{3,0}$ 6,7 $_{14,3}$	$_{4,8}$ 6,9 $_{6,9}$	*P=0,638*
Рецепторы цитокинов			
IL-2R/IL-15R	$_{0,8}$ 1,7 $_{3,0}$	$_{1,8}$ 2,8 $_{4,0}$	*P=0,184*
IL-17R	$_{99,3}$ 99,6 $_{99,9}$	$_{5,5}$ 9,7 $_{14,0}$	***P=1,1·10^{-6}***
IL-23R	$_{4,3}$ 12,2 $_{29,6}$	$_{1,5}$ 2,0 $_{2,5}$	***P=4,4·10^{-4}***
TNFR1	$_{10,6}$ 81,5 $_{98,6}$	$_{8,8}$ 14,1 $_{45,2}$	***P=0,024***
TNFR2	$_{4,2}$ 11,0 $_{20,5}$	$_{4,4}$ 5,5 $_{7,6}$	***P=0,046***
TGFβ RII	$_{2,3}$ 3,6 $_{4,9}$	$_{3,1}$ 4,0 $_{4,0}$	*P=0,846*
VEGFR1	$_{7,8}$ 54,4 $_{86,2}$	$_{3,9}$ 15,6 $_{46,1}$	*P=0,106*

При сравнении профилей экспрессии рецепторов цитокинов бросается в глаза различие количественных характеристик экспрессии рецептора IL-17 (IL-17R). Практически все моноциты несли на своей поверхности IL-17R, а в подавляющем большинстве макрофагов (более 90%) этот рецептор отсутствовал (таблица 4). Следует также отметить чрезвычайно низкую вариабельность количества IL-17R^{+} клеток среди моноцитов (коэффициент вариации < 1%) в отличие от популяции плацентарных макрофагов (коэффициент вариации > 80%). Поскольку IL-17 стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов макрофагами [Jovanovic et al., 1998], можно предположить, что дифференцировка макрофагов в плацентарных ворсинах приводит к потере способности отвечать на воздействие IL-17 и генерировать воспалительный ответ.

IL-23 также индуцирует провоспалительные свойства моноцитов/макрофагов, стимулируя продукцию IL-1, IL-6, TNFα [Langrish et al., 2004; Iwakura, Ishigame, 2006]. В нашем исследовании моноциты, имеющие рецепторы к IL-23, составляли около 12%, тогда как в макрофагах экспрессия IL-23R не была обнаружена (таблица 4). Значительное снижение

экспрессии IL-17R и отсутствие IL-23R на поверхности плацентарных макрофагов, вероятно, являются проявлениями локальных регуляторных механизмов: поскольку активация макрофагов маточно-плацентарного комплекса по провоспалительному типу несет угрозу для беременности, минимизация вероятности такой активации снижает риск патологических изменений.

Два типа рецепторов TNF на поверхности моноцитов были представлены в разной степени: более 80% клеток имели фенотип $TNFR1^+$, и чуть более 10% составляли $TNFR2^+$ клетки. По сравнению с моноцитами уровни экспрессии TNFR1 и TNFR2 в плацентарных макрофагах были снижены примерно в 6 и 2 раза, соответственно (таблица 4).

Хотя статистические параметры, характеризующие экспрессию VEGFR1, указывают на заметное снижение этого показателя в популяции плацентарных макрофагов по сравнению с популяцией моноцитов, это различие не достигало статистической значимости из-за высокой вариабельности значений. Экспрессия TNFR1 также отличалась высокими значениями коэффициента вариации. Кроме того, была выявлена существенная связь между этими двумя рецепторами в обеих исследуемых клеточных популяциях: значения коэффициентов корреляции экспрессии TNFR1 и VEGFR1 были выше 0,9 (таблица 5), что, интерпретируется как очень сильная корреляция.

Были обнаружены сильные связи между TNFR1 и VEGFR1 и другими молекулами: TRAIL в моноцитах и LAP (TGF-β1) в макрофагах (таблица 5). Мы предполагаем, что в моноцитах крови и резидентных макрофагах TNF и VEGF могут модулировать разные функции. Корреляция TNFR1 и VEGFR1 с TRAIL может означать, что в моноцитах TNF и VEGF регулируют способность этих клеток индуцировать апоптоз. В макрофагах же под их контролем находится продукция TGF-β1, который участвует в регуляции различных морфогенетических процессов, в том числе, в структурах трофобласта [Chen et al., 2010; Forbes et al., 2010], а также обладает иммуномодулирующими эффектами [Co et al., 2013].

Таблица 5 - Попарные корреляции некоторых поверхностных маркеров в моноцитах пуповинной крови и плацентарных макрофагах в III триместре беременности.

Пары маркеров	Моноциты пуповинной крови			Плацентарные макрофаги		
	r_s	P	n	r_s	P	n
TNFR1 *vs* VEGFR1	$_{0,851}$ **0,956** $_{0,988}$	***<0,0001***	18	$_{0,830}$ **0,933** $_{0,974}$	***<0,0001***	20
TNFR1 *vs* TRAIL	$_{0,701}$ **0,907** $_{0,973}$	***<0,0001***	18	$_{-0,098}$ 0,400 $_{0,737}$	*0,1004*	18
VEGFR1 *vs* TRAIL	$_{0,563}$ **0,821** $_{0,938}$	***<0,0001***	21	$_{0,017}$ 0,446 $_{0,737}$	*0,0373*	22
TNFR1 *vs* LAP (TGF-β1)	$_{-0,392}$ 0,254 $_{0,732}$	*0,4266*	17	$_{0,808}$ **0,928** $_{0,974}$	***<0,0001***	18
VEGFR1 *vs* LAP (TGF-β1)	$_{-0,025}$ 0,525 $_{0,831}$	*0,0539*	19	$_{0,878}$ **0,951** $_{0,981}$	***<0,0001***	21

r_s- коэффициент корреляции Спирмена (слева и справа подстрочным текстом указаны, соответственно, нижняя и верхняя границы 95%-го доверительного интервала); P – уровень значимости; n – количество образцов.

Характеризуя особенности экспрессии поверхностных маркеров в двух исследованных клеточных популяциях, можно сделать следующие выводы:

- макрофаги плацентарных ворсин в III триместре беременности отличаются от моноцитов пуповинной крови пониженным уровнем экспрессии CD14 и HLA-DR;
- экспрессия маркеров «альтернативной активации», в особенности CD206, в популяции плацентарных макрофагов в III триместре беременности существенно выше в сравнении с моноцитами пуповинной крови того же срока, что отражает дифференцировку по M2 типу;
- в отличие от моноцитов крови, резидентные макрофаги, в меньшей степени подвержены цитокиновой регуляции, в том числе по типу обратной связи. Низкий уровень экспрессии рецепторов цитокинов на поверхности плацентарных макрофагов представляет собой один из способов минимизировать возможность активации этих клеток и тем самым снижает риск развития аномальных процессов в плаценте;
- высокая степень корреляции между рецепторами TNF и VEGF указывает на взаимодействие этих цитокинов в регуляции функций мононуклеарных фагоцитов. В моноцитах крови это может быть влияние на продукцию факторов апоптоза (TRAIL), а в макрофагах - модуляция продукции TGF-β1.

Представляются возможными два сценария судьбы моноцитов, проникающих из эмбрионального кровотока в плаценту (рисунок 4). В физиологических условиях популяция резидентных макрофагов в той или иной степени пополняется за счет моноцитов крови плода, которые дифференцируются в сторону M2 фенотипа и приобретают характеристики макрофагов. При наличии в плаценте воспалительного процесса, например, вызванного инфекцией происходит интенсивное рекрутирование моноцитов плода в плацентарные ворсины, но эти клетки не претерпевают существенной дифференцировки и сохраняют «провоспалительный» фенотип, что позволяет им эффективно осуществлять функции антимикробной защиты.

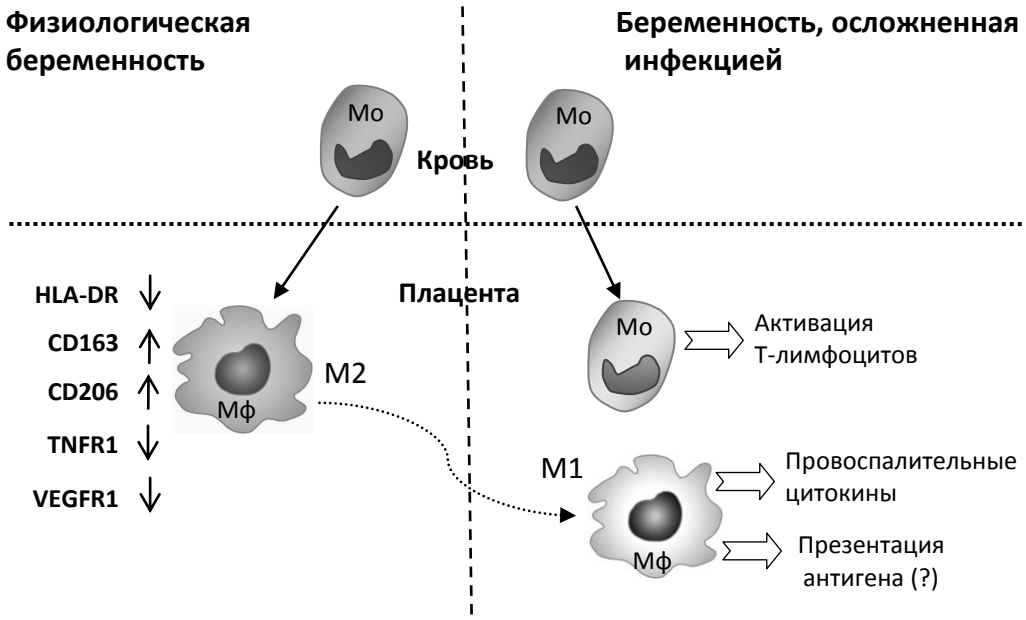


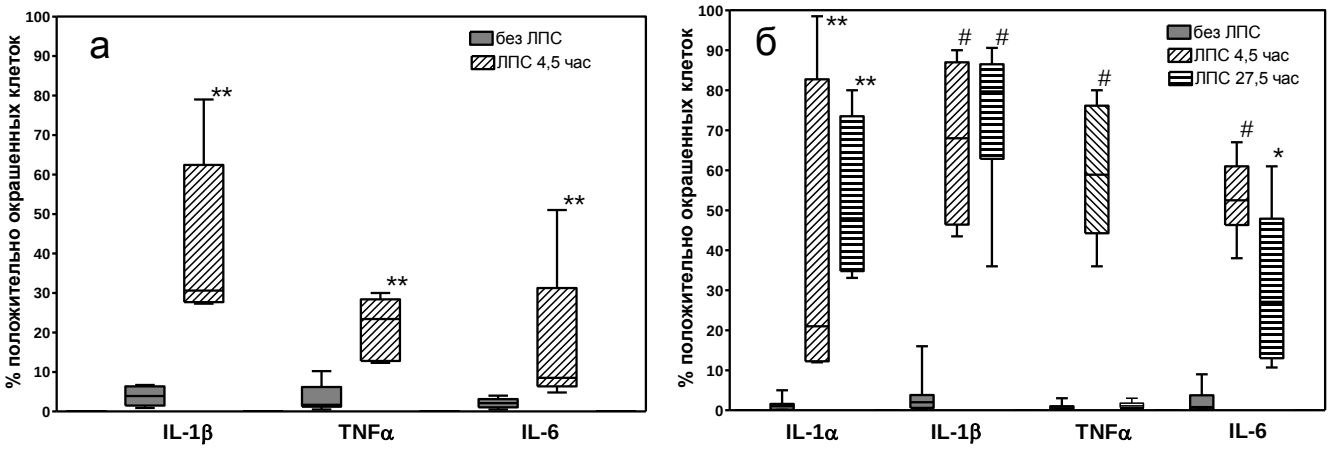
Рисунок 4 - Теоретические представления о взаимотношениях моноцитов плода и плацентарных макрофагов. Мо – моноцит, Мф - макрофаг

Исследование внутриклеточной экспрессии цитокинов плацентарными макрофагами в I и III триместрах беременности

Внутриклеточное определение цитокинов позволяет охарактеризовать способность клеток синтезировать данный фактор и количественно оценить долю клеток-продуцентов в популяции. В результате проведенного анализа все исследованные факторы были распределены на три основные группы.

Группа I – цитокины, наличие которых в клетке не было достоверно установлено: IL-4, IL-12, IL-13, IL-17E. Доля клеток, имеющих положительную окраску на эти цитокины, не превышала 5%, а значение коэффициента MFI не превышало 1.

Группу II составили провоспалительные цитокины IL-1α, IL-1β, IL-6 и TNFα. При отсутствии стимуляции количество положительно окрашенных клеток в популяции плацентарных макрофагов составляло менее 5% (рисунок 5), а коэффициент MFI не превышал 1. Эти результаты свидетельствуют о том, что базальная продукция провоспалительных цитокинов, как на раннем, так и на позднем этапах беременности, находится на минимальном уровне. При стимуляции ЛПС доля клеток-продуцентов в III триместре беременности увеличивалась до 50-80% (рисунок 5б). Клетки, полученные в I триместре, отвечали на стимуляцию менее эффективно: IL-1β и TNFα обнаруживались примерно в 30% и 23% клеток, соответственно, а доля продуцентов IL-6 увеличилась до 8,5% (рисунок 5а). Хронологические различия в провоспалительном ответе на бактериальный эндотоксин выявили пониженную способность плацентарных макрофагов к индукции воспалительных реакций на ранней стадии гестации. Мы полагаем, что этот феномен является следствием регуляторных воздействий, осуществляющих более строгий контроль иммунных функций в критический период морфогенеза плаценты - плацентации, - окончание которого совпадает с концом I триместра беременности.



* P<0,05; ** P<0,01; # P<0,0001 (различия с соответствующими показателями в группе «без ЛПС»)

Рисунок 5 - Внутриклеточная экспрессия цитокинов (группа II) плацентарными макрофагами: а - I триместр (n=20-23), б - III триместр, без родовой деятельности (n=15-27).

В группу III вошли IL-11, IL-17A, IL-17F, LAP(TGF-β1) и VEGF, для которых были характерны относительно высокий уровень базальной продукции, отсутствие изменений при стимуляции ЛПС, а также стабильность экспрессии на протяжении беременности (рисунок 6).

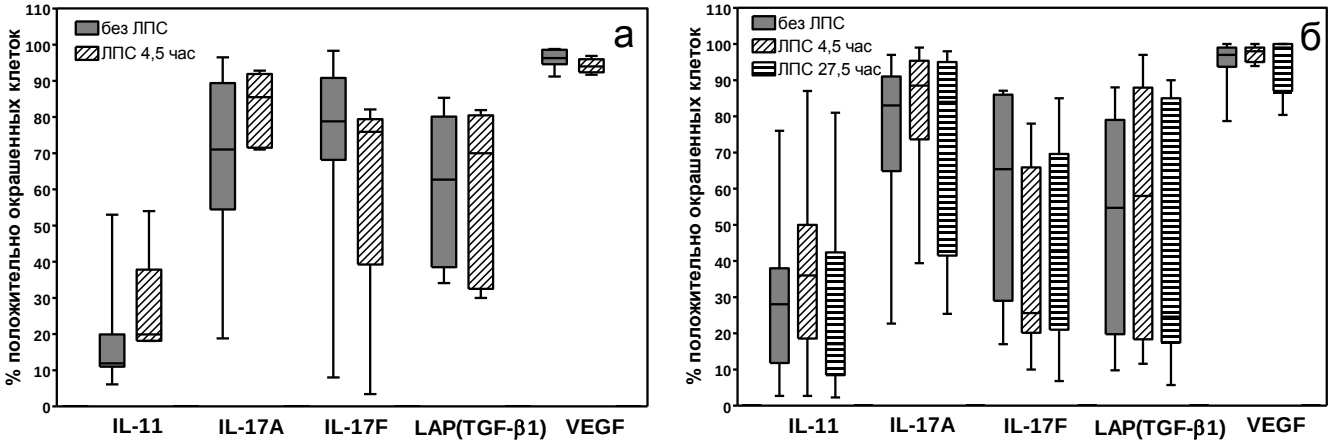


Рисунок 6 - Внутриклеточная экспрессия цитокинов (группа III) плацентарными макрофагами: а - I триместр (n=20-25), б - III триместр, без родовой деятельности (n=20-29).

В нашем исследовании впервые была продемонстрирована способность макрофагов плодной части плаценты продуцировать IL-11. Полученные результаты не оставляют сомнений в том, что макрофаги плацентарных ворсин способны самостоятельно синтезировать IL-17A и IL-17F и являются источниками этих цитокинов в строме плацентарных ворсин на протяжении периода гестации. Этот факт приобретает особую значимость, поскольку другие источники IL-17 в плаценте до сих пор достоверно не установлены. В отличие от других провоспалительных цитокинов, IL-17A конститутивно синтезировался подавляющим большинством клеток в I и III триместрах беременности. Практически все клетки популяции содержали внутриклеточный VEGF (рисунок 6), и показатели интенсивности экспрессии (коэффициенты MFI) были на порядок выше, чем аналогичные показатели для других исследуемых цитокинов. В отличие от других цитокинов, для VEGF была характерна крайне низкая вариабельность значений количества клеток-продуцентов (коэффициент вариации 2-5%), что может свидетельствовать об особой значимости продукции этого фактора макрофагами на протяжении всей беременности.

Мы обнаружили, что уровни внутриклеточной экспрессии IL-11, IL-17 и LAP (TGF-β1) в значительной степени коррелируют между собой (таблица 6).

Тот факт, что экспрессия IL-11, IL-17A, LAP(TGF-β1), IL-17F и VEGF в макрофагах не претерпевала существенных изменений под воздействием бактериального эндотоксина, свидетельствует об участии данных факторов в выполнении макрофагами иных функций, нежели участие в обеспечении противоинфекционной защиты. Мы предполагаем, что роль указанных цитокинов заключается в регуляции свойств и функций структурных элементов плацентарной ворсины – трофобласта и сосудов.

Таблица 6. Попарные корреляции некоторых внутриклеточных цитокинов в плацентарных макрофагах III триместра беременности (без родовой деятельности).

Пары маркеров	Параметр	без стимуляции(n=22)		стимуляция ЛПС 4,5 час (n=19)		стимуляция ЛПС 27,5 час (n=17)	
		r_s	P	r_s	P	r_s	P
IL-11 *vs* IL-17A	доля окрашенных клеток, %	**0,6693**	0,0017	**0,6935**	0,0155	**0,8636**	0,0012
	коэффициент MFI	**0,7328**	0,0004	**0,8322**	0,0013	**0,8000**	0,0047
IL-11 *vs* LAP (TGF-β1)	доля окрашенных клеток, %	**0,8240**	<0,0001	**0,8818**	0,0007	**0,9000**	0,0004
	коэффициент MFI	**0,8223**	<0,0001	**0,9021**	0,0002	**0,8929**	0,0005
IL-17 *vs* LAP (TGF-β1)	доля окрашенных клеток, %	**0,7097**	0,0010	**0,7818**	0,0064	**0,8667**	0,0022
	коэффициент MFI	**0,8178**	<0,0001	**0,8000**	0,0047	**0,8545**	0,0029

r_s - коэффициент корреляции Спирмена, P - уровень значимости

В целом, низкий уровень базальной продукции провоспалительных цитокинов IL-1α, IL-1β, IL-6 и TNFα, высокий уровень экспрессии VEGF, наличие TGF-β являются признаками проангиогенного, иммуносупрессивного фенотипа, характерного для так называемых «альтернативно активированных» макрофагов, выполняющих регуляторные функции [Gordon, Martinez, 2010; Mantovani et al., 2013]. В то же время эти клетки имеют и определенный провоспалительный потенциал, что демонстрирует многократное увеличение количества клеток-продуцентов провоспалительных цитокинов в той же популяции под воздействием бактериального эндотоксина. Речь может идти о своеобразном локально-временном состоянии клеточной популяции, необходимом для реализации конкретной функции на данном этапе гестации и, возможно, в конкретном локусе плаценты.

Исследование секреторной активности плацентарных макрофагов в I и III триместрах беременности

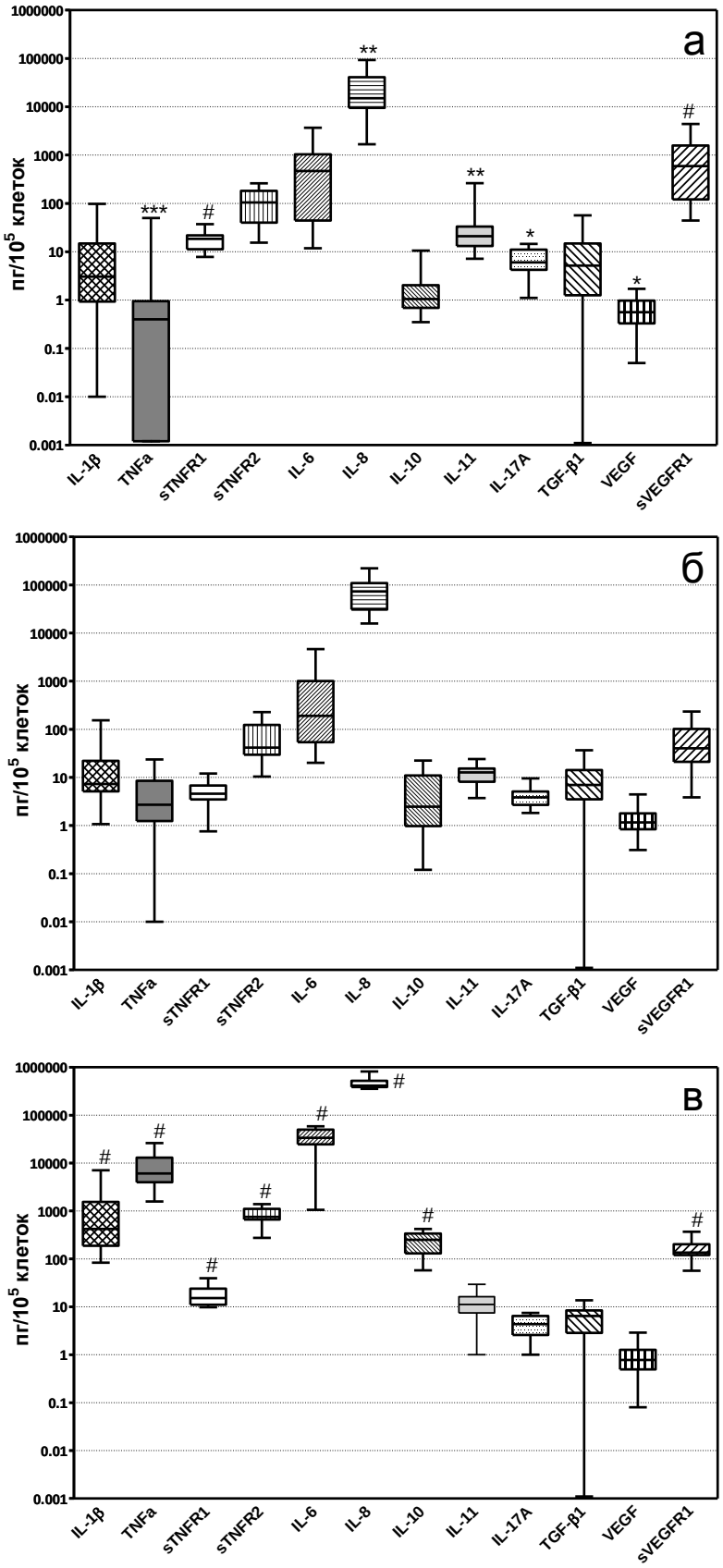
Были исследованы особенности базальной и индуцированной секреции цитокинов и растворимых рецепторов плацентарными макрофагами в I и III триместрах беременности.

Уровни базальной секреции IL-1β и TNFα были относительно невысокими (0,5-12 пг/10^5 клеток), а IL-6 - на один-три порядка выше – 190-470 пг/10^5 клеток (рисунок 7а,б). Как и внутриклеточная продукция, секреция провоспалительных цитокинов значительно усиливалась под воздействием ЛПС: IL-1β – почти в 60, IL-6 – в 180, а TNFα – более чем в 2250 раз (рисунок 7в). В гораздо меньшей степени (в 3 и 18 раз, соответственно) повышалась секреция секреторных вариантов этих рецепторов - sTNFR1 и sTNFR2 (рисунок 7в). Примечательно, что базальный уровень секреции TNFα в I триместре беременности был ниже, а уровни обоих рецепторов - выше, чем в III триместре. Количественные соотношения цитокина и его рецепторов заметно менялись от начала к концу беременности: в I триместре уровни sTNFR1 и sTNFR2 значительно превышали

уровень TNFα (примерно в 47 и 260 раз, соответственно), тогда как в III триместре продукция sTNFR2 была выше в 15 раз, а секреция sTNFR1 лишь в 1,7 раза по сравнению с TNFα. Таким образом, нейтрализующие эффекты растворимых рецепторов TNFα существенно ослабляются к концу беременности. Скоординированные хронологические изменения в секреции TNFα (повышение) и его растворимых рецепторов (снижение) могут представлять собой один из молекулярно-клеточных механизмов подготовки к родам.

Базальный уровень IL-8 на 2-4 порядка превышал концентрации других секреторных факторов. Секреция IL-8 усиливалась приблизительно в 5 раз от I к III триместру, а также при стимуляции ЛПС (рисунок 7). Это повышение может быть обусловлено усилением секреции TNFα, который является известным индуктором IL-8.

Полученные данные демонстрируют способность плацентарных макрофагов производить и секретировать противовоспалительные цитокины IL-10 и IL-11. На способность плацентарных макрофагов продуцировать IL-10 ранее указывали и другие авторы [Sacks et al., 2001; Hanna et al., 2006], однако количественная характеристика секреции IL-10 *in vitro* впервые была дана в наших исследованиях. Нами впервые была обнаружена секреция IL-11 макрофагами плодной части плаценты. Эти результаты меняют представления об участниках цитокиновой сигнализации в плаценте, так как ранее основными продуцентами IL-11 считались структуры трофобласта [Chen et al., 2002; Dimitriadis et al., 2003]. Различие в ответах IL-10 и IL-11 на бактериальный эндотоксин может отражать различную функциональную роль этих цитокинов. При стимуляции ЛПС уровень IL-10 увеличивался параллельно с увеличением продукции провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-6 и TNFα (рисунок 7в), что подтверждает участие этого оппозитного регулятора воспалительного ответа в реализации макрофагами функции антибактериальной защиты. Конститутивный характер продукции IL-11 и отсутствие ответа на стимуляцию эндотоксином предполагают его участие в процессах, имеющих неиммунный характер. Данные литературы свидетельствуют о регуляторном влиянии IL-11 на структуры трофобласта. В этом свете интересным представляется почти двукратное снижение уровня секреции IL-11 плацентарными макрофагами от I к III триместру беременности (рисунок 7а,б), что может отражать динамические изменения в регуляторной функции макрофагов.



*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; #P<0,0001 (различия с соответствующими показателями в группе «III триместр, без родовой деятельности, базальная секреция» (б)

Рисунок 7 - Секреция цитокинов плацентарными макрофагами: а - I триместр, базальная секреция (n=13-21), б - III триместр, без родовой деятельности, базальная секреция (n=17-26), в - III триместр, без родовой деятельности, ЛПС-стимулированная секреция (n=15-23).

Небольшое снижение уровня секреции от I к III триместру было отмечено и для IL-17 (рисунок 7а,б). IL-17 является цитокином, для которого постулируется, прежде всего, роль в противоинфекционном иммунитете и развитии аутоиммунных процессов [Fouser et al., 2008; Iwakura et al., 2008]. Однако, есть сведения, что этот цитокин обладает регуляторными свойствами в отношении основных клеточных типов плаценты, а значит, может оказывать влияние на формирование и функционирование плаценты, модулируя, в частности, ангиогенез и функции трофобласта [Numasaki et al., 2003; Takahashi et al., 2005; Pongcharoen et al., 2006; Pongcharoen, Supalap, 2009; Moran et al., 2011]. Повышенная секреция IL-17A плацентарными макрофагами в I триместре беременности по сравнению с III триместром может быть обусловлена участием в этих процессах, которые наиболее интенсивны на раннем этапе гестации, но затухают или прекращаются на более поздних стадиях. Возможно, похожими эффектами обладает и IL-17F, экспрессию которого в макрофагах плаценты мы продемонстрировали впервые. Модулирующее воздействие IL-17F на ангиогенез и функции эндотелиальных клеток [Starnes et al., 2001] предполагает контроль сосудистого русла плацентарных ворсин макрофагами.

Ни срок беременности, ни стимуляция ЛПС не оказывали существенного влияния на секрецию TGF-β1, уровень которой, в среднем составлял около 10 пг/10^5 клеток (рисунок 7). Более ранние исследования *in vitro* и *in situ* поставили под сомнение TGF-β1-продуцирующую способность макрофагов маточно-плацентарного комплекса [Lyall et al., 2001; Simpson et al., 2002; Heikkinen et al., 2003], однако результаты наших исследований не оставляют сомнений в том, что макрофаги плацентарных ворсин продуцируют и секретируют основную изоформу - TGF-β1. Мы предполагаем, что секретируемый макрофагами TGF-участвует в регуляции пролиферации и гибели структур трофобласта, а также продукции компонентов внеклеточного матрикса.

Уровни секреции VEGF в I и III триместре составляли 0,6 и 1,2 пг/10^5 клеток, соответственно (рисунок 7а,б). Мы предполагаем, что усиление секреции VEGF с увеличением срока беременности является компенсаторным механизмом, позволяющим поддерживать необходимый уровень этого фактора в условиях снижения продукции VEGF структурами трофобласта в III триместре беременности [Demir et al., 2004]. Роль VEGF на позднем этапе гестации может заключаться не столько в стимуляции формирования новых сосудов, сколько в модуляции свойств уже сформированного сосудистого русла плацентарных ворсин.

В этой связи важное значение имеет обнаруженная нами способность плацентарных макрофагов секретировать sVEGFR1. Таким образом, макрофаги плацентарных ворсин являются источниками как проангиогенного фактора VEGF, так и фактора, ослабляющего его действие. Антагонистические эффекты sVEGFR1 осуществляются не только путем связывания свободного цитокина, но и посредством образования гетеродимеров с мембраносвязанным рецептором VEGF [Wu et al., 2010]. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что плацентарные макрофаги экспрессируют все компоненты, позволяющие реализовать оба сценария. Это делает возможным как паракринную регуляцию эндотелия сосудов, так и аутокринную регуляцию собственной активности.

Мы полагаем, что повышенный уровень секреции sVEGFR1 макрофагами в I триместре

является проявлением регуляторных функций этих клеток по отношению к физиологическим процессам, происходящим в этот период, в частности, формированию сосудистого русла, центральную роль в регуляции которого играет VEGF. Превышение физиологических уровней VEGF представляет опасность для беременности, так как это может вызвать чрезмерную васкуляризацию плаценты, а также повышенную проницаемость сосудов, что приведет к контакту сывороточных белков плода и матери.

Увеличение секреции VEGF и снижение секреции sVEGFR1 макрофагами от I к III триместру беременности может быть связано и с регуляцией функций трофобласта. Еще одной мишенью VEGF могут служить сами макрофаги. Снижение секреции sVEGFR1 в III триместре способствует усилению воздействия VEGF на макрофаги и приобретению последними провоспалительных свойств в конце беременности. Мы рассматриваем это как один из молекулярно-клеточных механизмов подготовки к родам. Усиление продукции sVEGFR1 под действием бактериального эндотоксина может рассматриваться как компенсаторная реакция, препятствующая активации макрофагов и развитию воспалительного процесса.

Растворимые формы рецепторов TNFα и VEGF в III триместре характеризуются достаточно высоким коэффициентом корреляции (r_s=0,7820; P<0,0001), как и их мембраносвязанные формы (см. таблицу 5). Известно, что способы образования этих рецепторов принципиально отличаются: в случае sTNFR1 это слущивание мембраносвязанной формы, а в случае sVEGFR1 – альтернативный сплайсинг мРНК. Выявленнные корреляции указывают на наличие общего механизма, обеспечивающего координацию экспрессии этих молекул независимо от способа их продукции.

Поскольку связывание лигандов с VEGFR1 и TNFR1 приводит к активации макрофагов и повышенной секреции VEGF и TNFα, то предотвратить нежелательные эффекты этих цитокинов можно, ограничивая экспрессию мембраносвязанных рецепторов и/или увеличивая секрецию растворимых рецепторов. О том, что оба эти способа реализуются плацентарными макрофагами свидетельствуют результаты, полученные нами: 1) экспрессия поверхностных рецепторов снижена по сравнению с моноцитами пуповинной крови и 2) при активации клеток *in vitro* усиливается секреция растворимых рецепторов.

Представления о роли макрофагов плацентарных ворсин в сигнализации, опосредованной рецепторами TNFR1 и VEGFR1, базирующиеся на собственных результатах и данных литературы, иллюстрирует рисунок 8.

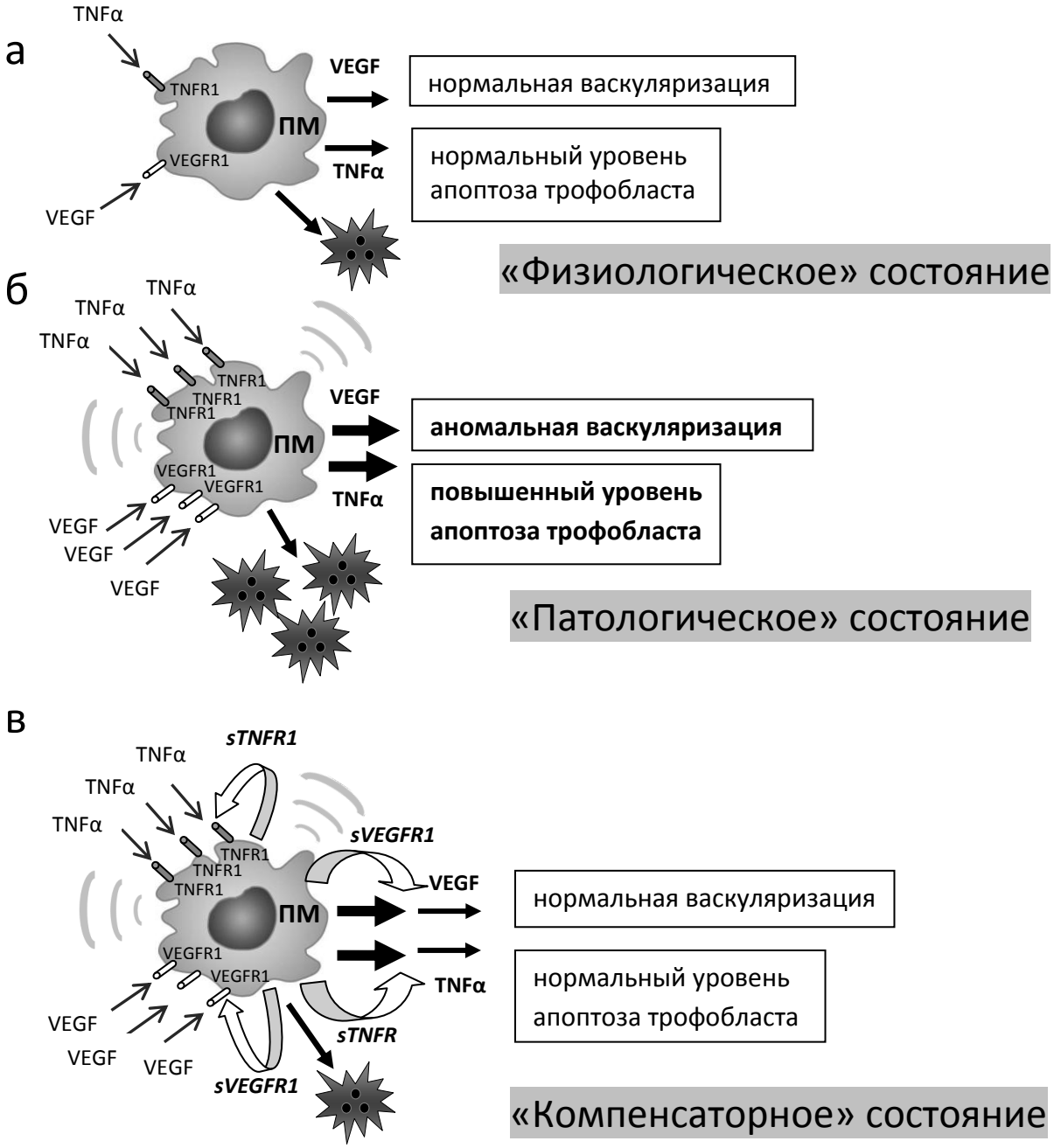


Рисунок 8 - Взаимодействия TNF и VEGF с соответствующими рецепторами, экспрессируемыми плацентарными макрофагами (ПМ), и их роль в развитии плаценты.

а – при низком уровне экспрессии рецепторов макрофаги продуцируют TNFα и VEGF в количествах, необходимых для поддержания процессов апоптоза и ангиогенеза в плацентарных ворсинах на нормальном уровне; наблюдается низкий уровень апоптоза самих макрофагов. **б** – под действием факторов микроокружения или эндогенных сигналов усиливается экспрессия TNFR1 и VEGFR1; повышенное связывание паракринных и аутокринных лигандов вызывает активацию макрофагов, усиление их апоптоза и повышение секреции TNFα и VEGF, что приводит к неконтролируемым процессам васкуляризации и апоптоза. **в** – «компенсаторное» состояние: в активированных макрофагах усиливается экспрессия секреторных форм рецепторов - sTNFR1 и sVEGFR1, которые связывают TNFα и VEGF и предотвращают повышение их внеклеточного уровня, а значит и негативное влияние на сосудистое русло и структуры трофобласта; при этом ослабляется и эффект, оказываемый TNFα и VEGF на макрофаги.

Исследование секреторной активности эксплантатов ворсинчатого хориона в I и III триместрах беременности

Секретируемые плацентарными макрофагами факторы могут участвовать в короткодистантной регуляции структурных элементов плацентарной ворсины, а также вносить вклад в общеплацентарную продукцию, обеспечивающую определенный уровень данного медиатора во внутриматочном компартменте. В нашем исследовании были сопоставлены «секреторные профили» культур плацентарных макрофагов и органотипических культур плодной части плаценты (ворсинчатого хориона).

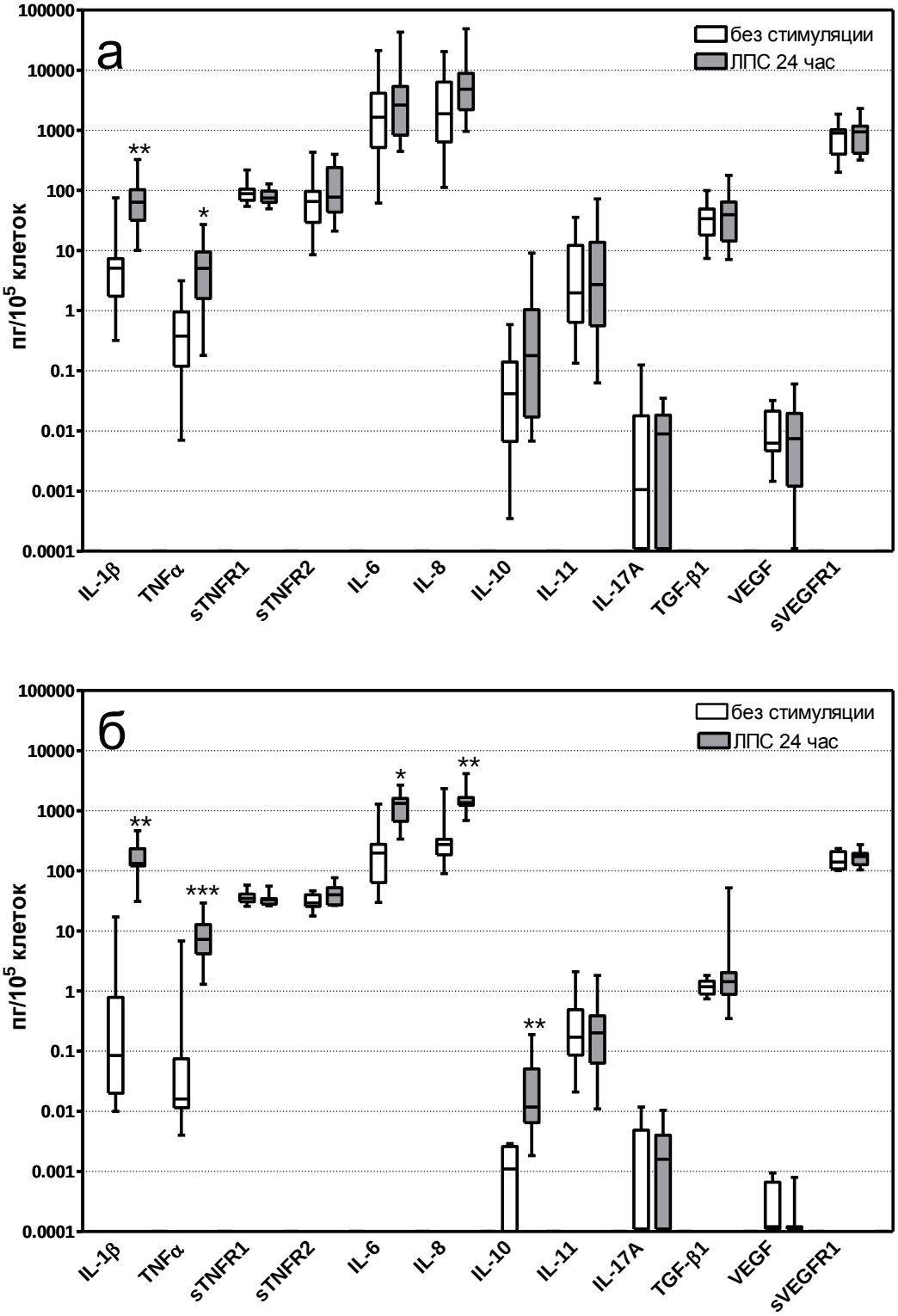
Прямое сравнение секреции органотипических культур ворсинчатого хориона, полученных в разные сроки беременности, является не вполне корректным, поскольку от I к III триместру изменяется качественный состава плацентарных ворсин, в частности, увеличивается удельный вес неклеточных компонентов [Kaufmann et al., 1977; Castellucci, Kaufmann, 1982]. Поэтому мы сравнивали изменения секреторной активности под действием ЛПС, а также «цитокиновые профили» клеточных и органотипических культур соответствующих гестационных сроков.

Как и макрофаги, эксплантаты отвечали на стимуляцию ЛПС увеличением продукции провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-6 и TNFα, а также IL-8 и противовоспалительного цитокина IL-10 (рисунок 9). Были выявлены хронологические различия: если в III триместре повышались уровни всех пяти факторов, то в I триместре ответ наблюдался только для IL-1β и TNFα. Различия (снижение) ЛПС-индуцированной секреции между I и III триместрами были значимыми только для IL-8. Это означает, что в поздние сроки беременности секреторный ответ IL-1β, IL-6, TNFα и IL-10 на бактериальный эндотоксин осуществляется более эффективно. Учитывая стимулирующий эффект ЛПС на продукцию этих факторов плацентарными макрофагами, можно предположить вклад этих клеток в их общеплацентарную продукцию.

Как и макрофаги, эксплантаты не отвечали на стимуляцию ЛПС изменением секреции IL-11, IL-17, TGF-β1 и VEGF, при этом базальная секреция IL-17 и VEGF в них практически отсутствовала (рисунок 9).

Особенность секреторного профиля органотипических культур заключалась в отсутствии ответа растворимых рецепторов TNFα и VEGF на стимуляцию ЛПС (рисунок 9). sTNFR2 является единственным из исследованных факторов, для которого не обнаружены хронологические различия базальных уровней секреции, что указывает на усиление продукции этого фактора ворсинчатым хорионом в III триместре. Это повышение происходит не за счет макрофагов, так как, согласно нашим данным, от I к III триместру в них не наблюдается повышения секреции sTNFR2 (см. выше).

Основываясь на полученных данных, мы предполагаем, что регуляторные эффекты плацентарных макрофагов, опосредованные VEGF и sVEGFR1, носят локальный характер и направлены на структуры, входящие в состав плацентарных ворсин. Вырабатываемый макрофагами TNFα, напротив, может иметь как внутри- так и внеплацентарные эффекты, однако действие нейтрализующих его факторов (растворимых рецепторов) ограничено пределами ворсинчатого хориона.



*P<0,01; **P<0,01; ***P<0,001; #P<0,0001 (различия между ЛПС-стимулированной и базальной секрецией)

Рисунок 9 – Базальная и ЛПС-стимулированная секреция цитокинов эксплантатами ворсинчатого хориона: а - I триместр (n=10-16), б - III триместр, без родовой деятельности (n=10-17)

Исходя из количественных и качественных характеристик базальной и индуцированной продукции провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-6, IL-8, TNFα и противовоспалительного цитокина IL-10, мы полагаем, что макрофаги участвуют не только во внутриплацентарной

цитокиновой сигнализации, но и в обеспечении секреции цитокинов, выделяемых плацентой вовне. Напротив, отсутствие видимых изменений в органотипической секреции растворимых рецепторов sTNFR1, sTNFR2 и sVEGFR1 при стимуляции, скорее, свидетельствует о ничтожности участия макрофагов в их продукции на уровне целого органа. По всей видимости, эти факторы обладают, главным образом локальными эффектами, участвуя в межклеточной коммуникации между структурами плацентарной ворсины. Очевидно, что макрофаги также не участвуют в поддержании внеплацентарных концентраций VEGF и IL-17, поскольку продукция этих факторов в эксплантатах плаценты практически отсутствовала, тогда как уровни их внутриклеточной продукции в плацентарных макрофагах были самыми высокими.

Заключение

Полученные нами данные характеризуют плацентарные макрофаги как уникальную клеточную популяцию. Эти клетки, сохраняя характеристики, позволяющие относить их к системе мононуклеарных фагоцитов, обладают и специфическими фенотипическими и функциональными свойства, отличающими их от других популяций тканевых макрофагов, в том числе, децидуальных. Очевидно, что эти свойства обусловлены теми задачами, которые данная популяция призвана выполнять во время беременности. При этом происходит взаимный обмен сигналами между макрофагами и другими клетками плацентарной ворсины, в результате чего осуществляется регуляция структурно-функциональных элементов плаценты. Результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что популяция плацентарных макрофагов является источником сигнальных молекул, обеспечивающих развитие и нормальное функционирование плаценты и, в конечном счете, физиологическое течение беременности. Плацентарные макрофаги предстают как ключевые клетки, которые не только обеспечивают противоинфекционную защиту развивающегося плода, но и обладают регуляторными свойствами в отношении иммунных реакций, процессов апоптоза, ангиогенеза, а функций трофобласта. Мы полагаем, что пониженная экспрессия цитокиновых рецепторов, является способом предотвратить активацию плацентарных макрофагов по пути, который может привести к повреждению плаценты и нарушению беременности. Это касается и аутокринного эффекта, так как плацентарные макрофаги вырабатывают множество цитокинов, которые кроме воздействия на клетку-мишень могут модулировать и активность самой клетки-продуцента.

Нами обнаружено, что экспрессия большинства исследованных маркеров, характеризующих антигенный фенотип плацентарных макрофагов, не претерпевает существенных изменений от I к III триместру беременности. Это свидетельствует о том, что основные фенотипические признаки этой клеточной популяции формируются в достаточно ранние сроки и сохраняются на протяжении всей беременности.

Нами были выявлены два паттерна экспрессии, в соответствии с которыми продуцируемые плацентарными макрофагами цитокины можно разделить на две основные группы. По нашему мнению, эти группы, в основном, соответствуют двум группам функций, осуществляемым этими клетками. Мы условно обозначили эти функции как «иммунные» и «морфогенетические», понимая всю условность такого деления (рисунок 10).

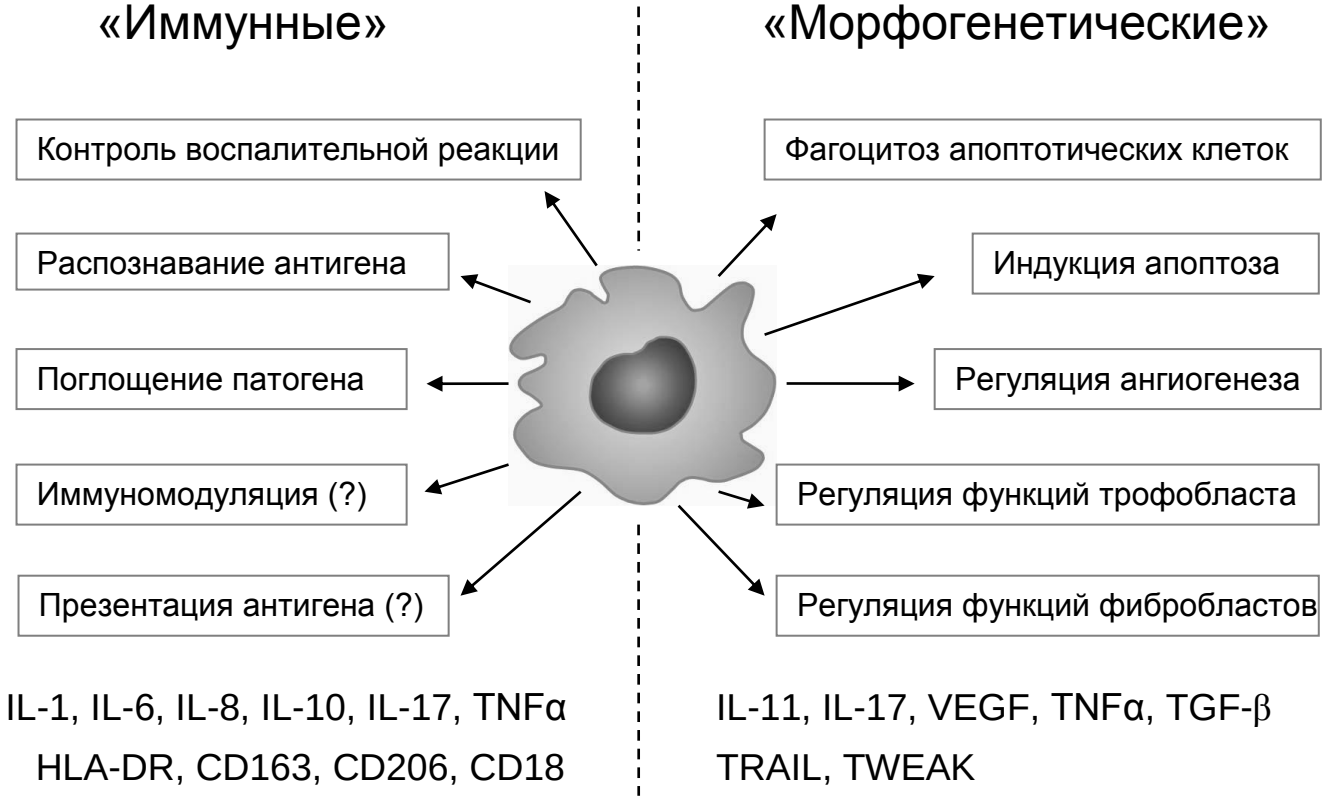


Рисунок 10 - Предполагаемая роль плацентарных макрофагов в иммунных и неиммунных процессах, направленных на поддержание гомеостаза при физиологической беременности.

К первой группе относятся факторы, уровень продукция которых в физиологических условиях невысок, но при контакте с инфекционным агентом многократно увеличивается. В нашем исследовании это IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TNFα, т.е. те цитокины, которые участвуют в развитии и контроле воспалительных реакций. Мы полагаем, что эта группа цитокинов обеспечивает осуществление плацентарными макрофагами функции противоинфекционной защиты, что не исключает других, «неиммунных» эффектов при отсутствии патогена. Именно эти цитокины могут участвовать в процессах регуляции не только внутри, но и вне плаценты, находясь в амниотической жидкости или даже в системной циркуляции матери.

Вторую группу составляют цитокины, продукция которых носит конститутивный характер и не подвержена регуляции со стороны рецепторов PAMP. Эффекты этих цитокинов, по всей видимости, не связаны с защитной функцией макрофагов, а обеспечивают нормальное развитие и функционирование структур плацентарной ворсины, в частности, кровеносных сосудов и трофобласта. Мы предполагаем, что при физиологической беременности цитокины этой группы (IL-11, IL-17A, IL-17F, TGF-β, VEGF) постоянно вырабатываются плацентарными макрофагами и участвуют в регуляции наряду с провоспалительными цитокинами (например, TNFα), продукция которых поддерживается на минимальном уровне. В отличие от цитокинов первой группы, которых могут обладать дистантными эффектами, цитокины второй группы, очевидно, имеют только локальное влияние, которое ограничивается пределами ворсинчатого хориона.

В целом, способность плацентарных макрофагов вырабатывать цитокины первой группы была снижена в I триместре и значительно увеличивалась к концу беременности. Продукция же цитокинов «неиммунной» группы либо оставалась неизменной, либо снижалась от I к III триместру.

Мы считаем, что наблюдаемая в I триместре сниженная продукция провоспалительных цитокинов отражает наличие регуляторных механизмов, обеспечивающих иммунную толерантность со стороны плода и предотвращающих развитие воспалительных реакций, которые могут привести к повреждениям формирующихся структур маточно-плацентарного комплекса на этапе плацентации, когда высок риск преждевременного прерывания беременности и возникновения акушерской патологии. Этот контроль, наиболее строгий на раннем этапе гестации, изменяется в последующий период, что отражается в повышении способности плацентарных макрофагов осуществлять противоинфекционную защиту плода, в том числе за счет усиления стимулированной продукции провоспалительных цитокинов. В конце беременности цитокинпродуцирующая активность макрофагов может быть направлена и на подготовку к родовому акту, который сопровождается повышением уровня провоспалительных цитокинов.

Цитокины «неиммунной» группы, главным образом, участвуют в регуляции локальных клеточно-молекулярных событий, связанных с ростом плаценты, формированием новых и ремоделированием существующих структур. Поэтому уровень их секреции плацентарными макрофагами выше в раннем периоде, когда эти процессы наиболее интенсивны, по сравнению с концом III триместра, когда функционирование плаценты как органа близко к завершению.

В целом, по результатам исследования фенотипических и функциональных характеристик плацентарных макрофагов можно сделать вывод о том, что свойства, связанные с противоинфекционной защитой и участием в воспалительных реакциях, в полной мере складываются в более поздние сроки, чем свойства, связанные с морфогенетическими процессами, регуляцией функций других клеток плацентарных ворсин. С одной стороны, это связано с приоритетом морфогенетических процессов на ранних стадиях формирования плаценты. С другой стороны, это объясняется наличием иммуномодуляторных механизмов, обеспечивающих более строгий контроль на начальном этапе беременности. Очевидно, что осуществление иммунных функций является не единственной (а возможно, и не главной) задачей плацентарных макрофагов, а входит, как составная часть, в более широкое понятие о биологической роли макрофага – поддержание гомеостаза, что применительно к процессам, происходящим в маточно-плацентарном комплексе, означает сохранение беременности и обеспечение ее физиологического течения.

ВЫВОДЫ

1. Разработанный в ходе исследования метод выделения плацентарных макрофагов в I и III триместрах беременности, позволяет получать диссоциированные клеточные культуры достаточно высокой степени гомогенности (не менее 93%). Полученные таким способом клетки сохраняют основные фенотипические характеристики и могут быть использованы для исследования морфофункциональных свойств плацентарных макрофагов *in vitro*.

2. Поверхностный антигенный фенотип плацентарных макрофагов формируется, в основном, на ранней стадии беременности, претерпевая избирательную модификацию на более поздних этапах. Доля клеток, экспрессирующих молекулы HLA-DR TRAIL и TWEAK остается относительно постоянной и составляет около 80%, 20% и 10%, соответственно. В то же время, от I к III триместру беременности увеличивается количество клеток, экспрессирующих CD14 (от 60% до 85%), CD18 (от 87% до 95%) и CD206 (от 42% до 65%).
3. Выявлены значительные различия в характере экспрессии поверхностных молекул между плацентарными макрофагами и моноцитами пуповинной крови в III триместре беременности. В популяции плацентарных макрофагов доля HLA-DR^{+} клеток снижена в 1,3 раза, а количество CD163^{+} и CD206^{+} клеток увеличено в 5,6 и 15,5 раз, соответственно. Отмечено существенное снижение экспрессии рецепторов цитокинов плацентарными макрофагами по сравнению с моноцитами пуповинной крови: IL-17R в 10 раз, IL-23R в 6 раз, TNFR1 в 5,8 раз, TNFR2 в 2 раза.
4. При физиологической беременности внутриклеточный синтез провоспалительных цитокинов в плацентарных макрофагах находится на минимальном уровне и носит индуцибельный характер. В поздние сроки беременности более эффективно осуществляется ответ на стимуляцию бактериальным эндотоксином: доля клеток-продуцентов составляет 30,6% и 68% (IL-1β), 8,5% и 52,5% (IL-6) и 23,4% и 58,9% (TNFα) в I и III триместре беременности, соответственно.
5. Внутриклеточная продукция цитокинов IL-11, IL-17A, IL-17F, TGF-β1 и VEGF в плацентарных макрофагах, носит конститутивный характер, демонстрируя относительно высокий базальный уровень, отсутствие ответа на бактериальный эндотоксин и стабильность от I к III триместру беременности.
6. Уровни секреции цитокинов TNFα и IL-8 плацентарными макрофагами повышаются от I к III триместру беременности в 6,8 и 4,9 раз, соответственно, что свидетельствует об усилении провоспалительных свойств этих клеток в поздние сроки беременности. При этом в 4 раза снижается секреция нейтрализующего TNFα фактора - sTNFR1. Таким образом, регуляция внеклеточного уровня TNFα может осуществляться благодаря модуляции продукции и самого цитокина, и его растворимого рецептора.
7. Двукратное увеличение секреции плацентарными макрофагами ангиогенного фактора VEGF от I к III триместру сопровождается уменьшением секреции антиангиогенного фактора sVEGFR1 почти в 15 раз. Регуляция внеклеточного уровня VEGF плацентарными макрофагами осуществляется преимущественно за счет модуляции секреции растворимых рецепторов VEGF.
8. Продукция TGF-β, IL-11, IL-17 и VEGF макрофагами носит преимущественно локальный характер, обеспечивая базовые уровни этих цитокинов, необходимых для регуляции морфогенетических процессов в ворсинчатом хорионе. В то же время секреция IL-1β, IL-6, IL-8, TNFα и IL-10 обнаружена не только на локальном уровне (плацентарные макрофаги), но и на уровне органа (органотипические эксплантаты ворсинчатого хориона).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанная оригинальная методика рекомендуется для получения гомогенных жизнеспособных клеточных культур плацентарных макрофагов в I и III триместрах беременности, отвечающих задачам изучения *in vitro* фенотипических и функциональных характеристик отдельной клеточной популяции. Рекомендуется использование данной клеточной модели для исследования свойств и функций популяции плацентарных макрофагов при различных акушерских патологиях, таких как преэклампсия и невынашивание, а также для тестирования лекарственных препаратов, направленных на лечение этих патологий.
2. При оценке роли провоспалительных цитокинов в невынашивании беременности рекомендуется определять не только содержание этих цитокинов, но и уровни соответствующих растворимых рецепторов.
3. Во время беременности рекомендуется проводить лабораторный контроль показателей морфогенеза плаценты (VEGFR1 в сочетании с PlGF) и определение уровня провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-8), что позволяет получить более полное представление об участии в патогенезе и прогностической роли этих факторов в развитии акушерских патологий.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Монография

1. Сельков, С.А. Плацентарные макрофаги / С.А. Сельков, О.В. Павлов. –М.: Товарищество научных изданий КМК, 2007. – 186 с.

Статьи в отечественных журналах, рекомендованных ВАК РФ

2. Павлов, О.В. Получение культур плацентарных макрофагов человека / О.В. Павлов, С.А. Сельков, А.В. Селютин, М.С. Шамугия // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 1998. – Т. 125, №5, - С. 579-582.
3. Павлов, О.В. Морфофункциональные характеристики плацентарных макрофагов in vitro при различных исходах беременности / О.В. Павлов, С.А. Сельков, А.В. Селютин, Е.Е. Андреева, М.С. Шамугия, О.Н. Аржанова // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 1999. – Т. 125, №4, - С. 429-432.
4. Павлов, О.В. Секреция фактора некроза опухоли-α и интерлейкина-1 плацентарными макрофагами in vitro при различных исходах беременности / О.В. Павлов, С.А. Сельков, А.В. Селютин, В.В. Ананьева // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 1999. – Т. 128, №7, - С. 97-100.
5. Сельков, С.А. Цитокиновая сеть и макрофаги плаценты в регуляции родовой деятельности / С.А. Сельков, О.В. Павлов, А.В. Селютин // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 2000. – Т. 129, №6, - С. 604-609.
6. Сельков, С.А. Локальная продукция цитокинов у больных наружным генитальным эндометриозом / С.А. Сельков, Н.Л. Крамарева, О.В. Павлов, М.И. Ярмолинская // Ж. акушерства и женских болезней. – 2002. – Т. 51, №3, - С. 57-62.
7. Павлов, О.В. Особенности секреции провоспалительных цитокинов тканью ворсинчатого хориона при невынашивании беременности / О.В. Павлов, С.А. Сельков, Д.В. Лалаян, О.Н. Аржанова // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 2003. – Т. 135, №4, - С. 441-444.
8. Айламазян, Э.К. Роль иммунной системы фетоплацентарного комплекса в механизмах

преждевременного прерывания беременности / Э.К. Айламазян, О.В. Павлов, С.А. Сельков // Акушерство и гинекология – 2004. –№2, - С. 9-11.

9. Павлов, О.В. Иммунология репродукции: старые догмы и новые представления / О.В. Павлов, С.А. Сельков // Ж. акушерства и женских болезней. – 2004. – Т. 53, №1, - С. 89-97.
10. Сельков, С.А. Особенности локальной продукции интерлейкинов и ростовых факторов при наружном генитальном эндометриозе / С.А. Сельков, Н.Г. Солодовникова, О.В. Павлов, Д.А. Ниаури, С.А. Сельков // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 2005. – Т. 139, №4, - С. 439-442.
11. Сельков, С.А. Системные и локальные уровни регуляции иммунопатогенетических процессов у пациенток с наружным генитальным эндометриозом / С.А. Сельков, М.И. Ярмолинская, О.В. Павлов, Д.И. Соколов // Ж. акушерства и женских болезней. – 2005. – Т. 54, №1, - С. 20-28.
12. Павлов, О.В. Спонтанная и ЛПС-индуцированная секреция цитокинов тканью ворсинчатого хориона / О.В. Павлов, Д.В. Лалаян, С.А. Сельков // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 2006. – Т. 141, №6, - С. 668-671.
13. Сельков, С.А. Роль маточно-плацентарных макрофагов в репродуктивной патологии / С.А. Сельков, О.В. Павлов // Ж. акушерства и женских болезней. – 2010. – Т. 59, №1, - С. 122-130.
14. Сельков, С.А. Механизмы имунорегуляции развития плаценты / С.А. Сельков, О.В. Павлов, Д.И. Соколов // Ж.акушерства и женских болезней. – 2011. – Т. 60, №3, - С. 136-140.
15. Павлов, О.В. Продукция IL-10 и IL-11 in vitro как проявление «альтернативной активации» макрофагов плаценты / О.В. Павлов, С.А. Сельков // Иммунология. – 2011. – Т. 32, №6, - С. 301-306.
16. Павлов, О.В. Роль плацентарных макрофагов в регуляции развития и функционирования плаценты / О.В. Павлов // Ж.акушерства и женских болезней. – 2012. – Т. 61, №2, - С. 82-91.
17. Павлов, О.В. Экспрессия васкулоэндотелиального ростового фактора и его рецепторов плацентарными макрофагами *in vitro* / О.В. Павлов, Т.С. Шевелева, С.А. Сельков // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 2012. – Т. 153, №2, - С. 188-192.

Статьи в зарубежных изданиях

18. Pavlov, O. Characterization of cytokine production by human term placenta macrophages in vitro / O. Pavlov, O. Pavlova, E. Ailamazyan, S. Selkov // Am. J. Reprod. Immunol. – 2008. – Vol. 60, N 6, - P. 556-567.
19. Pavlov, O.V. IL-11 expression in human term placental macrophages / O.V. Pavlov, N.L. Kramareva, S.A. Selkov // Am. J. Reprod. Immunol. – 2011. – Vol. 65, N 4, - P. 397-402.
20. Selkov, S.A. Comparative phenotypic characterization of human cord blood monocytes and placental macrophages at term / S.A. Selkov, A.V. Selutin, O.M. Pavlova, N.N. Khromov-Borisov, O.V. Pavlov // Placenta. – 2013. – Vol. 34, N 9, - P. 836-839.
21. Pavlov, O.V. Coordinated expression of TNFα- and VEGF-mediated signaling components by placental macrophages in early and late pregnancy / O.V. Pavlov, D.A. Niauri, A.V. Selutin, S.A. Selkov // Placenta. – 2016.- Vol. 42, N 6, - P. 28-36.

Глава в учебном пособии

22. Полякова, В.О. Нейроиммуноэндокринология плаценты / В.О. Полякова, С.А. Сельков, О.В. Павлов, Д.И. Соколов, Н.С. Линькова, А.А. Полянин, Е.А. Лапина, А.О. Дурновая, А.А. Колобов // Руководство по нейроиммуноэндокринологиии, 3-е изд. / Пальцев М.А., Кветной И.М. – М.: ЗАО Шико, 2014. – С. 565-647.

Основные тезисы докладов

23. Selkov, S.A. Development of technical approaches to studing of placental macrophages cultivated in vitro / S.A. Selkov, A.V. Selutin, O.V. Pavlov // Placenta. – 1995. – Vol. 16, N 6, - P. 66.
24. Pavlov, O.V. The study of placental macrophage morphological and functional properties in long-term cultures / O.V. Pavlov, A.V. Selutin, S.A. Selkov, M.S. Shamugia // Immunology of reproduction international symposium. Kiev, Ukraine: Abst. – 1996. – P. 28.

25. Павлов, О.В. Секреторная активность плацентарных макрофагов в процессе родовой деятельности / О.В. Павлов, А.В. Селютин, С.А. Сельков // Медицинская иммунология. – 2001. – Т. 3, №2, - С. 256.
26. Павлов, О.В. Секреция цитокинов тканью ворсинчатого хориона при различных исходах беременности / О.В. Павлов, Д.В. Лалаян, И.Н. Ожиганова, С.А. Сельков // Медицинская иммунология. – 2002. – Т. 4, №2, - С. 281.
27. Сельков, С.А. Роль цитокинов фетоплацентарного комплекса в невынашивании беременности / С.А. Сельков, О.В. Павлов, Д.В. Лалаян, О.Н. Аржанова // Цитокины и воспаление. – 2002. – Т. 1, №2, - С. 154.
28. Сельков, С.А. Цитокиновая сеть плаценты. Возможная роль в инициации родовой деятельности / С.А. Сельков, О.В. Павлов, Д.В. Лалаян // Медицинская иммунология. – 2003. – Т. 5, №3-4, - С. 341.
29. Павлов, О.В. Особенности продукции цитокинов тканью ворсинчатого хориона на разных этапах беременности / О.В. Павлов, Д.В. Лалаян, С.А. Сельков // Медицинская иммунология. – 2004. – Т. 6, №3-5, - С. 387.
30. Павлов, О.В. Оценка цитокинового профиля плацентарных макрофагов in vitro / О.В. Павлов, М.Г. Зяблицкая, С.А. Сельков // Медицинская иммунология. – 2006. – Т. 8, №2-3, - С. 316.
31. Павлов, О.В. Характеристика цитокиновой продукции и секреции макрофагов плаценты / О.В. Павлов, М.В. Лесничия, С.А. Сельков // Медицинская иммунология. – 2007. – Т. 9, №2-3, - С. 261.
32. Павлов, О.В. Исследование маркеров активации плацентарных макрофагов при нормальной беременности / О.В. Павлов, М.В. Лесничия, О.М. Павлова, О.Н. Аржанова, С.А. Сельков // Российский иммунологический журнал. – 2008. – Т. 2, №2-3, - С. 294.
33. Павлов, О.В. Особенности продукции IL-15 и IL-17 макрофагами плаценты / О.В. Павлов, Н.Л. Крамарева, М.В. Лесничия, О.Н. Аржанова, С.А. Сельков // Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11, №4-5, - С. 414.
34. Павлов, О.В. Плацентарные макрофаги как продуценты факторов регуляции ангиогенеза / О.В. Павлов, Т.С. Шевелева, С.А. Сельков // Российский иммунологический журнал. – 2010. – Т. 4 (13), №4, - С. 385.
35. Павлов, О.В. Экспрессия интерлейкина-11 макрофагами плодовой части плаценты / О.В. Павлов, Т.С. Шевелева, Э.В. Комличенко, С.А. Сельков // Научно-практич. конференция «Клиническая иммунология, иммуногенетика – междисциплинарные проблемы»: тез. докл. – Ташкент, 2010. – С. 84-85.
36. Павлов, О.В. Макрофаги как регуляторные клетки плацентарных ворсин / О.В. Павлов, С.А. Сельков // Медицинская иммунология – 2011. – Т. 13, №4-5, - С. 434-435.
37. Павлов, О.В. Плацентарные макрофаги продуцируют обе формы рецептора TNFα (TNFR1) на ранних и поздних стадиях гестации / О.В. Павлов, С.А. Сельков // Российский иммунологический журнал. – 2012. – Т. 6 (14), №2 (1), - С. 132-133.
38. Павлов, О.В. Особенности антигенных фенотипов моноцитов пуповинной крови и макрофагов плацентарных ворсин в третьем триместре беременности / О.В. Павлов, Н.Н. Хромов-Борисов // Российский иммунологический журнал. – 2013. – Т. 7 (16), №2-3, - С. 282-283.
39. Павлов, О.В. Регуляторная роль макрофагов плаценты / О.В. Павлов, А.В. Балдин, Т.С. Шевелева, С.А. Сельков // Журнал акушерства и женских болезней. – 2013. – Т. 62, спецвыпуск. - С. 61.
40. Павлов, О.В. Роль плацентарных макрофагов в гестационных процессах / О.В. Павлов // Журнал акушерства и женских болезней. – 2015. – Т. 64, спецвыпуск. - С. 83-84.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЛПС - липополисахарид
ЭТС -эмбриональная телячья сыворотка
FcγR: рецептор Fc-фрагмента IgG
FITC – (fluorescein isothyocyanate) флуоресцеин
HLA - (human leukocyte antigen) человеческий лейкоцитарный антиген
IL - (interleukin) интерлейкин
MFI- (mean fluorescence intensity) средняя интенсивность флуоресценции
PAMP – (pathogen-associated molecular pattern) патоген-ассоциированный молекулярный паттерн, ассоциируемые с возбудителем молекулярные структуры
PE – (phycoerythrin) фикоэритрин
TGF - (transforming growth factor) трансформирующий фактор роста
TNF - (tumor necrosis factor) фактор некроза опухоли
TNFR - (TNF receptor) рецептор TNF
sTNFR - (soluble TNF receptor) растворимый рецептор TNF
TRAIL - (TNF-related apoptosis-inducing ligand) TNF-ассоциированный лиганд, индуцирующий апоптоз
TWEAK - (TNF-like weak inducer of apoptosis) TNF-подобный слабый индуктор апоптоза
VEGF - (vascular endothelial growth factor**)** фактор роста эндотелия сосудов
VEGFR - (VEGF receptor) рецептор VEGF
sVEGFR - (soluble VEGF receptor) растворимый рецептор VEGF