

*На правах рукописи*

**МИХАЙЛОВА**

**Валентина Анатольевна**

**ЕСТЕСТВЕННЫЕ КИЛЛЕРЫ:  
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С КЛЕТКАМИ ТРОФОБЛАСТА И РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ  
ПРИВЫЧНОГО НЕВЫНАШИВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ**

3.3.3. Патологическая физиология

3.2.7. Иммунология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени

доктора биологических наук

**Научные консультанты:**

доктор биологических наук, доцент

Соколов Дмитрий Игоревич

доктор медицинских наук, профессор,

заслуженный деятель науки РФ

Сельков Сергей Алексеевич

Санкт-Петербург

2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	9
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	20
1.1 Фенотипические и функциональные характеристики естественных киллеров .....	20
1.1.1 Общая характеристика естественных киллеров .....	20
1.1.2 Фенотип НК-клеток.....	21
1.1.3 Функциональные группы рецепторов НК-клеток .....	21
1.1.3.1 Адгезионные рецепторы НК-клеток .....	21
1.1.3.2 Цитокиновые рецепторы НК-клеток.....	22
1.1.3.3 Рецепторы, регулирующие цитотоксическую активность НК-клеток .....	26
1.1.4 Механизмы реализации цитотоксической функции НК-клетками.....	31
1.1.4.1 Формирование НК-клеткой иммунологического синапса и высвобождение содержимого литических гранул .....	31
1.1.4.2 Рецептор-опосредованные механизмы индукции НК-клетками цитотоксичности .....	33
1.1.4.3 Цитокин-опосредованные механизмы индукции НК-клетками цитотоксичности	34
1.2 Регуляция процесса дифференцировки НК-клеток .....	36
1.2.1 Основные этапы дифференцировки НК-клеток .....	36
1.2.3 Участие транскрипционных факторов в процессе дифференцировки НК-клеток.....	40
1.2.4 Влияние цитокинов на дифференцировку НК-клеток и регуляцию их функций .....	43
1.3. Особенности популяции НК-клеток матки.....	45
1.3.1 Морфофункциональная организация маточно-плацентарного комплекса .....	45
1.3.2 Дифференцировка популяции НК-клеток матки.....	48
1.3.3 Взаимодействия НК-клеток децидуальной оболочки и клеток трофобласта.....	51
1.3.2.1 Фенотип популяций клеток трофобласта .....	51
1.3.2.2 Секретируемые клетками трофобласта цитокины.....	53
1.3.2.3 Влияние цитокинов и участие транскрипционных факторов в регуляции взаимодействия НК-клеток и клеток трофобласта .....	57
1.3.2.4 Участие микровезикул в регуляции взаимодействия НК-клеток и .....	клеток трофобласта.....
1.3.4 Роль НК-клеток в патогенезе привычного невынашивания беременности.....	62
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	66
2.1 Материалы.....	66
2.1.1 Клеточные культуры.....	66

2.1.2 Пациенты .....	67
2.1.3 Мононуклеары периферической крови .....	70
2.1.4 Получение НК-клеток из мононуклеарной фракции периферической крови .....	70
2.1.5 Кондиционированные среды эксплантатов плацент, содержащих ворсины хориона .....	75
2.1.6 Индукторы .....	75
2.2 Дизайн и методы исследования «Оценка влияния клеток трофобласта на фенотип и функции адгезии и трансмиграции НК-клеток в присутствии цитокинов и кондиционированных сред ворсин хориона I и III триместров беременности» .....	75
2.2.1 Оценка фенотипа клеток трофобласта линии JEG-3 в присутствии кондиционированных сред ворсин хориона или цитокинов .....	77
2.2.2 Оценка секреции цитокинов клетками трофобласта линии JEG-3 .....	78
2.2.3 Оценка влияния кондиционированных сред ворсин хориона на фенотип клеток линии NK-92 .....	78
2.2.4 Оценка взаимного расположения клеток линии NK-92 и клеток трофобласта линии JEG-3 во время их трансмиграции .....	79
2.2.5 Оценка функции адгезии клеток линии NK-92 к монослою клеток трофобласта линии JEG-3 в присутствии кондиционированных сред ворсин хориона или цитокинов ...	80
2.2.6 Оценка функции трансмиграции клеток линии NK-92 через монослой клеток трофобласта линии JEG-3 в присутствии кондиционированных сред ворсин хориона или цитокинов .....	81
2.2.7 Оценка фенотипа клеток линии NK-92 до и после трансмиграции через монослой клеток трофобласта линии JEG-3 в присутствии цитокинов .....	82
2.3 Дизайн и методы исследования «Оценка параметров дифференцировки НК-клеток в присутствии клеток трофобласта» .....	82
2.3.1 Оценка рецепторного профиля клеток линии NK-92 после культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3 и цитокинами .....	84
2.3.2 Оценка фенотипа клеток линии NK-92 после культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3 в присутствии кондиционированных сред ворсин хориона .....	86
2.3.3 Оценка содержания мРНК гена NCAM1, кодирующего CD56, в клетках линии NK-92 после культивирования в присутствии цитокинов .....	87
2.3.4 Оценка активации TGF $\beta$ -сигнального пути в клетках линии NK-92 под влиянием клеток трофобласта линии JEG-3 .....	87
2.3.5 Оценка фенотипа НК-клеток периферической крови после культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3 в присутствии цитокинов .....	89

2.3.6 Оценка содержания транскрипционных факторов в клетках линии NK-92 после культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3 .....	90
2.4 Дизайн и методы исследования «Оценка пролиферативной активности NK-клеток периферической крови в присутствии клеток трофобласта».....	91
2.4.1 Оценка пролиферативной активности рNK-клеток, в составе мононуклеаров, в присутствии клеток трофобласта, у здоровых небеременных женщин и беременных женщин в I триместре.....	92
2.4.2 Оценка пролиферативной активности spNK-клеток, изолированных из мононуклеарной фракции, в присутствии клеток трофобласта у здоровых небеременных женщин и беременных женщин в I триместре.....	93
2.4.3 Оценка популяционного состава рNK-клеток в составе мононуклеарной фракции периферической крови в присутствии клеток линии JEG-3.....	96
2.4.4 Определение пролиферативной активности рNK-клеток в составе мононуклеарной фракции в присутствии клеток трофобласта у женщин с привычным невынашиванием беременности.....	97
2.5 Дизайн и методы исследования «Оценка продукции клетками линии NK-92 цитокинов и микровезикул» .....	97
2.5.1 Оценка секреции цитокинов клетками линии NK-92.....	98
2.5.2 Оценка продукции микровезикул клетками линии NK-92.....	99
2.5.2.1 Выделение микровезикул клеток линии NK-92.....	99
2.5.2.2 Гранулометрический анализ микровезикул клеток линии NK-92 .....	100
2.5.2.3 Атомно-силовая микроскопия микровезикул клеток линии NK-92 .....	100
2.5.2.4 Трансмиссионная электронная микроскопия микровезикул клеток линии NK-92.....	100
2.5.2.5 Фенотипический анализ микровезикул клеток линии NK-92 методом проточной цитофлуориметрии.....	101
2.5.2.6 Оценка содержания гранзима В и перфорина в микровезикулах клеток линии NK-92 .....	103
2.5.2.7 Оценка переноса флуоресцентной метки от микровезикул клеток линии NK-92 клеткам линии JEG-3 .....	104
2.5.2.8 Оценка влияния микровезикул клеток линии NK-92 на фенотип клеток трофобласта .....	104
2.5.2.9 Оценка влияния микровезикул клеток линии NK-92 на пролиферацию и миграцию клеток трофобласта линии JEG-3 .....	105

2.5.2.10 Оценка влияния микровезикул клеток линии НК-92 на активацию внутриклеточной передачи сигнала в клетках трофобласта линии JEG-3 .....	106
2.6 Дизайн и методы исследования «Оценка цитотоксической функции клеток линии НК-92 в отношении клеток трофобласта линии JEG-3».....	107
2.6.1 Оценка гибели клеток-мишеней линии К-562 после инкубации с клетками линии НК-92 .....	109
2.6.2 Оценка гибели клеток трофобласта линии JEG-3 после инкубации с клетками линии НК-92 в присутствии цитокинов или кондиционированных сред ворсин хориона.....	111
2.6.3 Определение экспрессии проапоптотических рецепторов клеток линии НК-92 после инкубации с клетками трофобласта линии JEG-3 и цитокинами .....	112
2.6.4 Оценка содержания гранзима В и перфорина в клетках линии НК-92 и каспаз 3 и 8 в клетках линии JEG-3 после контактного и дистантного взаимодействия .....	112
2.6.4.1 Дистантное сокультивирование НК-клеток и клеток трофобласта. ....	112
2.6.4.2 Контактное сокультивирование НК-клеток и клеток трофобласта. ....	112
2.6.4.3 Оценка содержания гранзима В и перфорина в клетках линии НК-92 и каспаз 3 и 8 в клетках линии JEG-3 .....	113
2.6.5 Оценка цитотоксичности клеток линии НК-92 к клеткам линии К-562 после их совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3 .....	114
2.6.6 Определение содержания перфорина, гранзимов и серпинов в клетках линий НК-92 и JEG-3 после их совместного культивирования.....	114
2.7 Дизайн и методы исследования «Оценка цитотоксической функции НК-клеток периферической крови в отношении клеток трофобласта при привычном невынашивании беременности» .....	115
2.7.1 Оценка цитотоксичности рНК-клеток и spNK-клеток периферической крови, в отношении клеток трофобласта, у здоровых небеременных женщин и беременных женщин в I триместре.....	116
2.7.2 Оценка цитотоксичности рНК-клеток в составе мононуклеаров, в отношении клеток трофобласта, у здоровых небеременных фертильных женщин и женщин с привычным невынашиванием беременности.....	116
2.8 Статистическая обработка данных .....	116
<b>ГЛАВА 3. ВЛИЯНИЕ КЛЕТОК ТРОФОБЛАСТА НА ФЕНОТИП И ФУНКЦИИ АДГЕЗИИ И ТРАНСМИГРАЦИИ НК-КЛЕТОК В ПРИСУТСТВИИ ЦИТОКИНОВ И КОНДИЦИОНИРОВАННЫХ СРЕД ВОРСИН ХОРИОНА I И III ТРИМЕСТРОВ БЕРЕМЕННОСТИ.....</b>	<b>118</b>
3.1 Фенотипические изменения клеток трофобласта линии JEG-3.....	118

в присутствии цитокинов.....	118
3.2 Фенотипические изменения клеток трофобласта линии JEG-3 в присутствии КС ворсин хориона .....	119
3.3 Секреция клетками трофобласта линии JEG-3 цитокинов.....	122
3.4 Влияние кондиционированных сред ворсин хориона на фенотип клеток линии НК-92 .	122
3.5 Взаимное расположения клеток линии НК-92 и клеток трофобласта линии JEG-3 во время их адгезии и трансмиграции.....	124
3.6 Адгезия к монослою клеток трофобласта линии JEG-3 и трансмиграция клеток линии НК-92 в присутствии цитокинов и кондиционированных сред ворсин хориона .....	126
3.7 Фенотип клеток линии НК-92 до и после трансмиграции через монослой клеток трофобласта линии JEG-3 в присутствии цитокинов .....	127
<b>ГЛАВА 4. ИЗМЕНЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ НК-КЛЕТОК В ПРИСУТСТВИИ КЛЕТОК ТРОФОБЛАСТА .....</b>	<b>134</b>
4.1 Рецепторный профиль клеток линии НК-92 после совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3 .....	134
4.2 Влияние IL-15 на фенотип клеток линии НК-92 после совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3 .....	143
4.3 Влияние IL-18 на фенотип клеток линии НК-92 после совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3 .....	144
4.4 Влияние TNF $\alpha$ на фенотип клеток линии НК-92 после совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3 .....	145
4.5 Влияние IL-10 на фенотип клеток линии НК-92 после совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3 .....	145
4.6 Влияние IFN $\gamma$ на фенотип клеток линии НК-92 после совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3 .....	150
4.7 Влияние TGF $\beta$ на фенотип клеток линии НК-92 после совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3 .....	150
4.8 Влияние кондиционированных сред ворсин хориона на фенотип клеток линии НК-92 после совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3 .....	151
4.9 Содержание мРНК гена NCAM1, кодирующего CD56, в клетках линии НК-92 в присутствии цитокинов.....	155
4.10 Активация сигнального пути TGF $\beta$ в клетках линии НК-92 под влиянием клеток трофобласта линии JEG-3 .....	156
4.11 Влияние цитокинов и клеток трофобласта линии JEG-3 на фенотип рНК-клеток здоровых небеременных женщин .....	158

4.12 Влияние клеток трофобласта линии JEG-3 на содержание транскрипционных факторов в клетках линии НК-92 .....	161
<b>ГЛАВА 5. ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ НК-КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ПРИСУТСТВИИ КЛЕТОК ТРОФОБЛАСТА .....</b>	<b>164</b>
5.1 Пролиферативная активность рНК-клеток в составе мононуклеаров в присутствии клеток трофобласта, у здоровых небеременных женщин и беременных женщин в I триместре.....	164
5.2 Пролиферативная активность рНК-клеток, изолированных из фракции мононуклеаров, в присутствии клеток трофобласта, у здоровых небеременных женщин и беременных женщин в I триместре .....	167
5.3 Популяционный состав рНК-клеток, прокультивированных в присутствии клеток трофобласта, у здоровых небеременных женщин и беременных женщин в I триместре .....	168
5.4 Пролиферативная активность рНК-клеток у женщин с привычным невынашиванием беременности.....	170
<b>ГЛАВА 6. ОБРАЗОВАНИЕ НК-КЛЕТКАМИ МИКРОВЕЗИКУЛ И ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ.....</b>	<b>177</b>
6.1 Секреция клетками линии НК-92 цитокинов .....	177
6.2 Образование клетками линии НК-92 микровезикул.....	178
6.2.1 Гранулометрический анализ МВ клеток линии НК-92.....	178
6.2.2 Атомно-силовая микроскопия МВ клеток линии НК-92.....	178
6.2.3 Трансмиссионная электронная микроскопия микровезикул клеток линии НК-92.....	179
6.2.4 Фенотипический анализ микровезикул клеток линии НК-92 методом проточной цитофлуориметрии.....	180
6.2.5 Содержание гранзима В и перфорина в микровезикулах клеток линии НК-92.....	183
6.2.6 Перенос флуоресцентной метки от микровезикул клеток линии НК-92 клеткам линии JEG-3.....	184
6.2.7 Влияние микровезикул клеток линии НК-92 на фенотип клеток трофобласта.....	186
6.2.8 Влияние микровезикул клеток линии НК-92 на пролиферацию и миграцию клеток трофобласта .....	187
<b>ГЛАВА 7. ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ КЛЕТОК ЛИНИИ НК-92 В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОК ТРОФОБЛАСТА.....</b>	<b>191</b>
7.1 Цитотоксическая активность клеток линии НК-92 под влиянием цитокинов.....	191
7.2 Цитотоксическая активность клеток линии НК-92 под влиянием кондиционированных сред ворсин хориона.....	197

7.3 Экспрессия проапоптотических рецепторов и лигандов клеток линии НК-92 в присутствии клеток трофобласта и цитокинов.....	197
7.4 Экспрессия проапоптотических рецепторов и лигандов клеток линии НК-92 в присутствии клеток трофобласта и кондиционированных сред ворсин хориона.....	201
7.5 Содержание гранзима В и перфорина в клетках линии НК-92 и каспаз 3 и 8 в клетках линии JEG-3 после контактного и дистантного взаимодействия .....	203
7.6 Цитотоксическая активность клеток линии НК-92 после совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3 .....	207
7.7 Содержание белков, связанных с цитотоксичностью, в клетках линии НК-92, после совместного контактного культивирования с клетками линии JEG-3 и цитокинами .....	208
7.8 Содержание белков, связанных с цитотоксичностью, в клетках линии JEG-3, после совместного контактного культивирования с клетками линии НК-92 и цитокинами .....	211
<b>ГЛАВА 8. ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ НК-КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОК ТРОФОБЛАСТА ПРИ ПРИВЫЧНОМ НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ.....</b>	<b>218</b>
<b>ГЛАВА 9. ОБСУЖДЕНИЕ.....</b>	<b>222</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>278</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>287</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....</b>	<b>289</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>290</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>294</b>



## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Вопросы репродуктивного здоровья приобретают все большую актуальность в связи с приоритетной задачей обеспечения роста численности населения Российской Федерации. Одной из острых проблем современного акушерства является привычное невынашивание беременности (ПНБ), характеризующееся двумя и более потерями беременности на сроке до 22 недель [33]. Частота ПНБ в популяции составляет 1-5% от числа всех беременностей [33], при этом в общей структуре невынашивания беременности частота ПНБ достигает по разным оценкам от 5 до 25% [4, 12, 57, 199]. Адекватная трансформация эндометрия, внедрение в него бластоцисты с последующей инвазией клеток трофобласта плодного происхождения обеспечивают формирование плаценты и физиологическое течение беременности [300, 589]. Внедрение клеток трофобласта в эндометрий матки определяет их возможные межклеточные взаимодействия с клетками микроокружения. В эндометрии присутствуют разные популяций лимфоидных клеток, в том числе естественные киллеры (от англ. Natural Killer (NK) cells - NK-клетки), которые в первом триместре беременности становятся доминантной популяцией лимфоидных клеток децидуальной оболочки [166, 190, 240, 393, 698, 734]. Иммуногистохимические исследования подтверждают близкую локализацию NK-клеток и клеток экстравиллезного трофобласта [62, 140, 141]. Секреторные факторы, синтезируемые децидуальными (d)NK-клетками, регулируют инвазию клеток трофобласта *in vitro* [303, 413]. Сниженное содержание NK-клеток в децидуальной оболочке ассоциировано с патологическим вращением плаценты [196]. Отмечают, что иммунологические факторы, в том числе дисфункция dNK-клеток, могут являться одной из причин повторных потерь беременности [4, 8, 32, 57, 232].

Согласно общепринятой точке зрения, физиологическое развитие беременности сопровождается снижением цитотоксической активности NK-клеток [395, 764]. В то же время dNK-клетки экспрессируют как ингибирующие, так и активирующие цитотоксическую активность рецепторы [395, 409, 644]. Данные о связи фенотипических и функциональных характеристик dNK-клеток с развитием ПНБ неоднозначны. Например, увеличение количества CD56<sup>+</sup> NK-клеток в матке ассоциировано с развитием ПНБ [692]. Продемонстрировано, что для dNK-клеток, полученных *in vitro* из NK-клеток периферической крови (pNK-клеток) пациенток с ПНБ, характерна сниженная экспрессия рецепторов KIR2DL1 и ILT-2, а также сниженная продукция VEGF [326]. По другим данным при ПНБ снижено количество dNK-клеток с регуляторным фенотипом CD56<sup>bright</sup>, а также синтез ими цитокинов [388, 648]. При ПНБ dNK-клетки характеризуются повышенной экспрессией гранзима В (GrzB), перфорина, и

гранулизины, с чем связывают их повышенную цитотоксическую активность [375, 475, 620]. Предпринимаются попытки разработать подходы к определению рисков развития невынашивания беременности на основе оценки изменений функциональной активности NK-клеток [652]. Однако, отсутствие единой точки зрения на происхождение пула dNK-клеток усложняет поиск модели для исследования межклеточных взаимодействий, развивающихся в децидуальной оболочке.

По данным литературы возможными вариантами пополнения пула dNK-клеток являются миграция NK-клеток или их предшественников из периферической крови в матку по градиенту концентрации хемокинов, дифференцировка в децидуальной оболочке из CD34<sup>+</sup> стволовых клеток, пролиферация находящихся в матке NK-клеток [418, 610, 734]. Для моделирования процесса формирования популяции dNK-клеток необходимо оценить степень влияния клеток трофобласта на характеристики NK-клеток. Так, с помощью высокопроизводительного метода секвенирования РНК одиночных клеток (single-cell RNA-seq) установлена экспрессия клетками экстравиллезного трофобласта рецепторов к хемокинам, секреция которых характерна для dNK-клеток [72]. Показано, что культивирование dNK-клеток с клетками трофобласта линии HTR-8 стимулировало миграционную активность последних [303]. Блокирование хемокина CXCL12, секретируемого клетками трофобласта, подавляло экспрессию адгезионных рецепторов NK-клеток с фенотипом CD56<sup>bright</sup> [405]. В целом, оценка степени влияния клеток трофобласта на формирование пула dNK-клеток носит разрозненный характер.

Комплексное рассмотрение характеристик естественных киллеров в условиях взаимодействия с клетками трофобласта позволит уточнить механизмы формирования пула dNK-клеток и охарактеризовать степень влияния клеток трофобласта на NK-клетки. В связи возможным участием рNK-клеток в формировании пула dNK-клеток, а также с инвазивностью процедуры получения биопсии эндометрия и невозможностью ее проведения во время беременности, актуально исследование вклада дисфункции рNK-клеток в развитие ПНБ.

### **Степень разработанности темы исследования**

В литературе представлены данные об экспрессии NK-клетками различных рецепторов, регулирующих их цитотоксическую функцию [452, 462, 605], а также рецепторов адгезии [667] и цитокиновых рецепторов [336]. Описаны основные этапы формирования NK-клеткой иммунологического синапса с потенциальной клеткой-мишенью и возможные варианты реализации естественными киллерами цитотоксической активности [415]. Традиционно dNK-клетки рассматривают, как регуляторные клетки, обладающие сниженной цитотоксичностью [393, 541, 759]. Механизмы реализации цитотоксической активности dNK-клетками однозначно не установлены, что связано с ограничением в получении достаточного количества

биологического материала для исследований и методическими нюансами выделения клеток из плаценты и их типирования. Значительная часть исследований, касающихся dNK-клеток, связана с оценкой их количества и локализации в децидуальной оболочке, а также экспрессии ими ряда рецепторов [140, 141, 326, 648]. Продемонстрировано, что dNK-клетки продуцируют цитокины IFN $\gamma$ , VEGF, PLGF, IP-10 [130, 267, 303], которые в модели *in vitro* регулируют инвазию клеток трофобласта и ангиогенез [288, 303].

В исследованиях роли естественных киллеров в развитии репродуктивных патологий, как правило оценивают количество NK-клеток, в ряде случаев дополняя описание отдельными фенотипическими маркерами, генотипированием материала [692, 711] и оценкой цитотоксической функции [565]. Данные, касающиеся изменения секреторной активности dNK-клеток при ПНБ неоднозначны. Так, показано повышенное содержание IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  в dNK-клетках при ПНБ по сравнению с физиологическим течением беременности [390]. По другим данным, содержание IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  в dNK-клетках у женщин при ПНБ в секреторной фазе цикла снижено по сравнению со здоровыми небеременными женщинами [231]. Выделяются работы, проведенные с использованием животных. Например, у мышей описаны изменения фенотипического и функционального статуса dNK-клеток в экспериментальных моделях инфекций [380, 733]. На крысах продемонстрировано, что в отсутствие NK-клеток развивается глубокая патологическая инвазия клеток трофобласта в стенку матки [548]. Необходимо отметить, что несмотря на гемохориальный тип плаценты, характерный как для человека, так и для мыши и крысы, клеточная организация маточно-плацентарного контакта и глубина инвазии клеток трофобласта в стенку матки различается [598, 607, 608], что затрудняет интерпретацию результатов, полученных с использованием модельных животных.

Предпринимаются попытки оценки содержания популяций иммунных клеток децидуальной оболочки человека с помощью высокопроизводительной цитометрии [226, 724]. Однако эти исследования выполнены на малых выборках пациентов [724]. Прибегают также к оценке dNK-клеток методом *single-cell RNA-seq*, в подобных работах представлены малые выборки, кроме того, отсутствуют данные о наличии рецепторов на мембране клеток в функциональном состоянии [714]. Механизмы формирования пула dNK-клеток и их взаимодействия с клетками микроокружения матки остаются мало изученными, идет поиск модели, воспроизводящей влияние клеток трофобласта на фенотипические и функциональные характеристики NK-клеток. Возможность образования пула dNK-клеток за счет миграции NK-клеток из периферической крови исследована на мышах [609, 648], отдельные работы выполнены с использованием биологического материала человека [306, 405, 701]. В связи с вышеперечисленным вопрос о влиянии клеток трофобласта на функциональные характеристики

НК-клеток человека остается открытым. Степень влияния взаимодействия НК-клеток с клетками трофобласта на патогенез ПНБ не определена.

### **Цель исследования**

Определить изменения фенотипических и функциональных характеристик естественных киллеров в условиях взаимодействия с клетками трофобласта в экспериментальном исследовании и установить роль естественных киллеров в патогенезе привычного невынашивания беременности.

Для достижения цели были сформулированы следующие задачи:

1. Охарактеризовать влияние цитокинов и растворимых факторов, секретируемых клетками ворсин хориона I и III триместров беременности, на клетки трофобласта и оценить адгезию НК-клеток к клеткам трофобласта и их трансмиграцию с использованием клеточных линий NK-92 и JEG-3.

2. Определить экспрессию дифференцировочных рецепторов, транскрипционных факторов и активацию внутриклеточной передачи сигнала от клеток трофобласта в клетках линии NK-92 в присутствии цитокинов и растворимых факторов, секретируемых клетками ворсин хориона I и III триместров беременности, оценить наличие аналогичных изменений в случае использования рНК-клеток.

3. Оценить пролиферативную активность НК-клеток в составе моноклеарной фракции периферической крови и выделенных из нее НК-клеток в присутствии клеток трофобласта у здоровых небеременных женщин и женщин с физиологической беременностью в I триместре.

4. Сравнить особенности пролиферации рНК-клеток у здоровых небеременных женщин и женщин с физиологической беременностью в I триместре с пролиферацией рНК-клеток у женщин с привычным невынашиванием беременности.

5. Определить продукцию цитокинов и микровезикул клетками линии NK-92 после культивирования в присутствии цитокинов, оценить влияние микровезикул НК-клеток на клетки трофобласта с использованием клеточных линий NK-92 и JEG-3.

6. Охарактеризовать цитотоксическую функцию и экспрессию проапоптотических рецепторов клетками линии NK-92 и содержание проапоптотических белков в НК-клетках и клетках трофобласта в модели их сокультивирования.

7. Оценить цитотоксическую функцию НК-клеток в составе моноклеарной фракции периферической крови и выделенных из нее НК-клеток по отношению к клеткам трофобласта у здоровых небеременных женщин и женщин с физиологической беременностью в I триместре.

8. Сравнить цитотоксическую активность рNK-клеток здоровых небеременных женщин и женщин с физиологической беременностью в I триместре с активностью рNK-клеток женщин с привычным невынашиванием беременности.

### **Научная новизна работы**

Впервые продемонстрировано модулирующее влияние клеток трофобласта на естественные киллеры в модели их взаимодействия с использованием клеточных линий JEG-3 и NK-92. Установлено, что клетки трофобласта оказывают выраженное воздействие на NK-клетки, стимулирующее приобретение ими фенотипа, подобного dNK-клеткам. В модели *in vitro* впервые продемонстрировано, что в условиях длительного контактного взаимодействия с клетками трофобласта NK-клетки изменяют экспрессию как транскрипционных факторов, регулирующих конечные этапы их дифференцировки - Eomes T-bet, так и экспрессию транскрипционных факторов AhR, ROR $\alpha$ , характерных для других групп лимфоидных клеток врожденного иммунитета (от англ. Innate Lymphoid Cells - ILC).

С использованием разработанной модели впервые продемонстрировано, что цитокины и растворимые факторы, секретируемые клетками плаценты, модифицируют влияние клеток трофобласта на NK-клетки, стимулируя экспрессию ими рецепторов характерных для dNK-клеток и отдельных популяций ILC. Впервые дана комплексная характеристика воздействия клеток трофобласта на NK-клетки с участием цитокина TGF $\beta$ . Впервые получены комплексные данные об экспрессии клетками трофобласта и NK-клетками рецепторов адгезии, а также продемонстрирована способность естественных киллеров мигрировать через трофобластический барьер, что отражает возможность формирования пула dNK-клеток за счет миграции NK-клеток из периферической крови.

Впервые показано, что при контактном взаимодействии *in vitro* клетки трофобласта подавляют пролиферативную активность рNK-клеток. Однако, рNK-клетки, полученные от здоровых женщин в секреторной фазе менструального цикла, демонстрировали более высокую экспрессию маркера пролиферации Ki-67 в присутствии клеток трофобласта по сравнению с женщинами в пролиферативной фазе цикла, что отражает изменение устойчивости рNK-клеток небеременных женщин в разных фазах цикла к влиянию клеток трофобласта. У беременных женщин рNK-клетки обладали более выраженной способностью к пролиферации в присутствии клеток трофобласта *in vitro* по сравнению с небеременными женщинами. Впервые установлено, что при ПНБ пролиферативная активность общей популяции рNK-клеток, а также субпопуляций с фенотипом CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> и CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, была подавлена в случае взаимодействия с клетками трофобласта *in vitro*. Отмечено, что рNK-клетки женщин с ПНБ в секреторной фазе

менструального цикла характеризовались сниженной экспрессией CD56 в присутствии клеток трофобласта.

Впервые получены данные о секреторной активности НК-клеток, выражающейся не только в продукции цитокинов, но и формировании микровезикул, содержащих цитотоксические белки, и влияющих на пролиферацию и миграцию клеток трофобласта. Впервые проведена комплексная оценка цитотоксичности НК-клеток, реализуемой по отношению к клеткам трофобласта, включавшей исследование с использованием клеток линии НК-92, мононуклеарной фракции, содержащей рНК-клетки, и рНК-клеток, предварительно отсортированных из фракции мононуклеаров. Впервые установлено, что НК-клетки вызывают апоптоз клеток трофобласта только при контактном взаимодействии, что сопровождается снижением экспрессии цитотоксических белков НК-клетками и может свидетельствовать о снижении их цитотоксического потенциала.

Впервые оценен вклад цитокинового микроокружения во взаимодействие НК-клеток и клеток трофобласта. Продемонстрировано, что НК-клетки экспрессируют проапоптотические рецепторы к TRAIL, а растворимые факторы, секретируемые клетками плаценты в I триместре, стимулируют цитотоксичность НК-клеток в отношении клеток трофобласта, и повышают устойчивость самих НК-клеток к рецептор-опосредованному апоптозу. Впервые получены данные об экспрессии клетками трофобласта линии JEG-3 белка серпина В9, инактивирующего GrzB, что указывает на наличие у клеток трофобласта механизмов защиты от индукции апоптоза естественными киллерами. Продемонстрировано, что цитокины, стимулирующие цитотоксическую активность НК-клеток, вызывали снижение экспрессии серпина В9 клетками трофобласта, что подтверждает значимость цитокинового микроокружения маточно-плацентарного комплекса. Получены новые данные об изменении цитотоксической активности рНК-клеток в отношении клеток трофобласта у пациенток с ПНБ в зависимости от фазы менструального цикла.

### **Теоретическое и практическое значение**

Получены приоритетные данные, касающиеся изменений, которые претерпевают НК-клетки в процессе взаимодействия с клетками трофобласта, установленные экспериментально с использованием клеточных линий, цитокинов и факторов, секретируемых клетками плаценты. Результаты экспериментальных исследований в последующем подтверждены данными, полученными в ходе изучения фенотипических и функциональных характеристик рНК-клеток женщин с физиологическим течением беременности и с ПНБ. В результате выполненной работы выявлены и описаны не изученные ранее механизмы дистантного взаимодействия НК-клеток с клетками трофобласта с участием микровезикул, а также определена ключевая роль

цитокинового микроокружения маточно-плацентарного комплекса, способствующего проявлению функциональных характеристик НК-клеток. Полученные данные, свидетельствующие об изменении фенотипических и функциональных характеристик рНК-клеток у женщин с ПНБ в присутствии клеток трофобласта, дополняют представления о вкладе НК-клеток в патогенез этой патологии. На основании результатов работы предложена концепция об активном контроле клетками трофобласта функциональной активности естественных киллеров при беременности: продемонстрировано, что клетки трофобласта стимулируют миграцию НК-клеток в маточно-плацентарный комплекс, приобретение ими фенотипа dNK-клеток и изменение ими профиля экспрессии транскрипционных факторов и секреции цитокинов. Вместе с тем, взаимодействие НК-клеток с клетками трофобласта не приводит к полной утрате естественными киллерами цитотоксических свойств, что подтверждает ведущую роль НК-клеток как основных регуляторов инвазии клеток трофобласта, препятствующих их неконтролируемому росту.

В работе экспериментально обоснована диагностическая ценность выявленных закономерностей реализации НК-клетками цитотоксической активности при ПНБ, на основании полученных данных разработаны способ определения функционального состояния рНК-клеток и способ оценки реализации ими цитотоксической активности в отношении клеток трофобласта. Предложен способ оценки цитопротективного эффекта препаратов для коррекции невынашивания беременности и бесплодия в отношении клеток трофобласта при их взаимодействии с естественными киллерами.

Результаты работы защищены тремя патентами РФ:

1. Способ определения цитотоксической активности НК-клеток. Авторы: Соколов Д.И., Михайлова В.А., Вязьмина Л.П., Агнаева А.О., Беспалова О.Н., Сельков С.А. RU №2632109, 02 октября 2017г.;

2. Способ оценки риска невынашивания беременности у женщин с привычным невынашиванием. Авторы: Соколов Д.И., Михайлова В.А., Вязьмина Л.П., Агнаева А.О., Беспалова О.Н., Гзгзян А.М., Сельков С.А. RU №2657433, 13 июня 2018г.;

3. Способ оценки цитопротективного эффекта препаратов иммуноглобулинов для внутривенного введения в отношении клеток трофобласта в условиях их взаимодействия с естественными киллерами. Авторы: Михайлова В.А., Давыдова А.А., Баженов Д.О., Загайнова В.А., Коган И.Ю., Беспалова О.Н., Гзгзян А.М., Соколов Д.И., Сельков С.А. №2768461, 24 марта 2022 г.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Клетки трофобласта за счет экспрессируемых ими рецепторов адгезии определяют миграцию NK-клеток. Растворимые факторы, секретируемые клетками плаценты, стимулируют экспрессию молекул адгезии как клетками трофобласта, так и NK-клетками, а также стимулируют миграцию NK-клеток.
2. Длительное контактное взаимодействие с клетками трофобласта вызывает изменение экспрессии транскрипционных факторов Eomes, AhR, ROR $\alpha$ , T-bet NK-клетками, а также их поверхностных рецепторов, способствуя формированию фенотипа, подобного децидуальным NK-клеткам. Цитокины микроокружения плаценты модифицируют влияние клеток трофобласта на NK-клетки, стимулируя экспрессию ими рецепторов, характерных для других популяций лимфоцитов врожденного иммунитета.
3. Одним из ключевых цитокинов, секретируемых клетками трофобласта, является TGF $\beta$ , который активирует внутриклеточный сигнальный путь с участием белков SMAD в NK-клетках, под его влиянием NK-клетки повышают экспрессию, а также содержание мРНК гена, кодирующего основной дифференцировочный рецептор естественных киллеров CD56.
4. Пролиферативная активность NK-клеток периферической крови снижена в случае контактного взаимодействия с клетками трофобласта. Естественные киллеры периферической крови беременных женщин *in vitro* более устойчивы к ингибирующему влиянию клеток трофобласта, чем NK-клетки небеременных женщин.
5. Естественные киллеры являются источником микровезикул, которые стимулируют миграцию клеток трофобласта и вызывают активацию внутриклеточной передачи сигнала в клетках трофобласта с участием белка STAT3. Цитокин TGF $\beta$  вызывает снижение секреции NK-клетками цитокинов IFN $\gamma$ , IL-10, RANTES, что указывает на влияние клеток трофобласта на секреторную функцию естественных киллеров.
6. Естественные киллеры вызывают апоптоз клеток трофобласта в случае контактного взаимодействия. Снижение экспрессии NK-клетками рецепторов к TRAIL в присутствии растворимых факторов, секретируемых клетками плаценты, отражает уменьшение восприимчивости NK-клеток к апоптотическому сигналу. Длительное контактное культивирование NK-клеток и клеток трофобласта приводит к снижению содержания цитотоксических белков в NK-клетках и повышению их содержания в клетках трофобласта. Отсутствие изменений экспрессии серпина B9 и наличие гранзимов в клетках трофобласта указывает на цитотоксические свойства модифицированных клетками трофобласта NK-клеток.
7. У женщин с привычным невынашиванием беременности сохраняется высокая цитотоксическая активность NK-клеток периферической крови в отношении клеток трофобласта на протяжении менструального цикла. Снижение пролиферации и экспрессии



CD56 NK-клетками периферической крови при привычном невынашивании беременности в присутствии клеток трофобласта отражает их сниженный потенциал к дифференцировке в децидуальные естественные киллеры.

### **Методология и методы исследования**

Использованы современные иммунологические, молекулярно-биологические и статистические методы, отвечающие задачам экспериментальной работы. Результаты экспериментальных исследований с использованием перевиваемых культур клеток сопоставлены с оценкой характеристик клеток, полученных из первичного клинического материала.

### **Степень достоверности и апробация результатов работы**

Достоверность полученных результатов достигнута за счет разнообразия примененных методов и оцененных параметров, достаточного объема клинического материала и корректного применения методов статистической обработки данных.

Основные положения диссертации были представлены и обсуждены на Международных конференциях «Репродуктивная медицина: взгляд молодых» (Санкт-Петербург, 2016г., 2017г.), XIX, XXI, XXII, XXIV Международных медико-биологических конференциях молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина - человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2016г., 2018г., 2019г., 2021г.), на XVII, XVIII, XIX, XX Всероссийских научно-образовательных форумах «Мать и дитя» (Москва, 2016г., 2017г., 2018г., 2019г.), IV Национальном конгрессе «Дискуссионные вопросы современного акушерства» (Санкт-Петербург, 2017г.), на XVI, XVII Всероссийских научных форумах с международным участием им. акад. В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2017г., 2023г.), на LXXIX научно-практической конференции (с международным участием) «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины» (Санкт-Петербург, 2018г., 2022г.), 5-ом Европейском конгрессе по иммунологии (Амстердам, Нидерланды, 2018г.), Международном конгрессе «Оперативная гинекология - новые технологии» (Санкт-Петербург, 2018г.), XIII Международном конгрессе по репродуктивной медицине (Санкт-Петербург, 2019г.), I, II, IV Национальных конгрессах с международным участием «Лабораторные Технологии в Репродуктивной Медицине и Неонатологии (ЛАБРИН)» (Москва, 2019г., 2020г., 2022г.), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2019» (Москва, 2019г.), XII Всемирном конгрессе по молекулярной аллергологии, иммунологии и астме (Санкт-Петербург, 2019г.), на конференции «Новые концепции врожденного иммунитета» (Тюбинген, Германия, 2019г.), научно-практической конференции

ученых России и Хорватии (Москва, 2019г.), 17-ом Международном конгрессе по иммунологии (Пекин, Китай, 2019г.), Общероссийской научно-практической конференции для акушеров-гинекологов (Санкт-Петербург, 2019г.), VI Общероссийской конференции с международным участием «Перинатальная медицина: от прегравидарной подготовки к здоровому материнству и детству» (Санкт-Петербург, 2020г.), 6-ом Европейском конгрессе по иммунологии (дистанционный формат, 2021г.), на XXVII, XXVIII Всероссийских конференциях молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины» (Санкт-Петербург, 2021г., 2022г.), II, III Общероссийских научно-практических конференциях для акушеров-гинекологов «Оттовские чтения» (Санкт-Петербург, 2020г., 2021г.), Конференциях с международным участием «Здоровье женщины, плода, новорожденного» (Санкт-Петербург, 2021г., 2022г.), IX Всероссийской конференции «Иммунология репродукции» в рамках Всероссийского научно-образовательного форума «XXII Мать и дитя» (Санкт-Петербург, 2021г.), на XV Региональном Научно-образовательном форуме «Мать и дитя» (Санкт-Петербург, 2022г.).

#### **Реализация результатов исследования**

Диссертационное исследование выполнено на базе ФГБНУ «НИИ АГиР им.Д.О.Отта». Результаты диссертационной работы внедрены в научную работу отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «НИИ АГиР им.Д.О.Отта», в научную деятельность ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, использованы в курсах общей и клинической иммунологии, и иммунологии репродукции на кафедре иммунологии ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им.И.П. Павлова Минздрава России. Результаты диссертационной работы внедрены в практическую деятельность отдела гинекологии и эндокринологии, отдела репродуктологии и консультативно-диагностического отделения ФГБНУ «НИИ АГиР им.Д.О.Отта», а также Родильного дома №6 им.проф. В.Ф. Снегирева.

#### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 78 научных работ, из них 24 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ, а также входящих в международные реферативные базы данных и систем цитирования, 10 из статей опубликованы в журналах квартилей Q1-Q2, индексируемых международными базами WoS и Scopus. Материалы исследования вошли в учебные пособия «НК-клетки: фенотип и внутриклеточные факторы при беременности», «НК-клетки и клетки трофобласта: механизмы взаиморегуляции и их роль в репродуктивном процессе» и руководство для врачей «Эндометрий в репродукции: оценка функции и возможности коррекции». По результатам работы получено 3 патента.

**Личный вклад автора**

Личное участие автора заключалось в самостоятельной формулировке цели и задач диссертационного исследования, выборе методов исследования, планировании и проведении экспериментальной работы, получении и анализе экспериментальных данных, их теоретическом обобщении. Подбор пациентов для включения в исследование осуществлен врачами на базе ФГБНУ «НИИ АГиР им.Д.О.Отта». Проведение белкового анализа с помощью метода иммуноблоттинга выполнено при участии сотрудников группы биохимии ФГБНУ «НИИ АГиР им.Д.О.Отта». Проведение молекулярно-биологического анализа с помощью метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени осуществлено при участии сотрудников химико-биологического кластера ИТМО (Международный научный центр SCAMT (Solution Chemistry of Advanced Materials and Technologies / Растворной химии передовых материалов и технологий). Статьи написаны самим автором или при его активном участии.

**Объем и структура диссертации.**

Диссертация изложена на 367 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, состоящего из 778 источников, списка сокращений. Работа проиллюстрирована 12 таблицами и 111 рисунками.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Фенотипические и функциональные характеристики естественных киллеров

#### 1.1.1 Общая характеристика естественных киллеров

Пул лимфоидных клеток человека составляют Т- и В-лимфоциты, реализующие адаптивные реакции иммунной системы, а также клетки естественные киллеры (НК-клетки). После открытия НК-клеток было выдвинуто предположение, что эти клетки индуцируют гибель любой клетки, не несущей в составе своей поверхностной мембраны рецепторы главного комплекса гистосовместимости МНС-I (от англ. Major Histocompatibility Complex 1) [104]. Позднее это предположение подтвердилось, были открыты группы ингибирующих и активирующих цитотоксичность рецепторов, лигандами которых являются МНС-I и МНС-подобные молекулы [254]. НК-клетки участвуют в реализации противовирусных и противоопухолевых иммунных реакций, как за счет контакт-опосредованного цитолиза, так и опосредованно за счет различных гуморальных факторов [2, 47, 452]. В отличие от Т- и В-лимфоцитов, в которых после связывания антигена происходит реаранжировка участков генов антиген-распознающих рецепторов, активация НК-клеток не предполагает подбора аффинности их рецепторов [176]. В то же время сходство функциональной активности НК-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов дает основание предполагать, что эти популяции клеток имеют эволюционно одного общего предшественника с цитолитическими свойствами [47].

НК-клетки в норме присутствуют как в костном мозге, так и в лимфатических узлах, печени, кишечнике, коже, матке, почках, легких [47, 184, 669]. Преимущественно НК-клетки представлены в тканях в виде интраэпителиальных лимфоцитов, однако также НК-клетки могут образовывать скопления клеток, как например, в пейеровых бляшках и мезентериальных лимфатических узлах [117]. НК-клетки мигрируют в определенные ткани под влиянием физиологических и патологических факторов, также описана постоянная рециркуляция НК-клеток [365, 513]. В периферических органах иммунной системы НК-клетки могут контактировать с дендритными клетками и Т-лимфоцитами, что определяет возможность их взаимного влияния, а также участия НК-клеток в регуляции адаптивного иммунного ответа [46, 769]. В зависимости от экспрессируемых рецепторов НК-клетки подразделяют на популяции.

### 1.1.2 Фенотип НК-клеток

Традиционным считается определение НК-клеток по отсутствию на плазматической мембране рецептора CD3 и наличию белка CD56, являющегося нейрональной адгезионной молекулой NCAM [751]. В периферической крови преимущественно локализуются НК-клетки с низкой экспрессией CD56 ( $CD56^{dim/low}$ ), также несущие на своей поверхности рецептор CD16 (до 90% популяции рНК-клеток) [47, 462]. До 10% рНК-клеток составляют так называемые регуляторные НК-клетки, с высокой экспрессией CD56 ( $CD56^{bright}$ ) и низкой ( $CD16^{dim}$ ) или отсутствием экспрессии CD16 ( $CD16^{neg}$ ) [170, 411, 462]. В других тканях, например, в печени, лимфатических узлах, эндометрии и децидуальной оболочке,  $CD56^{bright}$  НК-клетки представлены в большем количестве, чем в периферической крови [117]. Однако в некоторых работах описаны минорные популяции моноцитов, экспрессирующих рецептор CD56. Так в исследовании, посвященном рассмотрению клинического случая пациента с миелодиспластическим синдромом, показано, что в костном мозге количество моноцитов, экспрессирующих CD56 составляло более 30%, однако в периферической крови составило менее 2% [104]. У пациентов с болезнью Крона в стадии обострения в периферической крови также выявлены моноциты с фенотипом  $CD14+CD56+$ , их количество составляло около 6%. В контрольной группе здоровых добровольцев количество  $CD14+CD56+$  моноцитов составило около 2% [462]. Показано, что в пуповинной крови присутствуют НК-клетки, не экспрессирующие рецептор CD56 [298]. В связи с этим НК-клетки рекомендуют оценивать, как популяцию, не экспрессирующую рецептор CD14, характерный для моноцитов, а также не экспрессирующих рецепторов, специфичных для Т-лимфоцитов (CD3) и В-лимфоцитов (CD19) [684]. Описание фенотипа НК-клеток может быть дополнено функциональными рецепторами.

### 1.1.3 Функциональные группы рецепторов НК-клеток

#### 1.1.3.1 Адгезионные рецепторы НК-клеток

Молекулы клеточной адгезии (от англ. Cell Adhesion Molecules (CAM)) присутствуют на мембране НК-клеток и обеспечивают образование контакта НК-клетки с другими клетками, в том числе клетками-мишенями, и внеклеточным матриксом [494, 667]. В таблице 1.1 представлены адгезионные рецепторы, экспрессируемые НК-клетками, их обозначение в соответствии с номенклатурой кластеров дифференцировки (CD) и их лиганды.

Таблица 1.1 - Экспрессия адгезионных рецепторов НК-клетками

Рецептор	Кластер дифференцировки	Лиганды
1	2	3
Интегрин $\alpha X\beta 2$ [26, 462]	CD11c/CD18	C3bi, фибриноген, ICAM-1 [462]
LFA-1 [462, 667]	CD11a/CD18	ICAM-1 [118, 462, 667], ICAM-2, ICAM-3 [118, 462]
LFA-2 [462]	CD2	CD58 [462], CD48 [462]
LFA-3 [26, 462]	CD58	CD2 [462]
NCAM [462]	CD56	FGFR1 [462]
Mac-1 ( $\alpha M\beta 2$ ) [26, 462]	CD11b/CD18	C3bi, фибриноген, ICAM-4 [462] ICAM-1 [118], ICAM-2, ICAM-3 [674]
L-селектин [26, 462]	CD62L	GLyCAM-1 MadCAM-1 [462] CSPG2 [737]
VLA-4 [26, 238]	CD49d/CD29	Фибронектин, VCAM-1 [152, 539]
PECAM-1 [26, 633]	CD31	PECAM-1

### 1.1.3.2 Цитокиновые рецепторы НК-клеток

В отдельную группу цитокиновых рецепторов выделяют рецепторы к хемокинам, обеспечивающие направленную миграцию НК-клеток в различные органы и ткани. Например, циркулирующие НК-клетки с фенотипом CD56<sup>bright</sup> экспрессируют рецептор CCR7, связывающий хемокины лимфоидной ткани CCL19 и CCL21 [85]. За счет взаимодействия CCR7-CCL19 и CCR7-CCL21 CD56<sup>bright</sup> CD16- НК-клетки могут мигрировать в лимфатические узлы [416]. Связывая хемокины CXCL10 и CXCL12 рецепторами CXCR3 и CXCR4, соответственно, НК-клетки могут мигрировать в децидуальную оболочку матки при беременности [268]. Экспрессия хемокиновых рецепторов CCR1, CCR5, CCR6, CCR7, и CXCR6 характерна преимущественно для CD56<sup>bright</sup> НК-клеток [85]. Установлено, что на НК-клетках печени и лимфоидной ткани экспрессированы рецепторы CXCR6 и CCR5 [98]. Количество CD56<sup>dim</sup> НК-клеток повышается в печени при гепатоклеточной карциноме, причем эти клетки экспрессируют рецептор CX3CR1 [747]. Описано накопление CD56<sup>bright</sup>CD16- НК-клеток в коже при псориазе, которое опосредуют хемокины CXCL10 и CCL5, секретируемые кератиноцитами при воспалении [497]. Помимо функции привлечения НК-клеток в ткани связывание хемокиновых рецепторов может приводить к изменению в их функциональном статусе. Так, показано, что связывание CXCL12 вызывает экспрессию НК-клетками

матриксной металлопротеиназы 1 (MMP1), деградирующей внеклеточный матрикс. Это, в свою очередь, может облегчать инвазию NK-клеток в ткани [246].

В литературе описано влияние цитокинов в отношении NK-клеток, в том числе их функциональной активности [336]. Выделяют группу цитокиновых рецепторов, которые объединяет наличие общей  $\gamma$ -субъединицы (IL-2, IL-7, IL-15, а также IL-9 и IL-21) [336]. Цитокины IL-2 и IL-15 являются одними из основных регуляторов функции NK-клеток. Рецептор к IL-2 состоит из трех субъединиц:  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma_c$ . Субъединицы  $\beta$  и  $\gamma_c$  экспрессированы на NK-клетках конститутивно и формируют рецептор, обладающий «промежуточной» аффинностью к IL-2. Присутствие субъединицы  $\alpha$  на плазматической мембране показано только для популяции CD56<sup>bright</sup> NK-клеток [111], однако под влиянием цитокинов IL-2 и IL-15, а также комбинации IL-15 с цитокинами IL-12 и IL-18 ее экспрессия может быть индуцирована NK-клетками популяций CD56<sup>bright</sup> и CD56<sup>dim</sup> [483]. Для NK-клеток с фенотипом CD56<sup>dim</sup> характерна экспрессия IL-2R $\beta/\gamma_c$  [462].

Рецептор к IL-15 составляют три субъединицы, две из них являются общими с рецептором IL-2 ( $\beta$  и  $\gamma_c$ ). Экспрессия третьей субъединицы IL-15R $\alpha$  характерна для антиген-презентирующих клеток (АПК), за счет нее эти клетки связывают IL-15 и презентуют его клеткам, экспрессирующим IL-15R $\beta/\gamma_c$  [191]. Транспрезентация IL-15 в составе IL-15R $\alpha$  не сопряжена с презентацией антигена АПК [318]. Установлена экспрессия IL-15R $\alpha$  гепатоцитами и макрофагами. У мышей с отсутствием экспрессии IL-15R $\alpha$  на макрофагах и гепатоцитах количество NK-клеток печени снижено [124], что указывает на необходимость транспрезентации IL-15 для поддержания популяции NK-клеток. Однако, также возможна «цис-презентация» IL-15 NK-клеткой самой себе, а также прямой эффект IL-15 на NK-клетки, в отсутствие транспрезентации с участием IL-15R $\alpha$  [444]. Так, показано, что после введения рекомбинантного IL-15 количество NK-клеток в периферической крови повышалось, также возрастала их пролиферативная активность [149].

Рецептор к IL-21 состоит из субъединиц  $\alpha$  и  $\gamma_c$ , для NK-клеток показана его низкая экспрессия [718]. В мембран-связанной форме на поверхности клеток-мишеней IL-21 стимулирует пролиферацию NK-клеток [15, 17]. Также IL-21 вызывает повышение синтеза GrzB NK-клетками и продукцию ими IFN $\gamma$ , что в свою очередь повышает противоопухолевую активность NK-клеток [379]. Описано повышение пролиферации NK-клеток в результате воздействия на них IL-21, однако в высоких концентрациях IL-21 вызывал апоптоз NK-клеток [379].

NK-клетки экспрессируют рецептор к IL-18 (IL-18R) [723], провоспалительному цитокину семейства IL-1 [180]. Показано, что IL-18 вызывает повышение экспрессии NK-клетками  $\alpha$ -субъединицы IL-2R [484], а также снижает экспрессию рецептора CD16 [484]. В

комбинации с IL-2 IL-18 усиливает пролиферацию NK-клеток [198], а также вызывает повышение экспрессии белков Bcl-XL и Bcl-2, ингибирующих апоптоз [198]. В случае применения IL-18 в комбинации с IL-2 и IL-15 значительно возростала цитотоксическая активность NK-клеток [391].

Описана экспрессия NK-клетками рецепторов к IL-8 (CXCR2) [276] и к IL-6 [101], продемонстрировано, что эти цитокины влияют на NK-клетки. Так, повышенная секреция IL-8 и IL-6 при плоскоклеточной карциноме пищевода вызывала активацию STAT3-зависимого пути внутриклеточной передачи сигнала в естественных киллерах, инфильтрирующих опухоль. В результате экспрессия NK-клетками активирующих рецепторов NKp30 и NKG2D была снижена, что отрицательно сказывается на противоопухолевом иммунном ответе [720].

Клетки линии NK-92, а также NK-клетки, полученные из CD34+ клеток пуповинной крови экспрессируют рецептор к IL-10 [505]. Цитокины IL-6 и IL-10 стимулируют секрецию NK-клетками факторов VEGF и FGF [336]. Описано ингибирование синтеза NK-клетками TNF $\alpha$  и IL-6 под влиянием IL-10 [536]. Однако рNK-клетки в присутствии IL-10 повышали цитотоксическую активность [578]. За счет секреции IL-10 NK-клетки могут подавлять пролиферацию и продукцию IFN $\gamma$  Т-лимфоцитами [462]. Кроме того IL-10, воздействуя на АПК, подавляет синтез этими клетками цитокинов IL-12, IL-15, IL-18, в результате происходит снижение синтеза и секреции IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  NK-клетками [336]. Несмотря на то, что NK-клетки способны к синтезу IFN $\gamma$ , лишь для отдельных популяций NK-клеток выявлена экспрессия рецепторов для IFN $\gamma$  (IFNGR2) [544].

Цитокин TGF $\beta$  представляет собой белок, синтез которого возможен в трех формах - TGF $\beta$  1-3, и который секретируют многие типы клеток [44]. Отметим, что TGF $\beta$  синтезируется в неактивной форме: после секреции TGF $\beta$  образует ковалентно связанный комплекс со «связывающим» белком, не способный взаимодействовать со своим рецептором, локализующийся преимущественно в экстрацеллюлярном матриксе [44]. Белки MMP2 и MMP9 участвуют в высвобождении активных форм TGF $\beta$  [44]. Показано, что связывание TGF $\beta$  с его рецептором на NK-клетках приводит к подавлению секреции IFN $\gamma$  [305]. TGF $\beta$  также приводит к снижению интенсивности секреции NK-клетками IFN $\gamma$ , а также блокирует сигналы от рецепторов NKG2D и CD244 NK-клеток и способствует снижению экспрессии NKp30, что в итоге приводит к уменьшению цитотоксической активности NK-клеток [636]. В таблице 1.2 представлены данные об экспрессии цитокиновых и хемокиновых рецепторов NK-клетками, их обозначение в соответствии с номенклатурой кластеров дифференцировки и связываемых цитокинах.



Таблица 1.2 - Экспрессия НК-клетками рецепторов цитокинов

Рецептор	Кластер дифференцировки	Лиганды
1	2	3
CCR1 [638]		CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL9/CCL10 (MIP-1 $\gamma$ ), CCL14 (HCC-1), CCL15 (HCC-2), CCL16 (HCC-4), CCL23 (MPIF-1), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) [87]
CCR2 [742]		CCL2 (MCP-1), CCL7 (MCP-3), CCL12, CC13 (MCP-4), CCL16 [87]
CCR4 [462]	CD194	RANTES, CCL17, CCL22, CCL2, CCL4 (MIP-1b) [462]
CCR5 [742]	CD195	RANTES, CCL8 (MCP-2), CCL14 (HCC-1), CCL4, CCL20 [87] CCL5 [497], CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ )
CCR6 [761]	CD196	CCL20 (MIP-3 $\alpha$ ) [85]
CCR7 [462, 742]	CD197	CCL19 (MIP-3 $\beta$ ), CCL21 (SLC) [87, 462]
CCR9 [85]		CCL25 (TECK) [85]
CXCR1 [462]	CD128	CXCL8 (IL-8) [462]
CXCR3 [462, 742]	CD183	CXCL9, CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC) [87, 462]
CXCR4 [462]	CD184	CXCL2 [462], CXCL12 (SDF-1) [85, 87]
CXCR6 [85]	CD186	CXCL16 [87]
CX <sub>3</sub> CR1 [85, 742]		CX3CL1 (Фракталкин) [462]
ChemR23 [462]		Хемерин [462]
IFNGR2 [322, 544]		IFN $\gamma$ [544]
IL-2Ra [462]	CD25	IL-2 [462]
IL-2Rb/IL-2Rc [462]	CD122/CD132	IL-2 и IL-15 [462]
IL-6R $\alpha$ [101]	CD126	IL-6 [336]
IL-7R $\alpha$ [462]	CD127	IL-7 [462]
IL-10R [505]	CD210	IL-10 [336]
IL-12R $\beta$ 1 [460]	CD212	IL-12 [336]
IL-15Ra [228]	CD215	IL-15 [336]
IL-18R [462]	CD218a	IL-18 [462]
IL-21Ra [507]	CD360	IL-21 [336]
TGFbR [775]		TGF $\beta$ [546]
TNFR1 [60, 688]	CD120a	TNF $\alpha$ [60]
TNFR2 [60, 297]	CD120b	TNF $\alpha$ [60]

Таким образом, NK-клетки экспрессируют рецепторы к широкому спектру цитокинов, что определяет возможность миграции NK-клеток в ткани и участия в регуляции иммунных взаимодействий, в том числе в рамках реализации воспаления. Функциональная активность NK-клеток зависит от экспрессируемых ими рецепторов.

### ***1.1.3.3 Рецепторы, регулирующие цитотоксическую активность NK-клеток***

Основной функцией NK-клеток является распознавание клеток-мишеней и их цитолиз, который может быть реализован несколькими путями. Одним из вариантов является образование иммунологического синапса с клеткой-мишенью, в котором задействованы рецепторы адгезии, активационные и ингибирующие рецепторы NK-клеток [47, 88]. Исход контактного взаимодействия NK-клетки и потенциальной клетки-мишени зависит от смещения баланса активирующих и ингибирующих сигналов от рецепторов NK-клетки [452].

К рецепторам, связывающим молекулы локуса главного комплекса гистосовместимости МНС-I, относят киллерные иммуноглобулиноподобные рецепторы (от англ. Killer Immunoglobulin Receptor (KIR) (CD158)), рецептор LIR/ILT2 (CD85j) и C-лектиновые гетеродимерные рецепторы CD94/NKG2A/B/C [452, 462, 605, 751]. Группа генов, кодирующих МНС, обладает большим полиморфизмом, что определяет функциональную способность продуктов этих генов связывать пептиды [38]. Прослеживаются ассоциации определенных аллелей HLA с развитием ряда заболеваний или состоятельностью иммунной реакции [14, 172].

Рецепторы KIR классифицируют по количеству иммуноглобулиноподобных доменов и длине цитоплазматического хвоста [183, 261]. Выделяют активирующие и ингибирующие KIR NK-клеток. В длинном (L) цитоплазматическом хвосте содержится иммунорегуляторный ингибиторный мотив на основе тирозина (от англ. tyrosine-based inhibition motif (ITIM)). Короткие (S) цитоплазматические домены не содержат этот мотив [183, 261, 512]. Также во внутриклеточной передаче сигнала от активирующих рецепторов NK-клеток участвуют последовательности рецепторов, содержащие Туг, такие как ITAM, ITSM, а также мотивы ITSM, ITT-like, ITIM-like [394, 452]. Из-за однонуклеотидных замен, вставок и делеций могут возникать KIR с разной длиной цитоплазматического домена. К результатам таких замен относят появление заряженных остатков аргинина в трансмембранных участках KIR2DL4, и инактивацию ITIM из-за замены цистеина на тирозин, что частично объясняет активационный сигнал (например, стимуляцию продукции  $IFN\gamma$ ) от KIR2DL4 не смотря на длинный цитоплазматический хвост этого рецептора [559]. Группа рецепторов семейства KIR связывает как классические молекулы локуса МНС-I (HLA-A, HLA-B, HLA-C), так и неклассические [183]. Так, рецепторы KIR2DL1 и KIR2DL2/3 распознают определенные аллотипы HLA-C,

обладающие полиморфизмом в позиции 77 и 80 в  $\alpha 1$ -домене тяжелой цепи HLA. Рецептор KIR2DL1 связывает HLA-C2 (HLA-Cw2, HLA-Cw4, HLA-Cw5, HLA-Cw6), в то время как KIR2DL2 и KIR2DL3 - группу HLA-C1 (HLA-Cw1, HLA-Cw3, HLA-Cw7, HLA-Cw 8) [112]. Аллели рецепторов KIR наследуются группами, в связи с чем часто употребляют термин - гаплотипы KIR.

Показано, что NK-клетки экспрессируют рецепторы группы LIRB, а именно LIRB1, LIRB2 [207, 311] и LILRB5 [207]. Связываясь с классическими молекулами локуса MHC-I, рецепторы LIRB1 и LIRB2 ингибируют цитотоксическую активность NK-клеток [462]. Описано взаимодействие HLA-G с рецептором LIRB1 [311, 479]. Однако, *in vitro* NK-клетки, лишённые рецепторов KIR, с высокой экспрессией LIRB1 демонстрировали повышение цитотоксической активности [372]. В случае совместной экспрессии LIRB1, и ингибиторных рецепторов KIR и NKG2A, активации LIRB1 было недостаточно для повышения цитотоксичности NK-клеток [372]. Функциональная регуляция NK-клеток через рецептор LILRB5 однозначно не установлена, предположительно сходна с таковой для рецепторов LIRB1 и LIRB2 [311].

К группе C-лектиновых рецепторов NK-клеток относятся рецепторы NKG2, которые также могут передавать как ингибирующий (NKG2A), так и активационный (NKG2C, NKG2D, NKG2E) сигнал [25, 301, 512, 531]. Рецепторы NKG2A и NKG2C обладают высокой гомологией внеклеточных доменов, отличаясь только шестью аминокислотными остатками [531]. Основным лигандом NKG2A являются молекулы локуса HLA-E [183]. Кроме того, связывание NKG2A с HLA-E ингибирует IL-15-индуцированную пролиферацию NK-клеток [66]. Тканерезидентные NK-клетки, в частности NK-клетки печени, экспрессируют NKG2A в большей степени, чем рNK-клетки [451]. Следует отметить, что в отсутствие рецепторов KIR NKG2A<sup>+</sup> NK-клетки демонстрируют повышенную способность к миграции по сравнению с NKG2A<sup>-</sup> NK-клетками, а также повышенную цитотоксическую активность в отношении клеточных мишеней [217]. Вероятно, отмеченный эффект повышения цитотоксичности [217] связан со стабилизирующей иммунологической синапс функцией рецептора NKG2A, нежели чем напрямую с индукцией активационного сигнала.

Рецептор NKG2D связывает белки MICA и MICB (MHC class I-related chain molecules), а также белки ULBP 1–6 (UL16-связывающие белки, другое название - белки RAET1) [3, 353, 452]. Белки MICA и MICB гомологичны белкам MHC-I, но не содержат  $\beta 2$ -микроглобулин [213]. Как и MHC-I, белки MIC полиморфны: выявлено 100 аллельных вариантов MICA и 40 вариантов MICB [353]. MICA и MICB проявляются на плазматической мембране клетки под действием стресса, а также экспрессированы на клетках многих видов опухолей [213]. Связывание NKG2D вызывает формирование активационного иммунологического синапса [436]. Клетки трофобласта [277] способны «сбрасывать» внеклеточные домены белков MICA/B, образуя

растворимые варианты мембран-связанных белков. Механизм сбрасывания лигандов может быть опосредован активностью MMP и ADAM-протеаз (ADAM10, ADAM17) [213]. Затем растворимые белки MICA/B могут связываться с рецептором NKG2D, позволяя клеткам избегать цитотоксичности NK-клеток [30]. Возможно образование везикул с лигандами NKG2D. Описано, что в таком виде лиганды NKG2D сильнее подавляют активацию NK-клеток, по сравнению с их срезанными протеазами фрагментами [458].

Другой группой рецепторов NK-клеток, являются рецепторы естественной цитотоксичности (от англ. Natural Cytotoxicity Receptors (NCR)) NKp30, NKp44, NKp46. Эти белки относят к суперсемейству иммуноглобулинов [644]. Функции рецепторов этой группы неоднозначны. Так, для NKp30 выделяют шесть вариантов белка, возникающих в результате альтернативного сплайсинга, и отличающихся внутриклеточным доменом [344]. Связывание NKp30a и NKp30b стимулирует секрецию IFN $\gamma$ , эти варианты NKp30 расцениваются как активационные, в то время как NKp30c вызывал синтез IL-10 и считается ингибиторным [344]. Отметим, что для pNK-клеток характерны NKp30a и NKp30b, в то время как для dNK-клеток - NKp30c [597].

Рецептор NKp44 экспрессирован NK-клетками при активации. Для этого рецептора также установлены изоформы. Показано, что в периферической крови NK-клетки содержат преимущественно транскрипты NKp44b [597]. Для dNK-клеток характерно присутствие всех трех изоформ NKp44 [597]. Изоформы рецепторов NCR по-разному могут образовывать иммунный синапс. Так, связывание NKp30, а также NKp44 NK-клетками стимулировало поляризацию перфорины в pNK-клетках, в большей степени, чем у dNK-клеток [597]. Все четыре изоформы NKp44 ассоциированы с внутриклеточным белком DAP12, содержащим ITAM-последовательность. По другим данным изоформа NKp44a (по другой номенклатуре NKp44-1) содержит также ITIM-мотив и может реализовывать ингибиторный сигнал [508]. Предполагают, что NKp30 и NKp44 могут связываться с шаперонами [216].

Рецептор NKp46 экспрессирован на NK-клетках независимо от активационного статуса. Активационный сигнал от этого рецептора передается в NK-клетку с участием белков комплекса CD3, состоящего из трех димеров CD3 $\epsilon\gamma$ , CD3 $\epsilon\delta$  и CD3 $\zeta\zeta$  [432]. Несмотря на то, что комплекс CD3 ассоциирован с T-клеточным рецептором (TCR), экспрессия отдельных белков этого комплекса, в частности CD3 $\zeta$ , показана для NK-клеток [634]. Внутриклеточный домен рецептора NKp46 не содержит сигнальный мотив, однако активация клетки может быть инициирована ITAM-мотивами рецепторов FcR $\gamma$  и CD3 $\zeta$ , за счет перекрестного взаимодействия с рецептором NKp46 в трансмембранном участке [344, 590]. Так же, как и для NKp30 и NKp44, для NKp46 описаны несколько изоформ - a, b, c, d, e, из которых транскрибируются активационные формы a и b [590].

Одним из рецепторов НК-клеток, определяющих их цитотоксическую функцию, является CD16, который представляет собой низкоаффинный рецептор IgG (FcγRIII). За счет связывания с Fc-фрагментом IgG НК-клетки становятся «армированными» и способны атаковать клетки, покрытые антителами. За счет FcR-IgG взаимодействия происходит лизис клеток-мишеней посредством механизма антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) [452]. Для НК-клеток характерна экспрессия двух изоформ CD16 – CD16a и CD16b, гены которых обладают высокой степенью гомологии (более 95%) [689], причем рецептор CD16b, являющийся продуктом гена *FCGR3B*, не вызывает АЗКЦ [218]. Интенсивность экспрессии CD16a регулируется на эпигенетическом уровне: для промотерной области *FCGR3A* установлена большая степень метилирования динуклеотидов CpG ДНК, нежели чем для *FCGR3B* [689]. В результате активации НК-клетки секретируют цитокины, например, IFNγ, что также способствует лизису клеток-мишеней [676]. Показано, что связывание иммуноглобулинов с CD16 усиливает экспрессию костимуляционного рецептора Tim-3 (T-cell immunoglobulin and mucin-containing domain) на НК-клетках [606]. Экспрессию Tim-3 НК-клетками связывают с истощением их функциональной активности [235]. Предполагают, что присутствие Tim-3 на НК-клетках является результатом реализации ими функциональной активности в том числе, CD16-зависимой [606]. В таблице 1.3 представлены данные о рецепторах, регулирующих цитотоксичность НК-клеток, связываемых ими лигандах и характере индуцируемого ими сигнала в НК-клетках.

Таблица 1.3 - Рецепторы НК-клеток, регулирующие их цитотоксическую активность

Рецептор	Кластер дифференцировки	Лиганды	Влияние на НК-клетку
1	2	3	5
FcγRIII [462]	CD16	IgG [462]	Активация [462]
KIR2DL1 [112, 462]	CD158a	Некоторые аллели HLA-C2 [489]	Ингибирование [462]
KIR2DL2 [462]	CD158b	Некоторые аллели HLA-C1 и HLA-C2, HLA-B [489]	Ингибирование [462]
KIR2DL3 [462]	CD158b2	Некоторые аллели HLA-C1, HLA-C2 HLA-B [112, 489]	Ингибирование
KIR2DL4 [462]	CD158d	HLA-G [489]	Активация [112]/ Ингибирование [462]
KIR2DL 5A/B [462]	CD158f	? [489]	Ингибирование [462]

Продолжение таблицы 1.3				
1	2	3	5	
KIR2DS1 [462]	CD158h	Некоторые аллели HLA-C2 [489]	Активация [462]	
KIR2DS2 [462]	CD158j	HLA-A*1101, Некоторые аллели HLA-C [489]	Активация [462]	
KIR2DS3 [462]	CD158j	HLA-C [112]	Активация [462]	
KIR2DS4 [462]	CD158i	HLA-A *1102, Некоторые аллели HLA-C [489]	Активация [462]	
KIR2DS5 [462]	CD158f	? [489]	Активация [462]	
KIR3DL1 [462]	CD158e1	Некоторые аллели HLA-A и HLA-B [489], HLA-Bw4, некоторые аллотипы HLA-A [112]	Ингибирование [112, 462]	
KIR3DL2 [462]	CD158k	Некоторые аллели HLA-A, HLA-B27, HLA-F [489] CpG-ODN [462]	Ингибирование [462]	
KIR3DL3 [20]	CD158z	? [489]	Ингибирование [20]	
KIR3DS1 [462]	CD158e2	HLA-B*5701, HLA-F [489] HLA-Bw4 [112]	Активация [462]	
KLRG1		Кадгерин [20]	Активация [20]	
LILRB1/ILT2 [311]	CD85J	HLA-A, HLA-B, HLA-C, UL-18 (CMV) [173, 462], HLA-G [311]	Ингибирование [173, 462]	
LILRB2/ILT4 [311]	CD85D	HLA-A, HLA-B, HLA-C [489]	Ингибирование [311]	
LILRB5 [311]	CD85C	HLA-B7, HLA-B27 [311]	Ингибирование	
NKG2A [462]	CD159a/ CD94	HLA-E [462]	Ингибирование [462]	
NKG2C [462]	CD159c/ CD94	HLA-E [462]	Активация [462]	
NKG2D [462]	CD314	MIC-A, MIC-B, ULBPs [462]	Активация [462]	
NKp44 (NCR2) [462]	CD336	Вирусные белки [462], опухолевые антигены [79]	Активация [462]	
NKp46 (NCR1) [462]	CD335	Вирусные белки [462], опухолевые антигены [79]	Активация [462]	
NKp30 (NCR3) [462]	CD337	Вирусные белки [462], опухолевые антигены [79]	Активация [462], изоформы NKp30a/b - активация, NKp30c - ингибирование	
TIM-3 [637]		Seam-1 [567] Galectin-9 [637]	Ингибирование [567, 637]	

Таким образом, экспрессируемые НК-клетками рецепторы опосредуют реализацию ими цитотоксичности. В то же время описана экспрессия НК-клетками разнообразных рецепторов, содержащих мотивы, ингибирующие цитотоксичность. Разнообразие рецепторного аппарата НК-клеток позволяет осуществлять тонкую регуляцию функции НК-клеток. Для реализации своей функции НК-клетки вступают в контактные взаимодействия с потенциальной клеткой-мишенью.

#### **1.1.4 Механизмы реализации цитотоксической функции НК-клетками**

##### ***1.1.4.1 Формирование НК-клеткой иммунологического синапса и высвобождение содержимого литических гранул***

В результате контакта с клеткой-мишенью НК-клетка образует активирующий иммунологический синапс (ИС), через который реализуется направленная секреция литических гранул, не затрагивающая и не повреждающая соседние клетки [77]. В случае контакта со здоровой клеткой формируется ингибирующий синапс, не вызывающий активации НК-клетки [193]. В состав ИС входят рецепторы НК-клеток, компоненты цитоскелета, сигнальные молекулы и клеточные органеллы [494]. Скопление этих белков в пределах синапса обозначается термином «надмолекулярный кластер активации» (от англ. Supramolecular Activation Cluster (SMAC)), выделяют центральную зону (cSMAC), образованную перфорином и активирующими рецепторами, и периферическую (pSMAC) зону, образованную адгезионными рецепторами (CD2, CD11a, CD11b), F-актином и частью активирующих рецепторов [193, 494].

Взаимодействие НК-клетки с потенциальной клеткой-мишенью подразделяется на три стадии. Первая состоит в распознавании потенциальной клетки-мишени, и включает образование адгезионного контакта и оценку экспрессии рецепторов на поверхности клетки-мишени. Вторая стадия является эффекторной, при которой инициируется плотная адгезия к клетке-мишени, реорганизация цитоскелета НК-клетки, в том числе полимеризация актина, формирование микротрубочек, образование кластеров функциональных рецепторов, что в итоге способствует амплификации активационных сигналов НК-клетки. Кроме того, на этой стадии инициируется транспорт литических гранул к мембране и высвобождение их содержимого в область контакта с клеткой-мишенью [415]. Перфорин, содержащийся в литических гранулах, образует поры в мембране клетки-мишени. При  $\text{pH} < 5$  перфорин находится в инактивированном состоянии. В зоне иммунологического синапса в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  при  $\text{pH} = 7$  субъединицы перфорины собираются в мембран-атакующий комплекс [694] и в мембране

клетки-мишени формируются поры [495, 560]. Белки Grz, относящиеся к семейству сериновых протеаз, также выходят из литических гранул, проникают в клетку-мишень через перфориновые поры, индуцируя активацию каспаз и запуск апоптоза [345]. Завершающим этапом взаимодействия становится диссоциация НК-клетки от клетки-мишени, после чего происходит либо истощение запаса литических гранул, либо возобновление их синтеза НК-клеткой [415]. Показано, что одновременно НК-клетка может образовывать контакт с двумя потенциальными клетками-мишенями. Есть данные о том, что НК-клетка может эффективно вызывать гибель до 6 мишеней последовательно, реализуя так называемую серийную цитотоксичность до полного истощения литических гранул [93, 415, 480].

В отсутствие перфорины содержание GrzB в клетках-мишенях снижено, что указывает на важную роль образования пор для попадания Grz в клетку [529]. В настоящее время у человека выделяют Grz A, B, H, K, M, в составе литических гранул выявлены Grz A, B, в то время как Grz H, K, M недостаточно изучены [361, 619]. Пути индукции апоптоза Grz различаются. GrzA вызывает апоптоз, не зависящий от активации каспаз, а именно изменяет потенциал внутренних мембран митохондрий, что стимулирует выход активных радикалов кислорода [619]. Белок GrzB вызывает каспазозависимый апоптоз, образуя активные формы каспаз 3 и 7 из соответствующих прокаспаз [619]. Еще одним белком, попадающим в клетки-мишени через перфориновые поры, является гранулизин. Он активирует пермеабиллизацию как плазматической мембраны, так и мембраны эндоплазматического ретикулума, что в свою очередь стимулирует образование активных радикалов кислорода и изменяет мембранный потенциал митохондрий [68].

Высвобождение содержимого литических гранул может протекать за счет полного слияния с плазматической мембраной и экзоцитоза содержимого, либо за счет частичного слияния, и сохранения части литических гранул в НК-клетках [415]. Гликопротеин LAMP-1 (CD107a), ассоциированный с мембранами литических гранул, появляется на плазматической мембране НК-клетки после дегрануляции и является маркером НК-клеток, реализующих цитотоксичность [1, 462].

В настоящее время существуют разные точки зрения на вопрос о способе доставки Grz в цитоплазму клетки-мишени. Согласно классической теории, цитолиз клетки осуществляется при помощи перфорины, который, образуя пору в цитоплазматической мембране, способствует проникновению Grz в цитоплазму [404, 694]. Согласно другой теории эндосомы, содержащие перфорин и Grz, эндцитируются клеткой, затем перфорин образует пору в мембране эндосомы, через которую Grz проникают в цитоплазму и запускают апоптоз [280, 560]. Кроме того, описана способность НК-клеток образовывать экстраклеточные везикулы, содержащие поверхностные маркеры естественных киллеров, а также GrzB A, B, гранулизин, перфорин, FasL [147, 719].



Помимо попадания литических белков в клетку-мишень через перфориновые поры возможен транспорт этих белков за счет слияния везикул с мембраной клетки-мишени без образования ИС [415].

В случае связывания молекул локуса МНС-I рецепторами НК-клетки формируется ингибирующий синапс и происходит блокирование поляризации литических гранул [346]. При формировании ингибирующего ИС рецепторы KIR концентрируются в центре синапса вместе с молекулами SHP-1, затем рецепторный комплекс окружают адгезионные рецепторы LFA-1. В то же время ингибирующий ИС обеднен LFA-1 по сравнению с активирующим [575].

Таким образом, контакт НК-клетки и клетки-мишени представляет собой сложно организованный комплекс рецепторов, включающий адгезионные и цитотоксические рецепторы, а также ассоциированные с ними белки цитоскелета. В результате образования активационного синапса происходит выброс цитолитических белков, которые в свою очередь вызывают активацию каспаз, нарушение мембран митохондрий и блокирование репликации вирусов. Помимо контактного взаимодействия с клеткой-мишенью, вызывающего ее апоптоз, НК-клетки могут вызывать гибель мишеней за счет связывания отдельных рецепторов.

#### ***1.1.4.2 Рецептор-опосредованные механизмы индукции НК-клетками цитотоксичности***

Другим механизмом индукции гибели клеток-мишеней является активация так называемых «рецепторов смерти». К ним относят Fas, TRAIL-рецепторы, которые, связываясь с лигандами - трансмембранными белками FasL и TRAIL, индуцируют гибель мишеней [462, 627].

Мембран-связанный рецептор Fas могут экспрессировать практически все клетки, FasL преимущественно представлен на НК-клетках и Т-лимфоцитах [619]. Под влиянием IL-1 $\beta$  НК-клетки сами экспрессируют рецептор Fas и могут подвергаться апоптозу после связывания его лиганда FasL [664]. Для индукции апоптоза клеток, несущих лиганды этих рецепторов, необходима тримеризация FasL. Затем тримерный комплекс связывает Fas-рецептор, после чего происходит формирование комплекса между Fas-ассоциированным доменом смерти (от англ. Fas-Associated Death Domain (FADD)) и прокаспазой-8, также обозначаемой как FLICE (от англ. FADD-like interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme). Этот сигнальный комплекс носит название DISC и вызывает активацию каспаз 8 и 10, что в последствии приводит к активации эффекторных каспаз 3, 6 и 7, вызывающих клеточную гибель [530, 619]. Каспаза 8 может внедряться во внешнюю мембрану митохондрий и «срезать» проапоптотический белок семейства Bcl-2 - BID с мембраны, формируя tBID (от англ. Truncated BID). Затем tBID формирует комплекс с другими белками семейства Bcl-2 - BAK и Bcl-X<sub>L</sub>, что вызывает пермеабиллизацию мембраны митохондрий [577]. Затем из митохондрий высвобождается цитохром c, активирующий

эффекторные каспазы, и способствующий апоптотической гибели клеток [577]. Этот механизм активации внутреннего пути апоптоза вызывает усиление апоптотического сигнала [577]. С сигнальным комплексом DISC может также связываться гомолог каспазы 8 - c-FLIP (от англ. cellular FLICE-inhibitory protein). У c-FLIP отсутствует прокаспазная активность. Связывание DISC и c-FLIP, а в особенности длинной формы c-FLIP - c-FLIP<sub>L</sub>, [438] ингибирует апоптоз [619].

Член семейства TNF - TRAIL, является трансмембранным белком, формирующим гомотриммеры, связывающие три соответствующих рецептора [619]. TRAIL представлен на многих иммунных клетках, в том числе показана его экспрессия на НК-клетках после активации цитокинами IL-2 и IL-15 [459]. Помимо TRAIL НК-клетки также экспрессируют TRAIL-R2 и TRAIL-R3, однако апоптоз самих НК-клеток по TRAIL-зависимому механизму не установлен [459]. При связывании TRAIL рецепторами TRAIL-R1 (DR4 - от англ. Death receptor) и TRAIL-R2 (DR5) происходит сборка ассоциированного с TNF-рецептором домена смерти, аналогичного FADD, - TRADD [530, 619]. Рецепторы TRAIL-R3 (DcR1 - от англ. Death decoy receptor) и TRAIL-R4 (DcR2) не содержат TRADD домена и не вызывают активации каспаз [449]. Причем TRAIL-R3 и TRAIL-R4 могут блокировать проведение апоптотического сигнала через рецепторы TRAIL-R1 и TRAIL-R2. Рецептор-ловушка DcR1 препятствует сборке сигнального комплекса DISC, сдерживая TRAIL в липидных рафтах мембраны. Рецептор-ловушка DcR2 связывается с DISC параллельно с TRAIL-R2, вызывая ингибирование каспаз [449]. Как и в случае с FasL, для TRAIL-индуцированного сигналинга характерна активация каспаз, в том числе каспазы 8, которая вызывает образование tBID, активацию пермеабилзации митохондрий и выход цитохрома c [577].

Таким образом, связывание белков TRAIL и Fas НК-клеток их рецепторами на клетке-мишени вызывает сборку в клетке-мишени рецептор-ассоциированного «домена смерти». В свою очередь этот домен активирует каскад реакций, вызывая амплификацию апоптотического сигнала. Контакт НК-клетки с клеткой-мишенью происходит в присутствии различных цитокинов микроокружения, которые могут влиять на результат этого взаимодействия.

#### ***1.1.4.3 Цитокин-опосредованные механизмы индукции НК-клетками цитотоксичности***

Помимо основной функции, связанной с реализацией цитотоксической активности в отношении трансформированных клеток, НК-клетки способны к секреции цитокинов [47]. Например, под влиянием провоспалительных цитокинов IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ , которые секретируют НК-клетки, происходит повышение экспрессии рецепторов адгезии ICAM-1 опухолевыми клетками, что в свою очередь обеспечивает формирование ИС между ними и НК-клетками и способствует их лизису [702]. В случае инкубации опухолевых клеток с НК-клетками и

нейтрализующими антителами к  $IFN\gamma$  и  $TNF\alpha$  экспрессия ICAM-1 опухолевыми клетками была снижена по сравнению с экспрессией ICAM-1 в отсутствие  $IFN\gamma$  и  $TNF\alpha$  [702]. Синтез  $IFN\gamma$  НК-клетками усиливается при активации, например, под влиянием IL-2 [163]. Цитокины  $IFN\gamma$  и  $TNF\alpha$  могут напрямую вызывать апоптоз опухолевых клеток. Так, связывание  $TNF\alpha$  со своим рецептором инициирует сборку комплекса FADD, который активирует прокаспазу-8, что запускает каскад протеаз, приводящий к апоптозу [679]. Показано, что продукцию НК-клетками  $IFN\gamma$  стимулирует как связывание НК-клеткой клетки-мишени, так и воздействие на НК-клетки цитокинов, таких как IL-12 и  $IFN\beta$  [522]. При воздействии на клетки меланомы  $IFN\gamma$  вызывал активацию STAT1, который в свою очередь изменял активность STAT3, что в итоге приводило к повышению экспрессии проапоптотических белков в опухолевых клетках. Изолированное воздействие  $IFN\gamma$  не приводило к активации экспрессии Fas [178].

В повышении секреции НК-клетками  $TNF\alpha$  также задействованы мембран-связанные рецепторы, в том числе  $TNF\alpha$ -образующий энзим (от англ. TNF- $\alpha$ -converting enzyme - TACE), также известный как MMP 17 [588]. Этот энзим осуществляет срезание рецепторов с поверхности клетки, в том числе это показано для лигандов рецептора NKG2D [138]. После активации цитокинами IL-12, IL-15 и IL-18 в НК-клетках повышен синтез  $TNF\alpha$ , а также повышена активность TACE. После блокирования рецептора NKG2D активность TACE была снижена, однако экспрессия этого энзима на НК-клетках не изменялась, что указывает на зависимость активности TACE как от рецепторного взаимодействия через NKG2D, так и цитокинового микроокружения клетки [588]. В случае блокирования рецептора NKG2D синтез НК-клетками  $TNF\alpha$  не изменялся, тогда как блокирование TACE приводило к снижению продукции  $TNF\alpha$  НК-клетками [588]. Установлено, что НК-клетки могут сохранять в составе своей плазматической мембраны  $TNF\alpha$ , образуя так называемую мембран-связанную форму (m). В результате связывания m $TNF\alpha$  с растворимой формой рецептора к TNF - sTNFR1 НК-клетка усиливает секрецию FasL и  $TNF\alpha$ , причем как мембран-связанных, так и растворимых форм. Это в свою очередь усиливает цитотоксическую активность НК-клеток [752]. Соответственно, рецепторное взаимодействие через NKG2D стимулирует активность TACE, который, срезая m $TNF\alpha$  с мембраны НК-клеток, повышает концентрацию этого цитокина в микроокружении. Таким образом, провоспалительные цитокины  $TNF\alpha$  и  $IFN\gamma$  вызывают активацию НК-клеток и последующую реализацию гибели клеток-мишеней.

В целом необходимо отметить, что основной функцией естественных киллеров, присутствующих в периферической крови, является реализация цитотоксичности в отношении клеток-мишеней. В то же время в зависимости от микроокружения функциональная активность НК-клеток может изменяться, в частности, сопровождаться снижением их цитотоксического потенциала. Рецепторный аппарат НК-клеток, включает цитотоксические рецепторы,

стимулирующие сборку иммунологического синапса, и адгезионные рецепторы, стабилизирующие его. К гибели клетки-мишени приводит поступление из НК-клетки цитолитических белков, активирующих каспазы. Кроме того, дополнительно способствует активации каспаз кластеризация TRAIL-R и FasL клетки-мишени в результате связывания TRAIL и Fas НК-клеток с последующей сборкой «доменов смерти». Рецепторный аппарат НК-клеток включает множество как активационных, так и ингибиторных рецепторов, что позволяет регулировать взаимодействие с клеткой-мишенью. Цитокины, присутствующие в микроокружении, также участвуют в регуляции взаимодействия с потенциальными мишенями, в том числе стимулируя цитотоксическую функцию НК-клеток. Заслуживает внимание процесс приобретения НК-клетками функциональной зрелости.

## 1.2 Регуляция процесса дифференцировки НК-клеток

### 1.2.1 Основные этапы дифференцировки НК-клеток

Дифференцировка НК-клеток связана с изменениями их фенотипа и интенсивности реализуемой цитотоксической активности [462]. Во взрослом организме основным источником гемопоэтических стволовых клеток, способных дифференцироваться в НК-клетки, является костный мозг [411]. НК-клетки способны к рециркуляции [117] и продолжению своей дифференцировки в тимусе, селезенке, миндалинах и лимфатических узлах [411]. Предшественники НК-клеток в костном мозге экспрессируют рецепторы CD34, CD45RA, CD10 [411] и не экспрессируют CD94, CD16, CD117 [751]. После миграции из костного мозга во вторичные лимфоидные органы предшественники НК-клеток утрачивают CD10 и начинают экспрессировать CD161 и CD117 [411]. В экспериментах *in vitro* установлено, что связывание рецептора CD161 незрелых НК-клеток приводит к повышению продукции IL-8, который аутокринно и паракринно стимулирует дифференцировку предшественников НК-клеток из стволовых клеток и подавляет дифференцировку предшественников миелоидных клеток [464]. Во вторичных лимфоидных органах предшественники НК-клеток проходят дифференцировку до стадии незрелых НК-клеток [411], которые в свою очередь дают развитие двум основным популяциям НК-клеток человека -  $CD56^{dim}CD16^{bright}$  и  $CD56^{bright}CD16^{dim}$ . По мере дифференцировки НК-клетки приобретают функциональные рецепторы, связанные с их цитотоксической функцией, причем вначале наблюдается экспрессия рецепторов CD94/NKG2A, NKp46, NKG2D, затем экспрессия KIR и CD16 [751].

Присутствующие в периферической крови и селезенке  $CD56^{dim}CD16^{bright}$  НК-клетки [47, 462] характеризуются повышенной цитотоксической активностью и экспрессией широкого спектра KIR, а также цитотоксических рецепторов NKp30, NKp44, NKp46 [411]. При

культивировании CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>bright</sup> NK-клеток в присутствии клеток линии K-562 показано повышение секреции цитокинов IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  NK-клетками [209].

Популяция CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>dim</sup> NK-клеток преимущественно представлена в лимфатических узлах и миндалинах, а в крови составляет менее 10% от популяции NK-клеток [170, 411, 462]. Для CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>dim</sup> NK-клеток характерна сниженная цитотоксическая активность и сниженная экспрессия рецепторов NKp46 [411]. В присутствии клеток линии K-562 популяция CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>dim</sup> NK-клеток изменяет продукцию цитокинов незначительно, однако при совместной стимуляции цитокинами IL-12 и IL-18 демонстрирует повышенную по сравнению с CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>bright</sup> NK-клетками секрецию IFN $\gamma$  [209]. Необходимо отметить, что популяции NK-клеток с фенотипом CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>dim</sup> объединяют с CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> NK-клетками, указывая общую популяцию CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-/bright</sup>, и отмечая, что определяющим маркером данных популяций является CD56 [117, 411, 690]. В результате активации как *in vivo*, так и *in vitro* NK-клетки с фенотипом CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>dim</sup> могут повышать содержание перфорина и приобретать фенотип CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>bright</sup> NK-клеток: KIR+ IL-7R- c-kit - CXCR3- CCR7- CD62L- [117]. С возрастом количественные показатели популяций NK-клеток изменяются: количество незрелых CD56<sup>bright</sup> NK-клеток сокращается, в то время как количество CD56<sup>dim</sup> NK-клеток, экспрессирующих рецептор CD57, увеличивается [26].

Помимо разделения на основании экспрессии CD16 и CD56 были попытки классификации зрелых NK-клеток по профилю секретируемых ими цитокинов: NK1, секретирующие IFN $\gamma$ ; NK2, секретирующие IL-4, IL-5, IL-13; NK3, секретирующие TGF $\beta$ ; и NKr1, секретирующие IL-10 [563]. Однако, данная классификация не является широко используемой.

Обсуждается выделение отдельной стадии дифференцировки NK-клеток, которую называют «лицензированные» [159, 754], «прошедшие обучение» (от англ. *educated*) [236, 625], адаптивные [19] или преактивированные [291, 618] NK-клетки или NK-клетки, подобные клеткам памяти (от англ. *memory-like NK cells*) [341, 499]. На данный момент термин не является устоявшимся, возможны некоторые различия в описываемых функциональных и фенотипических характеристиках NK-клеток этой стадии дифференцировки.

В настоящее время для NK-клеток по аналогии с Т-лимфоцитами обсуждается возможность зависимой и независимой от антигенной стимуляции дифференцировки NK-клеток, подобных клеткам памяти [234]. Под антиген-зависимой дифференцировкой подразумевают образование пула NK-клеток, подобных клеткам памяти, в результате воздействия вируса (показано для цитомегаловируса) [340] или в результате воздействия гаптена (в экспериментах на мышах) [234]. Например, у человека описана популяция CD94/NKG2C<sup>+</sup> NK-клеток, для которой характерна высокая экспрессия ингибиторных

рецепторов KIR. В результате CMV-инфекции пролиферация этой популяции клеток возрастает, у этих клеток также повышается экспрессия активационных рецепторов KIR2DS4, KIR2DS2, KIR3DS1 [92]. Под антиген-независимой дифференцировкой NK-клеток, подобных клеткам памяти, понимают формирование пула этих клеток под воздействием цитокинов (IL-12, IL-15, IL-18) [234, 340].

NK-клетки определяют, как подобные клеткам памяти, в том числе по наличию и интенсивности экспрессии рецепторов NKG2A и NKG2C, в совокупности с экспрессией фенотипических маркеров CD56 и CD57 [74, 328]. Показано, что NK-клетки с фенотипом CD56<sup>dim</sup> NKG2C<sup>+</sup>, не экспрессирующие CD57, способны к пролиферации, и являются вероятными предшественниками NK-клеток, подобных клеткам памяти, для которых характерен фенотип CD56<sup>dim</sup> CD57<sup>+</sup> NKG2C<sup>+</sup> [328]. Выявлена корреляционная взаимосвязь между способностью CD56<sup>bright</sup> NK-клеток, подобных клеткам памяти, продуцировать IFN $\gamma$  и экспрессией ими рецептора NKG2A/CD94 [555]. Однако, различий в содержании интактными и предварительно активированными NK-клетками фосфорилированных форм белков STAT4 и STAT3, а также по содержанию мРНК IFN $\gamma$  не было установлено. Эти данные указывают на вовлеченность посттранскрипционных и посттрансляционных механизмов индукции преактивированного, сенсibilизированного состояния у NK-клеток [555]. Кроме того, описана гетерогенность фенотипа NK-клеток, подобных клеткам памяти [19]. Например, NK-клетки, экспрессирующие рецепторы KIR2DL2 и KIR2DL3 с большей вероятностью формируют популяции адаптивных NK-клеток [31].

В литературе указывают, что как CD56<sup>bright</sup> NK-клетки, так CD56<sup>dim</sup> NK-клетки способны формировать NK-клетки, подобные клеткам памяти [555], как конечную стадию развития NK-клеток [751]. Также установлено, что CD57<sup>+</sup> NK-клетки, которые считаются терминально дифференцированными, могут терять этот рецептор в присутствии с IL-2 и IL-21 [632] и сохранять способность к секреции IFN $\gamma$  [631]. Эти исследования указывают на определенную пластичность поверхностного рецепторного аппарата NK-клеток под действием цитокинов [328]. В таблице 1.4 перечислены основные стадии дифференцировки NK-клеток, а также представлен фенотип этих клеток.

Необходимо отметить, что дифференцировку NK-клеток в настоящее время рассматривают в рамках группы лимфоидных клеток врожденного иммунитета (от англ. Innate Lymphoid Cells (ILC)). Среди ILC выделяют классические NK-клетки и ILC1, ILC2, ILC3. Согласно Spits H. et al. лимфоидные клетки врожденного иммунитета можно разделять на группы, основываясь на секретируемых этими клетками цитокинах и основных транскрипционных факторах, участвующих в их дифференцировке [622].

Таблица 1.4 - Поверхностные рецепторы НК-клеток человека, определяющие стадии их дифференцировки

Стадия дифференцировки	Поверхностные рецепторы
Гемопоэтическая стволовая клетка	CD10- [751] CD34+ [204, 751] CD38 <sup>low</sup> CD45RA-/ CD45+ [204]
Стадия 1	CD10+ [411, 751] CD34+ [204, 751] CD117- CD16- CD94- CD45RA+ [204, 751]
Стадия 2	CD34+ [204] CD16- CD94- CD10- CD45RA+ CD161+ [204, 220, 411, 751] CD117+ [204, 220, 411, 751] Integrin $\beta$ 7 <sup>+</sup> [220, 411, 751]
Стадия 3	CD117+ [204] CD34- CD94- CD16- CD11a+ CD161+ NKp44- CD56- [220, 292, 751]
Стадия 4 CD56 <sup>bright</sup>	CD117+/- CD94 <sup>high</sup> [204] CD34- CD16-/ <sup>dim</sup> CD11a+ CD56 <sup>bright</sup> KIR+ [204] NKp46 <sup>dim</sup> [411, 751]
Стадия 5 CD56 <sup>dim</sup>	CD16+/ <sup>bright</sup> KIR+/- CD56 <sup>dim</sup> NKp30+ NKp44+ NKp46+ [491] NKG2D [491] CXCR3- CCR7- CD62L- [117, 411, 751] CD34- CD117- CD94+/- [204]
Стадия 6 (Клетки, подобные клеткам памяти)	NKG2A+ CD94+ NKp46+ CD69+ [555]

К клеткам первой группы ILC (group 1 ILC) относят ILC1 и НК-клетки. Обе клеточные популяции секретируют IFN $\gamma$  [622]. Для ILC1 и НК-клеток, характерна экспрессия транскрипционного фактора T-bet. Для НК-клеток помимо T-bet также характерна экспрессия транскрипционного фактора Eomes [623]. К клеткам второй группы ILC (group 2 ILC) относят ILC2, для которых характерна секреция IL-5 и IL-13. Дифференцировка ILC2 связана с активностью транскрипционных факторов ROR $\alpha$  и GATA3 [622]. К третьей группе ILC (group 3 ILC) относят ILC3, при их дифференцировке задействован фактор ROR $\gamma$ t [622]. Анализ транскрибируемых генов в ILC1, ILC2, ILC3 и НК-клетках не показал уникальных генов, регулирующих развитие той или иной популяции [554], что указывает на пластичность отдельных этапов дифференцировки и возможность взаимных переходов ILC [175, 554, 623]. Разнообразие популяций тканерезидентных НК-клеток вызывает сложности с однозначным определением их места в классификации ILC.

Таким образом, в основном дифференцировка НК-клеток проходит в костном мозге, в результате которой формируются две основные популяции НК-клеток - CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>bright</sup> и CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>dim</sup>. Естественные киллеры относят к группе 1 врожденных лимфоидных клеток, так как эти клетки сходны по функциональным характеристикам. В настоящее время не решен

вопрос о классификации популяции НК-клеток, обладающих свойствами, характерными иммунным клеткам памяти. По-видимому, существует некоторая пластичность дифференцировки НК-клеток, возникающая в результате воздействия факторов микроокружения, например, цитокинов или присутствия патогенов. Многоэтапность процесса дифференцировки НК-клеток предполагает участие многих транскрипционных факторов, которые будут рассмотрены в следующем разделе.

### 1.2.3 Участие транскрипционных факторов в процессе дифференцировки НК-клеток

В большинстве работ, касающихся исследования транскрипционных факторов, участвующих в контроле дифференцировки разных групп ILC, в частности, НК-клеток, модельным объектом является мышь. Несмотря на определенные различия в фенотипе ILC у человека и мыши, возможно проводить некоторые аналогии, так как по локализации ILC, их функциям и участвующим в их образовании транскрипционным факторам ILC человека и мыши схожи [642]. В дифференцировке НК-клеток на разных этапах участвуют такие транскрипционные факторы, как *Id2*, *Nfil3*, *ETS1*, *Ikaros*, *Eomes*, *GATA-3*, *TOX*, *FoxO1*, *T-bet*, *Aiolos* [285, 542, 580, 693]. В данном разделе представлена информация о некоторых транскрипционных факторах, с активностью которых связаны основные этапы созревания НК-клеток (Рисунок 1.1).

Дифференцировка НК-клеток начинается со стадии общего лимфоидного предшественника (CLP), который дифференцируется в ранний предшественник ILC (EILC). Последовательная дифференцировка в общий предшественник ILC (CILP) связана с экспрессией транскрипционного фактора *Id2* [175]. Для мышей с дефектом данного транскрипционного фактора было характерно отсутствие всех популяций ILC, в то время как дифференцировка Т- и В-лимфоцитов не была нарушена, в связи с чем *Id2* также может претендовать на роль основного транскрипционного фактора, регулирующего дифференцировку ILC [175, 624]. На поздних этапах дифференцировки зрелые НК-клетки (mNK) сохраняют экспрессию *Id2* [175]. На мышях показано, что по мере дифференцировки предшественников НК-клеток (NKP) в mNK экспрессия *Id2* увеличивается [581].

На дифференцировку НК-клеток негативно влияет активация транскрипционного фактора *GATA-3* на стадии CLP, что приводит к нарушению формирования НК-клеток и преобладанию дифференцировки Т-лимфоцитов. Подавление *GATA-3* способствует транскрипции генов, участвующих в контроле образования НК-клеток [675]. На мышях показано, что дефицит *GATA-3* на более поздних стадиях дифференцировки, а именно незрелых НК-клеток (iNK), приводит к снижению экспрессии генов *Id2*, *T-bet* и *Nfil3* (*E4bp4*), что в свою



очередь приводит к нарушению дифференцировки NK-клеток [56]. Так, NK-клетки мышей с дефицитом GATA-3 характеризовались сниженной способностью секретировать  $IFN\gamma$ , однако дегрануляция и связанная с ней экспрессия гликопротеина CD107a NK-клетками была сопоставима с показателями интактных контрольных мышей [56]. Для человека показано, что экспрессия *GATA-3* сопровождалась снижением экспрессии гена *NKG2A*, что указывает на участие GATA-3 в регуляции функциональных свойств NK-клеток [523] (Рисунок 1.1).

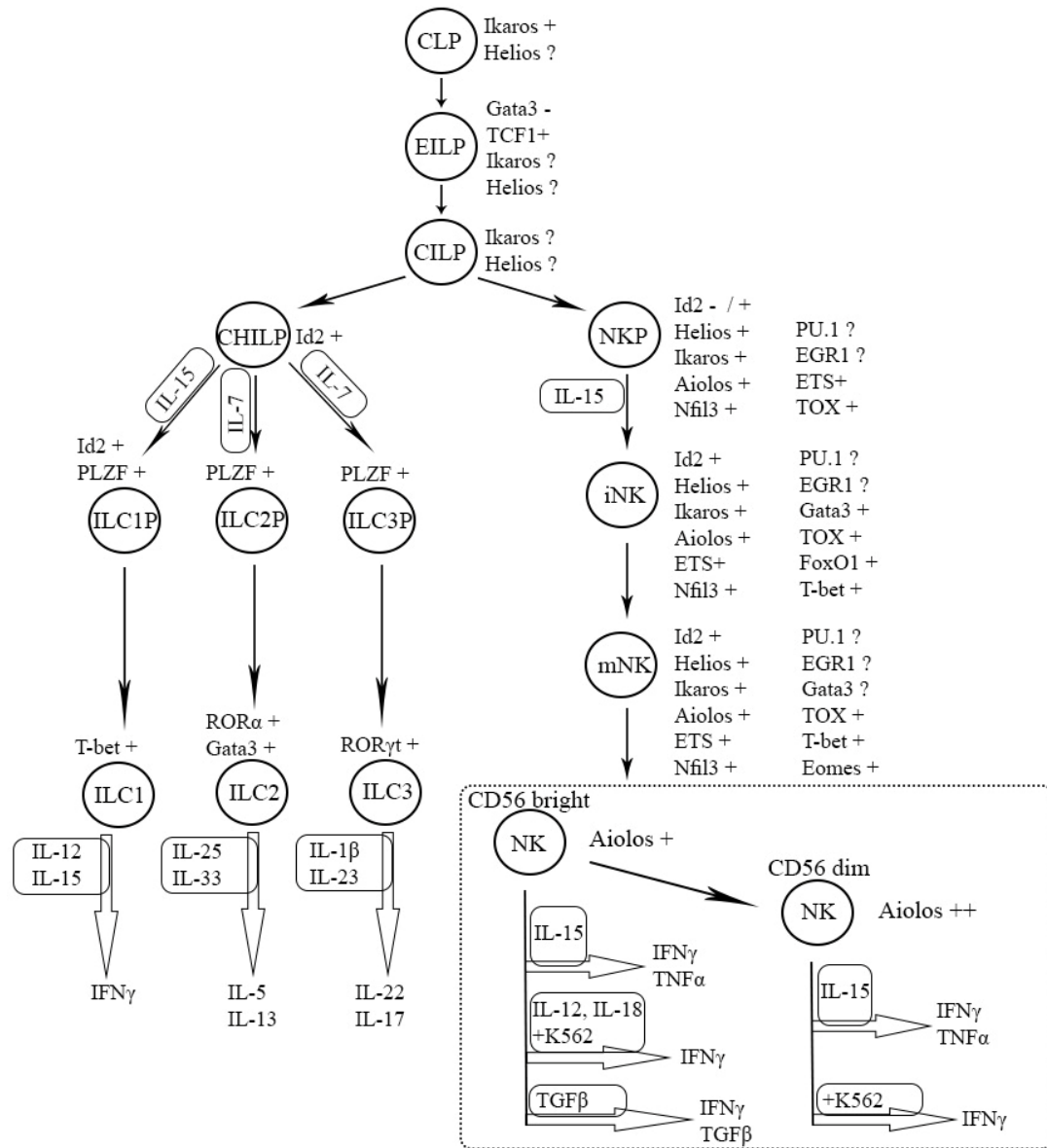


Рисунок 1.1 - Основные этапы дифференцировки NK-клеток в рамках классификации ILC и связанные с ними транскрипционные факторы. CLP - общий лимфоидный предшественник, EILC - в ранний предшественник ILC, CILP - общий предшественник ILC, CHILP - общий лимфоидный предшественник врожденных лимфоцитов, подобных хелперным клеткам, ILC1P - предшественник ILC1, ILC2P - предшественник ILC2, ILC3P - предшественник ILC3, NKP - предшественник NK-клеток, iNK - незрелые NK-клетки, mNK - зрелые NK-клетки

В процессе дифференцировки NK-клеток из CLP также наблюдается экспрессия генов *Irf1* и *Irf2*, кодирующих, соответственно, транскрипционные факторы семейства Ikaros (Ikaros и Helios) [285, 523]. Причем экспрессия *Irf1* сохраняется на протяжении всего пути от CLP до mNK [285]. Экспрессия *Irf2* находится на низком уровне на начальных стадиях дифференцировки, когда линия NK-клеток еще не выделена (CLP), и возрастает у NKP, iNK и mNK [285, 523]. У человека экспрессия Aiolos показана для pNK-клеток с фенотипом CD56<sup>dim</sup> и CD56<sup>bright</sup>. В CD56<sup>dim</sup> NK-клетках содержание Aiolos было выше, что позволяет предполагать участие данного фактора в терминальных стадиях дифференцировки NK-клеток [94].

Транскрипционными факторами, которые наиболее часто связывают с терминальными стадиями дифференцировки NK-клеток, являются T-bet и Eomes [580, 662]. На мышах показано, что T-bet регулирует образование iNK, стимулирует выход NK-клеток из костного мозга и индуцирует экспрессию IL-2R $\beta$  [580]. Фактор Eomes способствует приобретению NK-клетками функциональных рецепторов Ly49 [580]. Также с использованием мышей в качестве модельных животных показано, что нарушение экспрессии T-bet приводит к дефекту созревания и дифференцировки NK-клеток, также нарушаются функции NK-клеток, а именно их противовирусная активность [552]. В периферической крови NK-клетки человека также экспрессируют T-bet и Eomes [601]. Показано, что активность факторов T-bet и Eomes отчасти перекрывается [323]. Фактор T-bet контролирует экспрессию NK-клетками KIR2DL1, KIR2DL3, KIR2DS4, KIR3DL1 [323]. При активации как Eomes, так и T-bet возрастала способность NK-клеток к синтезу IFN $\gamma$ , избыточная экспрессия Eomes коррелировала с повышенной способностью NK-клеток к реализации антитело-зависимой клеточной цитотоксичности [323]. На мышах показано, что в отсутствие транскрипционных факторов T-bet и Eomes дифференцировка NK-клеток нарушена [252].

Таким образом, в процессе дифференцировки NK-клеток из CLP в mNK наблюдается последовательная регуляция экспрессии транскрипционных факторов, которые в свою очередь способствуют экспрессии цитотоксических рецепторов и рецепторов к цитокинам, а также стимулируют синтез в NK-клетках цитотоксических белков. Экспрессия рецепторов к цитокинам определяет возможность влияния цитокинового микроокружения на дифференцировку NK-клеток. Цитокины микроокружения, связываясь со своими рецепторами на NK-клетках, могут активировать различные каскады внутриклеточной передачи сигналов. В следующем разделе будут рассмотрены основные цитокины, принимающие участие в регуляции дифференцировки и активации NK-клеток.

### 1.2.4 Влияние цитокинов на дифференцировку NK-клеток и регуляцию их функций

Цитокины, секретируемые клетками микроокружения, влияют на дифференцировку NK-клеток. В костном мозге и селезенке основным цитокином, контролирующим дифференцировку NK-клеток и приобретение ими функциональных характеристик, является IL-15 [171]. В работах, выполненных на мышах, показано, что в отсутствие IL-15 клетки проходят стадии дифференцировки до предшественников NK-клеток [241, 695], однако не приобретают фенотип зрелых NK-клеток и экспрессируют сниженное количество рецепторов семейства Ly49 [294], являющиеся аналогами KIR у человека [411]. При инкубации клеток CD34-CD133-CD7- крови пупочной вены в присутствии комбинации цитокинов IL-15 и IL-21 наблюдается активация пролиферации этих клеток, появление CD56 на клетках и повышение его экспрессии, появление рецепторов NKG2A, NKG2D, NKp46 и индукция противоапоптотического белка Bcl-2, а также транскрипционных факторов GATA-3 и Id2, что указывает на непосредственное участие цитокинов IL-15 и IL-21 в регуляции дифференцировки NK-клеток из гемопоэтических стволовых клеток [99].

Цитокин IL-15 также стимулирует жизнеспособность NK-клеток, усиливая их пролиферацию и способствуя синтезу белка Bcl-2 [82, 151]. При культивировании в присутствии IL-15 CD56<sup>bright</sup>CD16- NK-клетки начинают экспрессировать рецептор CD16, дифференцируясь таким образом в CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> NK-клетки [58]. В то же время *in vitro* повышения экспрессии KIR не наблюдается, что указывает на необходимость IL-2 и других клеточных факторов, присутствующих в среде *in vivo*, для полноценной дифференцировки NK-клеток в CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>bright</sup> NK-клетки [58].

Роль цитокина TGF $\beta$  в дифференцировке NK-клеток до конца не определена. Так, при блокировании сигнального пути от TGF $\beta$ , реализуемого через белок SMAD3, формирование популяции CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> NK-клеток из CD34<sup>+</sup> стволовых клеток пупочного канатика не нарушалось [595]. Последующая инкубация этих NK-клеток с IL-15 приводила к образованию активированных NK-клеток, экспрессирующих цитотоксические рецепторы, в частности NKG2D, NKp44, и реализующих цитотоксическую активность в отношении клеток линии K-562 [595]. По другим данным TGF $\beta$  вызывает снижение экспрессии CD16 на CD56<sup>bright</sup> NK-клетках [58]. В то же время при добавлении в среду, содержащую IL-15, SCF и Flt3L, TGF $\beta$  ингибирует дифференцировку NK-клеток из CD34<sup>+</sup> стволовых клеток, вызывая снижение образования CD56<sup>+</sup> NK-клеток по сравнению с контролем и тормозя приобретение NK-клетками рецепторов CD94, CD16, KIR [58]. Под влиянием TGF $\beta$  показано приобретение NK-клетками рецепторов, характерных для ILC1 - CD49a, CD69, а также снижение содержания транскрипционного фактора, регулирующего дифференцировку NK-клеток - Eomes [154]. Так как ILC1 и NK-клетки

являются популяциями дифференцированных клеток, подобный переход можно расценивать как трансдифференцировку.

Цитокин IL-18 стимулирует NK-клетки к продукции IFN $\gamma$ , а также повышает экспрессию ими FasL и способность к индукции апоптоза [283]. Кроме того, описана способность IL-18 потенцировать эффекты TGF $\beta$  [102], в частности усиливать экспрессию хемокиновых рецепторов CXCR3 и CXCR4, предварительно вызванную воздействием TGF $\beta$ . После добавления IL-18 к NK-клеткам, предварительно обработанным TGF $\beta$ , эффект в отношении рецептора NKp30 также был более выражен, его экспрессия еще больше снижалась в присутствии IL-18 [122].

Цитокин IL-18, в случае совместного влияния с IL-12, стимулировал цитотоксическую активность NK-клеток, секрецию IFN $\gamma$  и повышение содержания GrzB [169]. После активации цитокинами IL-15/IL-18/IL-12 получали NK-клетки с высокой экспрессией CD16 и CD57, которые также содержали GrzB и перфорин в большем количестве, чем интактные клетки. Эти клетки расценивали как NK-клетки, подобные клеткам памяти [91]. NK-клетки мыши, стимулированные IL-12, демонстрировали снижение цитотоксической активности, снижение экспрессии активационных рецепторов при одновременном повышении экспрессии CD25, CD49a и NKp46 [493]. Под влиянием IL-18 NK-клетки мышей также начинали синтезировать IL-10 [145]. После воздействия смеси цитокинов IL-15/IL-18/IL-12 NK-клетки экспрессировали ингибирующий корецептор Tim-3 и начинали секретировать IL-10 и TGF $\beta$  [493]. По другим данным NK-клетки после стимуляции IL-18/IL-15/IL-12 секретировали IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ , а также демонстрировали повышенную экспрессию CD25 и сниженную экспрессию CD16 [408]. В результате активации pNK-клеток IL-18 в совокупности с IL-2 и IL-15 NK-клетки приобретали высокую экспрессию CD16, NKG2D и выраженную цитотоксичность в отношении клеток линии K-562 [408]. Соответственно, в зависимости от условий микроокружения эффекты цитокинов на NK-клетки могут изменяться.

Цитокин TNF $\alpha$  является провоспалительным цитокином, регулирующим многие клетки в условиях воспалительной реакции [741, 755]. Выделены два рецептора к TNF $\alpha$  - TNFR1 (p55) и TNFR2 (p75) [741, 755]. Блокирование TNFR1 приводило к снижению цитотоксической активности NK-клеток, однако не влияло на секрецию NK-клетками IFN $\gamma$  [486]. Воздействуя через рецептор TNFR2, цитокин TNF $\alpha$  вызывает активацию NK-клеток как у человека, так и у мыши [437, 730]. В совокупности TNF $\alpha$  с IL-2 вызывают активацию NK-клеток, усиливая их цитотоксическую функцию [210]. При участии TNFR2 TNF $\alpha$  стимулирует продукцию NK-клетками IFN $\gamma$  [60]. В присутствии TNF $\alpha$  NK-клетки, предварительно активированные IL-2 и IL-12 также усиливали продукцию IFN $\gamma$  [60]. В случае блокирования TNF $\alpha$  с помощью препаратов моноклональных антител установлена сниженная цитотоксическая активность NK-клеток в

отношении опухолевых клеток, связанная как со снижением способности к дегрануляции и реализации цитотоксичности, так и со сниженной секрецией IFN $\gamma$  [486]. Таким образом, цитокины участвуют в регуляции функциональной активности NK-клеток, оказывая влияние на экспрессию поверхностных рецепторов и реализацию естественными киллерами эффекторных функций.

В целом необходимо отметить, что процесс дифференцировки NK-клеток связан с последовательным приобретением NK-клетками характерных фенотипических маркеров (CD56, CD16, CD57) и рецепторов, обеспечивающих реализацию клетками цитотоксичности (NCR, KIR, TRAIL и др.). Вместе с тем, дифференцировка NK-клеток характеризуется определенной пластичностью, возникающей в следствие влияния факторов микроокружения, в том числе цитокинов. Синергичные в отношении NK-клеток эффекты цитокинов, например, IL-12 и IL-18, наряду с антагонистическими эффектами других цитокинов, например IL-15 и TGF $\beta$ , а также активируемые ими транскрипционные факторы указывают на тонкую регуляцию дифференцировки и функциональной активности NK-клеток в зависимости от микроокружения. Представляет интерес стабильность приобретенных NK-клетками характеристик в результате модификации со стороны клеточного микроокружения. Одной из популяций естественных киллеров, отличающихся по фенотипическим и функциональным характеристикам от классических NK-клеток, циркулирующих в периферической крови, являются NK-клетки матки. Путь формирования этой популяции NK-клеток однозначно не установлен. Клеточное и гуморальное микроокружение NK-клеток в матке может оказывать влияние на их фенотипические и функциональные характеристики.

### **1.3. Особенности популяции NK-клеток матки**

#### **1.3.1 Морфофункциональная организация маточно-плацентарного комплекса**

При беременности в матке формируется плацента, орган, обеспечивающий взаимодействие материнского организма с плодом. Физиологическое развитие плода возможно благодаря обменной и барьерной функциям, которые выполняет плацента, кроме того, клетки плаценты синтезируют различные ростовые факторы и гормоны [21, 76]. Плацента человека относится к типу гемохориальных дискоидальных ворсинчатых плацент [21]. Стенка матки состоит из трех слоев: эндометрия, обращенного в полость матки, миометрия и наружного периметрия [347]. Для успешной имплантации бластоцисты и последующего формирования плаценты необходимо, чтобы прошла так называемая децидуальная трансформация эндометрия, включающая физиологические и морфологические изменения эндометрия для подготовки к

имплантации эмбриона [543]. Этот процесс происходит в середине секреторной фазы менструального цикла под влиянием прогестерона, который продуцирует желтое тело. Прогестерон стимулирует секрецию эндометриальных желез, способствует пролиферации и дифференцировке стромальных клеток [119].

После оплодотворения в результате серии последовательных делений дробления формируется бластоциста, состоящая из трофэктодермы или первичного трофобласта, которая в дальнейшем сформирует плаценту, эпибласта, формирующего ткани эмбриона, и гипобласта, формирующего желточный мешок [585]. На 6-7-й день бластоциста прикрепляется к эпителию матки [295]. Прикрепление бластоцисты к эпителию эндометрия обеспечивается экспрессией интегринов, кадгеринов, селектинов клетками эндометрия [482]. После контакта с эпителием матки из клеток трофобласта бластоцисты дифференцируется цитотрофобласт [16]. Эти клетки с помощью MMP расщепляют компоненты внеклеточного матрикса, облегчая инвазию эмбриона в строму эндометрия [327]. Деление и слияние клеток цитотрофобласта приводит к образованию многоядерного синцитиотрофобласта [5], в котором содержатся лизосомальные гранулы, высвобождение содержимого которых способствует разрушению эпителия матки и погружению в него зародыша [16]. Синцитиотрофобласт окружает зародыш сплошным слоем, защищая его от прямого контакта с материнскими клетками, а также регулирует транспорт кислорода и питательных веществ [295].

По мере погружения синцитиотрофобласта вглубь слизистой оболочки матки формирующиеся очаги разрушения эндометрия объединяются в полости, образуя лакуны [16]. С появлением лакун в составе плаценты можно выделить хориальную пластину, обращенную к эмбриону, межворсинчатое пространство, включающее в себя систему лакун и трабекул, формирующих ворсины хориона, а также базальную пластинку, контактирующую с эндометрием [295]. По мере формирования капилляров ворсин хориона устанавливается фетоплацентарное кровообращение [16]. Часть ворсин хориона контактирует с базальной пластиной, являясь так называемыми заякоривающими ворсинами. В местах контакта со стромой эндометрия синцитиотрофобласт ворсин дегенерирует, а клетки цитотрофобласта пролиферируют, формируя трофобластические колонки (Рисунок 1.2) [470]. В колонках локализуются клетки с инвазивными свойствами (экстравиллезный, или вневорсинчатый трофобласт) [5].

Среди клеток экстравиллезного трофобласта выделяют 2 субпопуляции - интерстициальный и эндovasкулярный (внутрисосудистый) трофобласт. Интерстициальный трофобласт продолжает мигрировать в эндометрий матки (Рисунок 1.2). Основной функцией клеток вневорсинчатого эндovasкулярного трофобласта является участие в ремоделировании спиральных сегментов эндометриальных артерий матери [165], что делает спиральные артерии

независимыми от сужения сосудов материнского организма [562] и способствует установлению маточно-плацентарного кровообращения [119].

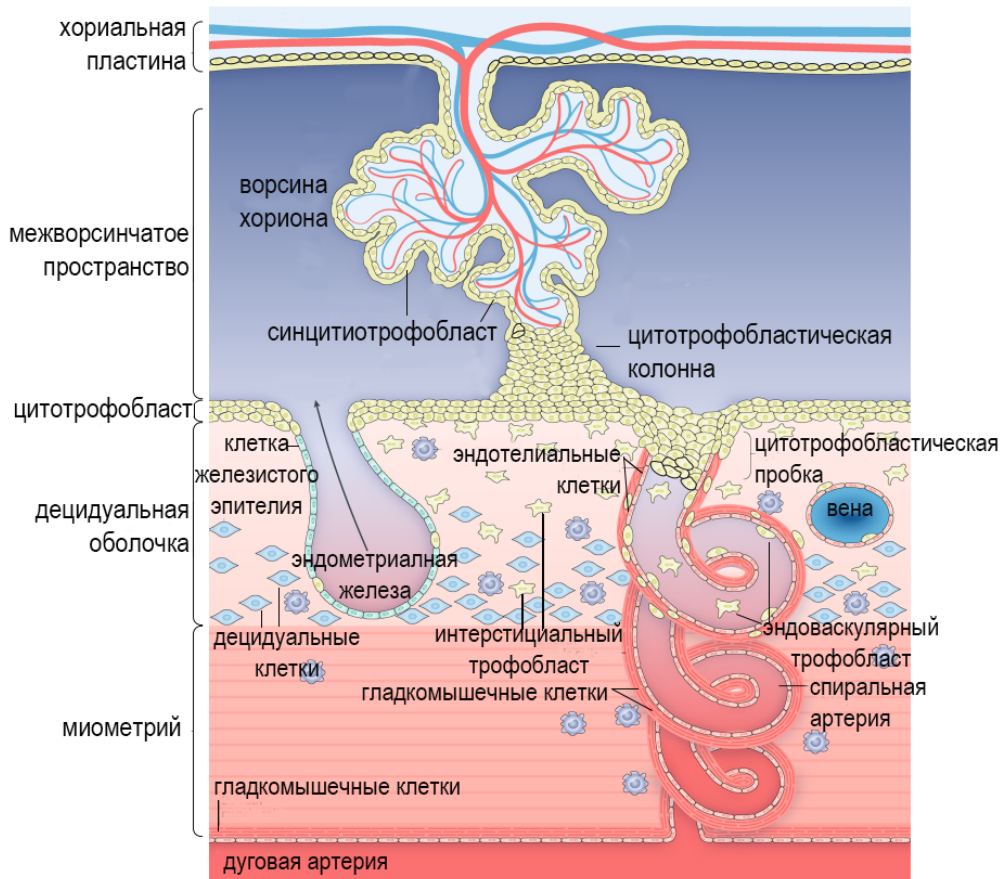


Рисунок 1.2 - Схема строения плаценты I триместра (модифицировано из “Tracking placental development in health and disease”, Aplin et al., 2020)

В зрелой плаценте выделяют плодную часть, лакуны и материнскую часть. Плодная поверхность плаценты представлена хориальной пластинкой, включающей слившиеся соединительнотканые оболочки амниона и хориона (Рисунок 1.3). Отходящие от нее стволковые ворсины вместе с ответвлениями формируют котиледоны - структурно-функциональные единицы плаценты [16]. В децидуальной оболочке располагаются ветви спиральных артерий, фрагменты якорных ворсин, элементы вневорсинчатого трофобласта [119], а также клетки иммунной системы, в том числе НК-клетки, макрофаги, Т-регуляторные клетки [686].

Таким образом, одной из основных клеточных популяций формирующейся плаценты являются клетки трофобласта. Структура зрелой плаценты обеспечивает взаимодействие различных типов клеток плода и матери, в том числе клеток трофобласта и НК-клеток, что влияет на развитие беременности.

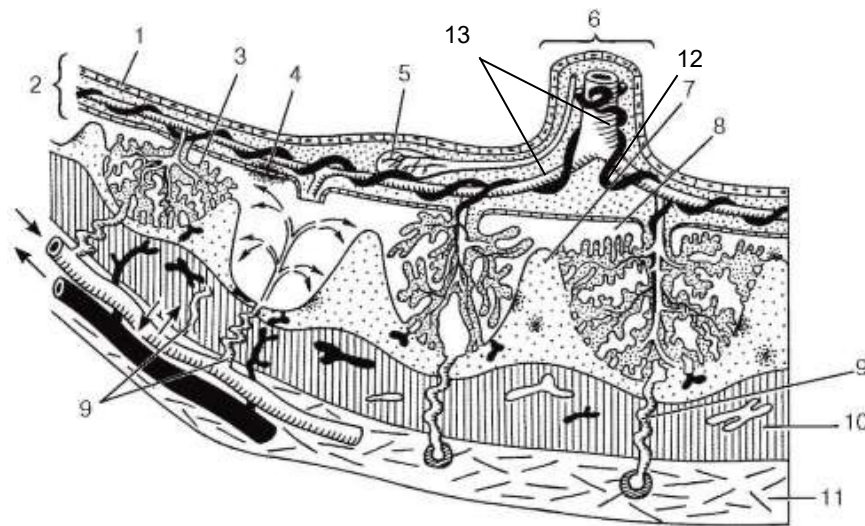


Рисунок 1.3 - Строение зрелой плаценты. На рисунке обозначены: эпителий амниона (1); хориальная пластинка (2); котиледон (3); фибриноид (4); желточный пузырек (5); пупочный канатик (6); септа (7); лакуна (8); спиральная артерия (9); базальная децидуальная оболочка (10); миометрий (11); пупочная вена (12); пупочная артерия (13). Стрелками указана циркуляция крови в сосудах и в одной из лакун, где не отражена ворсина. (Модифицировано из Афанасьева Ю.И. и др., 2012 [9])

### 1.3.2 Дифференцировка популяции НК-клеток матки

Естественные киллеры присутствуют в матке, их количество и функциональные характеристики могут различаться в зависимости от фазы менструального цикла, наличия или отсутствия беременности, а также манифестации репродуктивных патологий [4, 7, 18, 27, 39, 249, 422, 714, 716]. По некоторым данным dNK-клетки и NK-клетки эндометрия мало отличаются по фенотипическим характеристикам [423]. Отличия от рNK-клеток возможны по интенсивности экспрессии некоторых рецепторов, например, эндометриальные NK-клетки (eNK) демонстрируют выраженную экспрессию рецепторов NKp46 и NKG2D, а также отсутствие или низкую экспрессию рецепторов CD16, NKp44, NKp30 [426]. При беременности в плаценте установлена секреция IL-15 [317], в присутствии которого происходит активация eNK-клеток, секреция ими IFN $\gamma$  и IP-10, повышение экспрессии NKp46, NKp30, NKp44, NKG2D [426]. По некоторым данным популяция dNK-клеток гетерогенна и включает субпопуляции dNK1, dNK2, dNK3 [343, 685]. Все эти подгруппы экспрессируют CD49a и CD9. Среди транскриптов клеток первой подгруппы обнаруживают мРНК, кодирующую CD39, клетки второй субпопуляции экспрессируют аннексин A1, угнетающий активность лейкоцитов, и *ITGB2* (интегрин бета-2, участвующий в привлечении нейтрофилов). Клетки третьей подгруппы также экспрессируют *ITGB2*, однако среди их транскриптов также выявлен ген рецептора



CD160, участвующий в противовирусном иммунном ответе, рецептор, кодируемый геном *KLRB1*, ингибирующий цитотоксичность NK-клеток, и CD103 (интегрин альфа-E, опосредующий адгезию лимфоцитов к эпителиальным клеткам). Субпопуляция dNK1-клеток экспрессирует повышенные уровни рецепторов KIR и LILRB1, связывающие HLA-C и HLA-G на клетках вневорсинчатого трофобласта [685]. Показано, что dNK-клетки формируют кластеры с клетками трофобласта, а также макрофагами децидуальной оболочки, в особенности в I триместре [343]. Таким образом, NK-клетки эндометрия при беременности могут изменять свой фенотип и давать начало популяции dNK-клеток. Далее в течение I триместра происходит увеличение количества NK-клеток матки до 50% - 90% лимфоидных клеток матки [249]. Миграция NK-клеток из периферической крови за счет экспрессируемых рецепторов к хемокинам, продуцируемым клетками децидуальной оболочки [26], может быть одним из механизмов, определяющих подобное изменение количества NK-клеток в зоне маточно-плацентарного контакта [520]. Например, лигандами рецептора CD62L являются MadCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule-1) и CSPG2 (chondroitin sulfate proteoglycan 2). Показано, что эти белки присутствуют на клетках эндометрия в секреторную фазу менструального цикла [737]. Так как CD62L представлен на NK-клетках, взаимодействие CD62L с его лигандами обеспечивает привлечение этой популяции pNK-клеток в матку [737]. Однако вопрос формирования пула NK-клеток матки остается дискуссионным.

По данным литературы последние стадии дифференцировки NK-клеток представляют собой переход от CD56<sup>bright</sup> к CD56<sup>dim</sup> фенотипу [751]. По-видимому, этот процесс носит обратимый характер, так как dNK-клетки отличаются от CD56<sup>bright</sup> pNK-клеток по экспрессии ингибирующих рецепторов, для них характерен фенотип CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>dim/-</sup>, экспрессия CD94 и высокое содержание цитолитических гранул [117, 411]. Также в отличие от pNK-клеток NK-клетки в децидуальной оболочке в значительно большей степени способны связывать HLA-G, экспрессированный клетками трофобласта [656]. Вероятно, в результате влияния цитокинов, секретируемых в зоне маточно-плацентарного контакта, происходит изменение фенотипа CD56<sup>dim</sup> pNK-клеток и возможно его сближение с CD56<sup>bright</sup>, характерным для dNK-клеток. Можно предположить, что такое изменение фенотипа NK-клеток при беременности является продолжением дифференцировки клеток *in situ*.

Показано, что среди dNK-клеток значительно больше клеток, экспрессирующих рецептор CD25, по сравнению с pNK-клетками [647]. В периферической крови CD3-CD56<sup>bright</sup>CD25+ NK-клетки слабо экспрессируют ингибирующие рецепторы и интенсивно экспрессируют активационные рецепторы. Предполагают, что эти NK-клетки могут мигрировать в матку, а основной функцией этих NK-клеток является секреция цитокинов и

поддержание цитокинового микроокружения в зоне маточно-плацентарного контакта при беременности [647].

На дифференцировку рNK-клеток в dNK-клетки может влиять клеточное и цитокиновое микроокружение. Так, совместное культивирование рNK-клеток и стромальных клеток децидуальной оболочки приводит к снижению экспрессии рNK-клетками NKp44, NKp30, NKG2D, DNAM-1 [161] и приближению фенотипа NK-клеток к фенотипу, характерному для dNK-клеток. Кроме того, связывание хемокина CXCL12, секретируемого клетками плаценты, приводит к снижению экспрессии рNK-клетками NKp44, перфорина, снижению цитотоксичности, повышению экспрессии ингибирующего рецептора KIR2DL1 [520]. Показано, что в присутствии трофобласта NK-клетки повышали экспрессию рецепторов NKp30, NKp44, NKp46 [647], что указывает на активацию клетками трофобласта NK-клеток. В экспериментах *in vitro* TGF $\beta$ , секретируемый клетками децидуальной оболочки, вызывает снижение экспрессии рNK-клетками рецептора CD16, что сближает их фенотип с фенотипом, характерным для dNK-клеток [58, 320]. Показано наличие TGF $\beta$  в dNK-клетках [386, 419]. По данным литературы в течение беременности количество dNK3-клеток, характеризующихся способностью секретировать TGF $\beta$ , возрастает [563]. Предполагают, что dNK-клетки могут поддерживать свою дифференцировку за счет аутокринного воздействия цитокина TGF $\beta$ .

В слизистой оболочке матки установлено наличие предшественников NK-клеток третьей стадии дифференцировки, для которой характерен фенотип CD45+CD3-CD19- CD117+ CD94-CD7+/- CD69+ CD122<sup>low</sup> CD127+/- NKp44+/- NKG2D- [422]. Эти клетки способны к *in vitro* дифференцировке в предшественники NK-клеток стадии 4, в то же время не выявлено предшественников NK-клеток более ранних стадий дифференцировки [422]. Предшественники NK-клеток матки стадии 3 сходны с предшественниками NK-клеток 3 стадии во вторичных лимфоидных органах [220, 292, 751]. Показано, что предшественники NK-клеток 3 стадии присутствуют в матке [422] и также, как и во вторичных лимфоидных органах, способны секретировать IL-22. Это указывает на возможность дифференцировки NK-клеток в матке не только из естественных киллеров периферической крови после миграции, но и из предшественников NK-клеток, находящихся в матке.

На мышах показано, что NK-клетки матки представляют собой гетерогенную популяцию, состоящую из CD49a- классических NK-клеток и CD49a+ NK-клеток, экспрессирующих Eomes, а также CD49a+ Eomes- клеток, которые классифицируют как ILC1 [103, 463]. Количество Eomes+CD49a+ NK-клеток в матке снижается в течение беременности, в то время как общее количество NK-клеток увеличивается [463]. У мышей в матке при беременности также выявлено присутствие ILC2, экспрессирующих GATA-3, и ILC3, экспрессирующих ROR $\gamma$ t, однако в значительно меньших количествах, чем NK-клеток [103]. Как и у мышей, в децидуальной

оболочке у человека выявлены ILC3, экспрессирующие ROR $\gamma$ t [185]. В то же время количество ILC2, экспрессирующих GATA-3, крайне мало [185]. При анализе dNK-клеток человека показано, что более 85% NK-клеток обладают фенотипом CD49a+ [225], что указывает на возможность приобретения NK-клетками ILC1-подобного фенотипа. Установлено, что CD49a+ dNK-клетки, содержащие транскрипционный фактор Eomes, экспрессируют ряд генов (например, *PTN* (плейотропин), *OGN* (остеоглицин), *SPP1* (остеопонтин)), продукты которых регулируют развитие плода [225].

На мышах показано, что дефект *Nfil3*, но не *T-bet*, приводил к нарушению экспрессии генов *Ptn*, *Ogn*, *Spp1*, что в свою очередь приводило к снижению веса и нарушению развития скелета плодов [225]. Дефект *Nfil3* приводил к снижению количества классических NK-клеток в матке, нарушению ремоделирования спиральных артерий [103] и практически полному отсутствию ILC2, однако не влиял на количество ILC1 и ILC3 [185]. По другим данным нокаут гена *Nfil3* не оказывал значительного влияния на формирование общего пула dNK-клеток, однако приводил к нарушению формирования плаценты [545]. В регуляции дифференцировки и функции отдельных популяций dNK-клеток принимают участие транскрипционные факторы Eomes, Nfil3, Id2, ROR $\gamma$ t, GATA-3 [103, 225].

Таким образом, для NK-клеток матки характерна экспрессия рецепторов CD56, NKp46, NKG2D, NKp30, NKp44 и секреция цитокинов IFN $\gamma$  и TGF $\beta$ . Вне беременности в матке присутствуют NK-клетки эндометрия, после наступления беременности eNK-клетки могут изменять фенотип и дифференцироваться в dNK-клетки. Повышение количества dNK-клеток при беременности может также быть обусловлено миграцией NK-клеток из периферической крови. Гетерогенность популяции dNK-клеток как по поверхностным рецепторам, так и по транскрипционным факторам может быть следствием влияния факторов микроокружения. С естественными киллерами могут контактировать клетки трофобласта, участвующие в формировании плаценты. В зависимости от локализации клетки трофобласта подразделяют на популяции.

### **1.3.3 Взаимодействия NK-клеток децидуальной оболочки и клеток трофобласта**

#### ***1.3.2.1 Фенотип популяций клеток трофобласта***

Для популяции клеток трофобласта показана различная экспрессия молекул локуса MHC-I. Клетки ворсинчатого цитотрофобласта и синцитиотрофобласт не экспрессируют молекулы локуса HLA [591], в то время как для клеток вневорсинчатого трофобласта характерна экспрессия как классических молекул локуса MHC-I (HLA-C), так и неклассических [503]. К

неклассическим формам МНС-I, экспрессируемым клетками трофобласта, относят HLA-G [187], а также HLA-E, HLA-F [263, 324, 485]. За счет альтернативного сплайсинга продукты локусов HLA разнообразны, например, для HLA-G описано семь различных транскриптов, являющихся продуктом сплайсинга 7 экзонов одного гена [187]. Молекулы локуса HLA-G представлены как в мембран-связанной, так и в растворимой форме [256]. Показано, что HLA-E экспрессированы клетками трофобласта, однако преимущественно локализуются в их цитоплазме. Точных сведений о механизмах, согласно которым HLA-E регулирует взаимодействие клеток трофобласта с клетками микроокружения не установлено [304]. В цитоплазме клеток вневорсинчатого трофобласта I триместра выявлены HLA-F, затем в течение II триместра их экспрессия на поверхности клеток возрастает [263, 296, 594].

Посредством экспрессии рецепторов адгезии клетки трофобласта регулируют контактное взаимодействие трофоэктодермы с клетками эпителия матки. Продемонстрировано, что клетки интерстициального трофобласта экспрессируют интегрины  $\alpha\beta1$ ,  $\alpha\beta3/5$  [50, 713]. Клетки цитотрофобласта и синцитиотрофобласт экспрессируют интегрин  $\alpha\beta4$ . Сигнальные каскады, связанные с этим интегрином, могут активировать NF- $\kappa$ B [221]. Описана экспрессия адгезионных рецепторов VE-кадгерина, L-, P-селектинов, PECAM-1, VCAM-1, sialyl-Lewis X клетками интерстициального трофобласта и их участие в обеспечении адгезии к клеткам децидуальной оболочки [50]. Нарушения экспрессии адгезионных рецепторов клетками трофобласта ассоциированы с развитием таких патологий, как вросшая плацента [713], трофобластическая болезнь, преэклампсия [50]. Также клетки трофобласта экспрессируют молекулы плацента-специфического белка PLAC8 (от англ. Placenta specific protein 8 - плацента-специфический белок 8), индуцирующего образование филоподий на переднем крае мигрирующих клеток трофобласта [126]. Клетки цитотрофобласта изменяют экспрессию интегринов по мере дифференцировки. Например, в результате пролиферации цитотрофобласта трофобластических колонок часть клеток утрачивает контакт с базальной мембраной и приобретает инвазивные свойства. Показано, что у вневорсинчатого трофобласта снижается экспрессия  $\alpha\beta4$  с одновременным увеличением экспрессии  $\beta1$  и  $\beta3$  интегринов:  $\alpha5\beta1$ ,  $\alpha4\beta1$  (рецептора фибронектина и VCAM-1),  $\alpha\beta3$  (рецептора белков с RGD-доменом),  $\alpha1\beta1$  (рецептора коллагена и ламинина),  $\alpha\beta1$  (рецептора ламинина) [272]. По-видимому, эти молекулы образуют контакты клеток цитотрофобласта колонок с экстрацеллюлярным матриксом стромы децидуальной оболочки, способствуя инвазии.

На эндovasкулярном трофобласте экспрессированы рецепторы адгезии, характерные для эндотелия, что может способствовать более эффективному ремоделированию спиральных артерий. В их числе - VE-кадгерин [640], PECAM-1, VCAM-1, ICAM-1 [272]. Для клеток эндovasкулярного трофобласта показана экспрессия хемокинового рецептора CCR1

клеток трофобласта лигандами CCR1 - CCL5 приводила к усилению их инвазии [569]. Также клетки эндovasкулярного трофобласта экспрессируют мембран-связанный регулятор комплемента CD59. После обработки клеток трофобласта линии Swan71, экспрессирующих сниженное количество CD59, сывороткой крови человека, содержащей активные компоненты системы комплемента, была повышена гибель клеток вследствие интенсификации сборки мембран-атакующих комплексов на поверхности клеток [666].

Помимо рецепторов адгезии синцитиотрофобласт, а также клетки ворсинчатого цитотрофобласта экспрессируют гликопротеин CD200 и его рецептор начиная с 5 недели беременности [731]. Ингибирование экспрессии CD200 приводит к повышению продукции TNF $\alpha$ , IL-8 и IL-6 клетками трофобласта и снижению продукции IL-10, что свидетельствует о роли гликопротеина в создании специфического микроокружения для поддержания толерантности иммунной системы к клеткам трофобласта [731]. Показано, что синцитиотрофобласт на протяжении I триместра беременности экспрессирует VEGFR-1, рецептор, связывающий гликопротеины семейства VEGF, участвующие в регуляции сосудистой проницаемости и миграции эндотелиальных клеток *in vivo* [570].

Таким образом, клетки трофобласта экспрессируют различные поверхностные рецепторы, определяющие их возможность взаимодействовать с клетками микроокружения и растворимыми факторами. Помимо лиганд-рецепторных взаимодействий, клетки трофобласта могут регулировать функциональное состояние клеток микроокружения, в том числе НК-клеток, за счет секреции растворимых веществ.

### ***1.3.2.2 Секретируемые клетками трофобласта цитокины***

Клетки трофобласта являются одним из источников цитокинов, присутствующих в маточно-плацентарном комплексе. Показано, что клетки трофобласта секретируют хемокины, например, CXCL16 [206]. Продемонстрировано участие этого хемокина в ингибировании продукции GrzB  $\gamma\delta$ T-лимфоцитами децидуальной оболочки, а также повышению устойчивости клеток трофобласта к апоптозу [206]. Также установлено, что сами клетки трофобласта, а также децидуализированные эндометриальные стромальные клетки экспрессируют CXCR6 [445]. В эндометриальных стромальных клетках, обработанных рекомбинантным CXCL16, происходило фосфорилирование PI3K и АКТ, а также установлено повышение концентрации циклина D1 и PDK1 [445]. Предполагают, что лиганд-рецепторное взаимодействие CXCL16-CXCR6 запускает процесс децидуализации эндометрия посредством активации PI3K/PDK1/АКТ/Циклин D1 сигнального пути [445]. Отмечено, что в случае повторяющихся потерь беременности, в матке нарушено лиганд-рецепторное взаимодействие CXCL16-CXCR6 [206, 445].

Для клеток синцитиотрофобласта, цитотрофобласта и внерсинчатого трофобласта показана секреция CXCL12 [268, 573, 722]. В экспериментах с первичным трофобластом III триместра беременности показано, что CXCL12 повышал жизнеспособность клеток трофобласта и их пролиферативную активность [406]. Рецепторы, связывающие этот цитокин - CXCR4 и CXCR7 также экспрессированы на клетках трофобласта [406]. После добавления антител против хемокина CXCL12 и его рецепторов пролиферативная активность клеток трофобласта снижалась, а интенсивность апоптоза возрастала [406].

Синцитиотрофобласт и клетки цитотрофобласта синтезируют IL-8 [317]. Секреция IL-8 клетками ворсинчатого и вневорсинчатого трофобласта возрастает по мере развития беременности [476]. Показано, что IL-8 вызывает повышение секреции клетками трофобласта MMP2 и MMP9 и экспрессии интегринов  $\alpha 5$  и  $\beta 1$ , стимулирует миграцию клеток цитотрофобласта и их инвазию [308]. Установлено, что для клеток вневорсинчатого и ворсинчатого трофобласта также характерна экспрессия GM-CSF [476], который может оказывать влияние на клетки моноцитарно-макрофагального ряда, присутствующие в плаценте. Кроме того, GM-CSF может влиять на клетки трофобласта, показано, что рекомбинантный GM-CSF стимулирует JAK/STAT и MAPK сигнальные пути в клетках трофобласта, а также усиливает секрецию MMP-2 и VEGF клетками трофобласта линий JEG-3 и Swan-71 [233, 431].

Для клеток ворсинчатого и вневорсинчатого трофобласта характерна секреция IL-10 [476]. Также установлена продукция IL-10 синцитиотрофобластом. По мере прогрессирования беременности синтез IL-10 трофобластом снижается [650]. После обработки IL-10 клетки трофобласта содержали меньше мРНК MMP9, а также меньше секретировали MMP9, что приводило к снижению их инвазии [558]. Другим цитокином, влияющим на инвазию клеток трофобласта, является IL-15, показано, что он стимулирует продукцию MMP1 клетками трофобласта линии JEG-3, однако не изменяет продукцию клетками MMP2 и MMP9 [778]. Установлено, что первичные клетки трофобласта, а также клеточные линии JEG-3, JAR, SVneo содержат как мРНК, так и белок IL-15. С помощью иммуногистохимического и иммунофлюоресцентного методов подтверждена продукция IL-15 клетками цито- и синцитиотрофобласта [317] и его секреция [589]. В отношении первичных клеток трофобласта присутствие IL-15 продемонстрировано на протяжении всей беременности [376]. IL-15 повышал пролиферативную активность клеток трофобласта, их инвазию, а также способствовал образованию клетками трофобласта трубкоподобных структур [376]. Продemonстрировано, что IL-15 вызывал фосфорилирование киназ JAK1, JAK3, TYK2 и белка STAT3, что указывает на активацию JAK/STAT сигнального пути в клетках трофобласта [376]. Методом иммуногистохимии установлена экспрессия IL-7 клетками экстравиллезного трофобласта [317]. При гестационном сахарном диабете количество IL-15 в клетках экстравиллезного трофобласта

было повышено, в то время как содержание IL-8 было снижено по сравнению с его уровнем при физиологической беременности в III триместре [317]. Изменений содержания IL-7 выявлено не было [317].

Показана также продукция трофобластом и провоспалительных цитокинов. Так, продукция IL-1 $\beta$  установлена для синцитиотрофобласта в течение всей беременности, в то время как клетки цитотрофобласта секретируют IL-1 $\beta$  только на стадии инвазии [650]. Также клетки вневорсинчатого трофобласта синтезируют RANTES, который повышает экспрессию интегрина  $\beta$ 1 на клетках трофобласта, таким образом стимулируя миграцию и инвазию клеток трофобласта [229]. Также IL-1 $\beta$  может синтезироваться клетками трофобласта на ранних этапах беременности, по мере течения беременности синтез IL-1 $\beta$  снижается. Установлено, что секреция MMP9 клетками трофобласта увеличивается под действием IL-1 $\beta$ , что указывает на роль этого цитокина в регуляции инвазии [385]. В случае инфекции клетки трофобласта могут повышать секрецию провоспалительных цитокинов. Например, после инфицирования *Toxoplasma gondii* клеток трофобласта линии HTR8/SVneo их секреция TNF $\alpha$  возросла в результате активации ERK1/2 и JNK зависимого сигнального пути [743]. Однако по некоторым данным TNF $\alpha$  присутствует в плаценте в норме в отсутствие воспаления, а именно показана секреция этого цитокина клетками ворсинчатого трофобласта III триместра беременности [488]. Продемонстрирована секреция TNF $\alpha$  клетками трофобласта линии JAR. Установлено, что в случае экспрессии Fas клетки линии JAR повышали продукцию TNF $\alpha$ , что косвенно указывает на индуцибельный характер секреции в результате клеточного стресса [352]. Под влиянием TNF $\alpha$  клетки стромы эндометрия в свою очередь начинают секретировать IL-8, MCP-1, IL-17, VEGF, RANTES, которые могут оказывать влияние на клетки трофобласта [748].

Синцитиотрофобласт и клетки вневорсинчатого трофобласта секретируют гетеродимерный цитокин семейства IL-12/IL-6 - IL-27 в течение всей беременности [156]. Рецептор к IL-27 присутствует на естественных киллерах, а также на Т- и В-лимфоцитах, моноцитах/макрофагах, эндотелиальных клетках [519], клетках трофобласта [156]. Под влиянием IL-27 клетки трофобласта линии HTR-8/SVneo продуцируют CXCL10 и IL-6, причем в сочетании влияния IL-27 и TNF $\alpha$  эта секреция возросла [746]. Продемонстрировано подавление миграции и инвазии клеток трофобласта линии HTR-8/SVneo под влиянием IL-27 [242]. При преэклампсии содержание IL-27 в плаценте возросло [746].

Цитокин IL-36 принадлежит к группе провоспалительных цитокинов и имеет три изоформы - IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$  и IL-36 $\gamma$  [182]. Установлено, что у беременных женщин выявлено повышение содержания рецептора к IL-36 - IL-36R $\alpha$  в плазме крови по сравнению с небеременными женщинами [621]. Цитокины IL-36 $\alpha$  и IL-36 $\beta$  стимулируют миграцию клеток трофобласта, а изоформы IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$  и IL-36 $\gamma$  способствуют удлинению трубкоподобных

структур клетками эндотелия, что указывает на участие IL-36 в процессе ангиогенеза [474]. Установлено также, что синтез клетками трофобласта мРНК всех изоформ IL-36 и его рецептора может быть усилен в результате экспозиции LPS [474].

Среди цитокинов, экспрессируемых и секретируемых клетками трофобласта, также присутствует TGF $\beta$  [382, 439, 574]. Продемонстрировано, что TGF $\beta$  аутокринно подавляет пролиферацию и миграцию клеток трофобласта линии HTR-8/SVneo, но не влияет на миграцию и инвазию клеток хорионкарциномы линии JAR [729]. Для клеток вневорсинчатого цитотрофобласта показана экспрессия SMAD белков, что указывает возможность аутокринной стимуляции за счет TGF $\beta$  [382].

В таблице 1.5 представлены данные об адгезионных рецепторах, экспрессированных на поверхности разных популяций клеток трофобласта, секретируемых клетками трофобласта цитокинах и экспрессируемых цитокиновых рецепторах.

Таблица 1.5 - Сравнительная характеристика популяций клеток трофобласта

Популяция клеток трофобласта		Свойства популяции клеток трофобласта		
		Адгезионные рецепторы	Секретируемые цитокины	Цитокиновые рецепторы
1	2	3	4	5
Ворсинчатый трофобласт	Цито-трофобласт	Е-кадгерин, Р-кадгерин [67], VE-кадгерин, $\alpha\beta1$ , $\alpha3\beta1$ , $\alpha6\beta4$ , ICAM-1 [50], CD200, CD200R [731], LIF-R, TRAIL-R [763]	IL-1 $\beta$ , GM-CSF, MCP-1 [476], IGF-2, IL-10, IL-4, VEGF-C, IFN $\gamma$ , SDF-1 [5], IL-9 [639], IL-10 [476]	VEGFR-1, IFN $\gamma$ R1, LIFR, IL-10R, IL-4R, CXCR4, IGF1R [5], IL-9R [639], IL-18R [658], CX3CR1 [269], CCR1 [269]
	Синцитио-трофобласт	Кадгерин-6, кадгерин-11 [67] $\alpha6\beta4$ , Е-кадгерин, Р-кадгерин, VE-кадгерин ICAM-1, Р-селектин, JAM А и JAM В [50], CD200 [731], VEGFR-1 [570]	VEGF-C [5] IL-9 [639], IL-7, IL-8 [317], IL-15 [317, 661], IL-6 [181], CXCL12 [573], CXCL16 [206], IL-1 $\beta$ [650], IL-27 [156]	VEGFR-1, IFN $\gamma$ R1, IFN $\gamma$ R2, LIFR [5] IL-9R [639], CCR1 [269]
Вневорсинчатый трофобласт	Цито-трофобласт колонок	$\alpha1\beta1$ , $\alpha5\beta1$ , $\alpha6\beta4$ , Е-кадгерин, VE-кадгерин, L-селектин [50]	IGF-2, VEGF [5], IL-15 [661], IL-6, IL-8 [140], CXCL12 [268], VEGF-C, CCL5 (RANTES) [269]	CCR1 [269]



Продолжение таблицы 1.5				
1	2	3	4	5
Вневорсинчатый трофобласт	Интерстициальный трофобласт	$\alpha v\beta 1$ , $\alpha v\beta 3/5$ [50], VE-кадгерин, L-, P-селектин, PECAM-1, VCAM-1, sialyl-Lewis X [50]	VEGF-C [5] IL-7, IL-8, IL-15 [317], IL-10 [476], RANTES [229], IL-27 [156], TGF $\beta$ [382]	LIFR [5], CCR3 [269]
	Эндоваскулярный трофобласт	$\alpha v$ , VCAM-1, JAM B [50] VE-кадгерин [640] PECAM-1, VCAM-1, ICAM-1 [272]	IL-8, IL-13, RANTES [476], VEGF-C [5]	LIFR, bFGFR [5], CCR1 [269]

Таким образом, среди цитокинов, секретируемых разными популяциями клеток трофобласта, присутствуют CXCL16, CCL24, CXCL12, IL-8, IL-10, IL-15, TNF $\alpha$ , IL-27, IL-36, TGF $\beta$ . Возможно дистантное взаимодействие популяций клеток трофобласта с NK-клетками, экспрессирующими рецепторы для части этих цитокинов.

### ***1.3.2.3 Влияние цитокинов и участие транскрипционных факторов в регуляции взаимодействия NK-клеток и клеток трофобласта***

Установлено, что экспрессию генов, регулирующих развитие клеток плаценты, в dNK-клетках стимулировали клетки экстравиллезного трофобласта через взаимодействие рецепторов ILT2 NK-клеток и HLA-G трофобласта [225]. Взаимодействие HLA-G с рецепторами KIR2DL4 и LILRB1 приводит к снижению цитотоксичности NK-клеток матки, проявляемой в отношении клеток трофобласта [63]. Связывание HLA-G с KIR2DL4 влияет на секреторную функцию NK-клеток, а именно вызывает повышение синтеза ими IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-6 и IL-8 [538]. Связывание молекул локуса HLA-C клеток трофобласта с ингибиторными KIR подавляет дегрануляцию NK-клеток и уменьшает секрецию последними IL-8, VEGF, PLGF, CXCL10 [526]. Однако связывание HLA-C с активационными рецепторами KIR2DS1 и KIR2DS4 NK-клеток стимулирует синтез NK-клетками GM-CSF и TNF $\alpha$  [526]. Экспрессированные на поверхности клеток трофобласта HLA-E могут связываться как с NKG2A, так и NKG2C [685], что обеспечивает регуляцию функции NK-клеток.

Клетки трофобласта могут взаимодействовать с NK-клетками за счет секретируемых хемокинов [40]. Например, для NK-клеток, как и для клеток трофобласта, характерна секреция CXCL12 [268, 573, 722, 756]. За счет секреции CXCL12 клетки трофобласта стимулируют адгезию dNK-клеток к стромальным децидуальным клеткам [405]. Рецепторы к CXCL16,

секретируемому клетками трофобласта [268], выявлены в небольшом количестве на НК-клетках, а также представлены на макрофагах [705]. В присутствии макрофагов, обработанных рекомбинантным CXCL16, цитотоксичность НК-клеток, полученных из периферической крови, была снижена. Установлено, что CXCL16 вызывает снижение экспрессии IL-15 макрофагами, что с свою очередь влияет на НК-клетки [705]. Как клетки трофобласта, так и НК-клетки синтезируют IL-8 [168], а также экспрессируют рецепторы к IL-8 [142, 168]. Снижение экспрессии IL-8 и его рецепторов в децидуальной оболочке коррелирует с повторяющимися выкидышами [524].

Продуцируемый НК-клетками IFN $\gamma$  подавляет инвазию клеток трофобласта, снижая продукцию MMP2, а также вызывая апоптоз клеток трофобласта [355]. За счет секреции TNF $\alpha$  НК-клетки стимулируют секрецию трофобластом MMP9, таким образом стимулируя его инвазию [381]. Клетки вневорсинчатого трофобласта и НК-клетки синтезируют RANTES [229, 267], его рецептор CCR5 присутствует на клетках трофобласта [421], и на НК-клетках [712]. На ранних этапах беременности dNK-клетки могут секретировать IL-1 $\beta$  [564], в то время как клетки трофобласта экспрессируют IL-1R1 [535]. Этот цитокин, предположительно, задействован в положительной регуляции миграции клеток трофобласта [535]. Клетки трофобласта и НК-клетки секретируют IL-10 [144, 557] и его рецептор IL-10R [558, 773]. Совместно с IL-18 IL-10 вызывает усиление цитотоксичности НК-клеток, их пролиферации и синтеза IFN $\gamma$  [109]. IL-10 повышает экспрессию HLA-G клетками трофобласта [466], снижая их продукцию MMP9, что в свою очередь ингибирует их инвазию [558].

В экспериментах с использованием мышей показано, что IL-15 является необходимым цитокином для дифференцировки НК-клеток матки [73]. Транскрипционный фактор IRF-1 (IFN-regulatory factor) связывается с промоторной областью гена *IL-15* [492]. IRF-2 рассматривают как функциональный антагонист IRF-1 [400]. В экспериментах на модельных животных показано, что у *Irf-1*  $-/-$  мышей дифференцировка dNK-клеток нарушена [73]. В то же время по другим данным нокаут гена *Irf-2* не оказывал значительного влияния на формирование пула dNK-клеток [73, 545]. Эти результаты указывают на участие фактора IRF-1 в формировании пула dNK-клеток в ответ на IL-15.

Как упоминалось ранее, в присутствии IL-15 НК-клетки линии NK-92 экспрессируют T-bet и Eomes, причем экспрессия этих транскрипционных факторов сохраняется по мере увеличения времени экспозиции с IL-15 [506]. Показано, что в НК-клетках матки у мышей экспрессия Eomes значительно превосходит экспрессию T-bet [651]. Однако, у мышей с дефектом T-bet не наблюдалось нарушения имплантации и ремоделирования спиральных артерий [651]. Данные результаты указывают на превалирующую роль транскрипционного фактора Eomes в дифференцировке НК-клеток матки [651]. В то же время экспрессия T-bet и

*Eomes* возрастала по мере увеличения срока гестации, однако до определенного уровня, а затем снижалась [651]. В экспериментах с использованием клеток линий NK-92 и Sw.71 установлено, что после культивирования NK-клеток в присутствии кондиционированных сред клеток трофобласта была снижена экспрессия транскрипционных факторов T-bet и *Eomes* в NK-клетках, а также содержание мРНК перфорина и GrzB [506]. Сходные результаты были получены при использовании первичных клеток трофобласта и dNK-клеток: в присутствии трофобласта в NK-клетках снижена экспрессия T-bet и Helios, а также снижена продукция TNF $\alpha$  [227]. Данные изменения могут быть связаны с тем, что клетки трофобласта, инвазирующие в стенку матки, регулируют дифференцировку NK-клеток.

Цитокин IL-15 активирует пролиферацию NK-клеток и запускает сигнальный путь MAPK, включающий активацию митоген-ассоциированных протеинкиназ - ERK и JNK [506]. Однако, показано, что предварительно прокультивированные в присутствии IL-15 клетки линии NK-92 в результате культивирования со средами клеток трофобласта линии Sw.71, содержали сниженное по сравнению с контролем количество фосфорилированных форм ERK и JNK [506]. Также показано ингибирование фосфорилирования STAT5 и снижение продукции перфорина, GrzB и IFN $\gamma$  клетками линии NK-92 после культивирования в кондиционированных средах клеток трофобласта [506]. При добавлении коллагена, синтезированного первичной сокультурой клеток трофобласта и децидуальных стромальных клеток, к dNK-клеткам *in vitro* наблюдалось снижение количества pSTAT1 и pSTAT4, что может отражать подавление сигнального пути JAK-STAT [227]. Нарушение блокировки данного сигнального пути в dNK-клетках может приводить к повышенной продукции NK-клетками IFN $\gamma$ , что в свою очередь может способствовать невынашиванию беременности.

Как клетки трофобласта, так и NK-клетки синтезируют TGF $\beta$  [305, 382]. По некоторым данным TGF $\beta$  снижает цитотоксичность NK-клеток [202]. В отношении клеток трофобласта представлены противоречивые данные, описано, что TGF $\beta$  может как снижать продукцию MMP9 [354], так и повышать ее уровень [290]. У мышей с нокаутом гена *Alk5*, кодирующего один из рецепторов к TGF $\beta$ , значительно снижено количество NK-клеток матки [514]. Ген *Alk5* участвует в передаче сигнала от рецептора TGF $\beta$  на белки SMAD2/3. У мышей с нокаутом гена *Alk5* NK-клетки матки в меньшей степени экспрессировали гены, кодирующие Grz (A, B, D, E, F, G), а также гены рецепторов к другим цитокинам [514]. Отметим, что в экспериментах с мышами нельзя отрицать «выключение» того же гена в других клетках микроокружения, что также может вносить изменения в процесс дифференцировки NK-клеток матки. Для клеток трофобласта показана экспрессия HLA-E [324]. Соответственно, клетки трофобласта могут не только регулировать экспрессию NK-клетками транскрипционных факторов терминальных

стадий дифференцировки, но и ингибировать цитотоксическую функцию NK-клеток, подавляя проведение сигнала с участием STAT белков и киназы ERK.

Клетки трофобласта и NK-клетки могут взаимодействовать за счет ростовых факторов. Так, показана экспрессия GM-CSF клетками вневорсинчатого и ворсинчатого трофобласта, а также dNK-клетками [476, 564]. Рецептор GM-CSF выявлен на клетках трофобласта [307]. Показано, что под влиянием GM-CSF в клетках трофобласта линий JEG-3 и Sw.71, усиливается активность MMP2 и секреция VEGF [233, 431]. Децидуальные NK-клетки секретируют VEGF [756], а клетки синцитиотрофобласта на протяжении I триместра беременности экспрессируют VEGFR-1. Ростовый фактор VEGF регулирует формирование сосудов на границе маточно-плацентарного контакта [756]. Продемонстрировано успешное встраивание трофобласта в экспериментальную модель сосуда - трубкоподобные структуры, образованные эндотелиальными клетками [54]. При ПНБ экспрессия его рецепторов клетками трофобласта снижена [570].

Таким образом, NK-клетки и клетки трофобласта могут взаимодействовать за счет экспрессируемых ими рецепторов к цитокинам и хемокинам, а также рецепторов естественных киллеров, связывающих классические и неклассические молекулы HLA клеток трофобласта. Представляет интерес дистантное взаимодействие NK-клеток с клетками трофобласта за счет образуемых микровезикул.

#### ***1.3.2.4 Участие микровезикул в регуляции взаимодействия NK-клеток и клеток трофобласта***

Мембранные микровезикулы (МВ) клеточного происхождения представляют собой везикулярные фрагменты плазматической мембраны. В отличие от экзосом, размер которых составляет менее 100 нм, диаметр МВ находится в диапазоне 100-1000 нм [262, 677, 678]. Часто используют более общий термин «экстраклеточные везикулы», объединяя везикулы разного размера. Механизмы формирования экзосом и МВ различны: экзосомы формируются с участием мультивезикулярных телец клеток, тогда как МВ образуются за счет выпячивания и последующего контролируемого отщепления плазматической мембраны [155, 681]. В связи с разными механизмами образования представляется важным четкое разделение этих клеточных продуктов.

Установлено, что МВ образуются клетками как в отсутствие стимуляции, так и в результате активации; как при физиологических процессах, так и при патологиях [467, 469, 500, 556, 599, 659, 677]. Предполагают, что в межклеточной коммуникации могут участвовать МВ, так как наряду с мембранными молекулами, экспрессируемыми клеткой-источником, они

содержат цитоплазматические молекулы: липиды, молекулы локусов МНС I и II классов, цитокины, транскрипционные факторы, микроРНК [113, 262, 441], матричную РНК [441]. Показано, что МВ участвуют в регуляции функций клеток-мишеней, вовлечены в процессы гемокоагуляции [659, 677], воспаления [71, 673], иммунного ответа [653], неогенеза [113, 371, 472], канцерогенеза [86, 143, 533]. Выявление МВ в биологических жидкостях возможно с помощью нескольких методов: трансмиссионной электронной микроскопии [678], определения изменений сопротивления потока через микропоры (от англ. Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS)) [678, 732], атомно-силовой микроскопии [614], проточной цитофлюориметрии [678]. В сравнении с прочими методами детекции МВ проточная цитофлюориметрия является наиболее применимой, так как позволяет получать данные о концентрации МВ в биологической жидкости, например, периферической крови, а также определять рецепторы, представленные на их поверхности [678, 732].

Предполагают, что передача сигнала от клетки к клетке возможна в том числе с помощью МВ, что делает возможным участие МВ в реализации дистантного межклеточного взаимодействия. В периферической крови в отсутствие воспаления присутствуют МВ, количество МВ и состав мембранных рецепторов может меняться при патологиях [556]. Например, клетки линии ТНР-1 изменяют экспрессию адгезионных рецепторов на своей мембране под воздействием МВ плазмы периферической крови [614]. Отмечено, что МВ плазмы периферической крови, полученные от здоровых беременных женщин, вызывали повышение экспрессии рецепторов CD54, CD18 и интегрин  $\beta 7$  клетками линии ТНР-1, в то время как МВ плазмы пациенток с преэклампсией вызывали изменение экспрессии рецепторов к TNF $\alpha$  клетками линии ТНР-1 [614]. В другой работе установлено, что МВ, полученные из плацент здоровых беременных женщин после родов и предположительно имеющие синцитиотрофобластическое происхождение, вызывали повышение транскрипции TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-12, IL-8, TGF $\beta$  по сравнению с МВ, полученными из плацент пациенток с преэклампсией [75]. Образованные клетками трофобласта МВ содержали HLA-E, причем у пациенток с ПНБ содержание таких МВ было ниже, чем у пациенток с физиологической беременностью на сроке 6-8 недель [304]. После обработки dNK-клеток трофобластическими МВ, полученными от женщин с ПНБ, установлено снижение секреции NK-клетками IFN $\gamma$  и VEGF $\alpha$ , важных для перестройки спиральных артерий матки [304]. Установлено, что этот эффект МВ опосредован фосфорилированием mTORC1 в dNK-клетках [304]. В составе своей мембраны МВ могут содержать лиганды для рецепторов NK-клеток, например, МВ с MICA после краткосрочной инкубации в течение 1 часа с NK-клетками стимулируют их активацию через фосфорилирование ERK [696]. Однако пролонгированное влияние MICA-МВ в течение 24 часов приводит к подавлению цитотоксической активности NK-клеток [696].

В плазме периферической крови присутствуют МВ лейкоцитарного происхождения с различным фенотипом, в том числе с фенотипом CD56+, [139, 392, 454, 457]. Показано, что клетки линии NK3.3 образуют МВ, и что эти МВ содержат адгезионные рецепторы ICAM-1 и VCAM-1, перфорин, GrzA и GrzB [147]. Предполагают, что МВ могут обладать противоопухолевой активностью, вызывая апоптоз малигнизированных клеток и ингибируя их пролиферацию. Так, после обработки МВ, образованными НК-клетками, клеток линии K-562 в последних возрастало содержание каспазы 3 [147]. В зависимости от цитокинового микроокружения МВ НК-клеток могут отличаться по своим характеристикам: так, после воздействия IL-15 клетки линии NK-92MI формируют везикулы, демонстрирующие большую цитотоксичность в отношении опухолевых клеток глиобластомы (линия U87/MG/F), рака молочной железы (MDA-MB-231/F) и рака щитовидной железы (CAL-62/F), чем МВ от интактных НК-клеток [774]. Описано содержание перфорина и GrzA в МВ рНК-клеток здоровых доноров, а также присутствие на их поверхности цитотоксических рецепторов, в том числе FasL [719]. Таким образом, МВ могут принимать участие в регуляции межклеточных взаимодействий, однако участие МВ НК-клеток в развитии беременности однозначно не определено.

В целом необходимо отметить, что НК-клетки присутствуют в матке как вне, так и во время беременности. В отличие от рНК-клеток для этой популяции естественных киллеров характерна измененная экспрессия фенотипического маркера CD56, а также отдельных рецепторов, определяющих цитотоксичность. Источник пула НК-клеток матки однозначно не установлен, предполагают участие в этом процессе как НК-клеток, мигрирующих из периферической крови, так и дифференцировку клеток *in situ*. С естественными киллерами в матке могут взаимодействовать клетки трофобласта, в зависимости от локализации экспрессия поверхностных рецепторов и секреция гуморальных факторов клетками трофобласта различается. За счет секретируемых цитокинов и экспрессии рецепторов, а также возможности образования МВ, НК-клетки матки могут влиять на отдельные популяции клеток трофобласта. В литературе представлены разрозненные данные о характере взаимодействия НК-клеток и клеток трофобласта, отсутствует комплексное рассмотрение взаимной регуляции этих популяций клеток. Нарушение этих взаимодействий может быть ассоциировано с развитием патологии.

#### **1.3.4 Роль НК-клеток в патогенезе привычного невынашивания беременности**

Невынашивание беременности представляет актуальную проблему акушерства, так как частота встречаемости данной патологии составляет 10 - 25% от всех беременностей [11, 13].

При распределении вероятности возникновения невынашивания беременности по срокам беременности наибольшая частота приходится на I триместр (50-70%), во втором триместре - 18-20%, в третьем - 7-30% [13]. Привычное невынашивание беременности составляет до 25% от всех случаев невынашивания и определяется как наличие спонтанных аборт в I триместре беременности [4, 11-13, 57, 199]. К причинам развития ПНБ относят анатомические дефекты строения матки, хронические воспалительные заболевания урогенитального тракта, иммунные факторы, эндокринные нарушения, генетические факторы, влияние психоэмоционального состояния женщины, влияние окружающей среды, антифосфолипидный синдром, наследственная тромбофилия [35, 37, 199, 435]. В настоящее время особое внимание уделяют изучению вклада NK-клеток в нарушения регуляции развития плаценты при ПНБ [4]. С этой целью оценивают как количество NK-клеток в периферической крови и эндометрии, так и их функциональные характеристики, в том числе экспрессию рецепторов и секрецию цитокинов [18]. Однозначно не установлено изменения общего содержания NK-клеток в периферической крови при ПНБ: описано как повышенное [349], так и сниженное их содержание [24, 34]. Кроме того, ПНБ ассоциировано со сниженным соотношением CD56<sup>bright</sup> pNK-клеток к CD56<sup>low</sup> NK-клеткам [349]. Экспрессия pNK-клетками CD69, CD94, CD161 повышена у пациенток с ПНБ по сравнению с группой фертильных женщин [243]. По другим данным экспрессия CD69 NK-клетками значимо не изменялась у пациенток с ПНБ [22, 23]. Установлена повышенная цитотоксичность pNK-клеток у пациенток с ПНБ в течение 24 часов после прерывания беременности по сравнению со здоровыми беременными женщинами [264]. В децидуальной оболочке при ПНБ количество NK-клеток повышено [29, 502, 582], а экспрессия dNK-клетками рецепторов KIR2DL1/S1 снижена [703]. При анализе abortивного материала от неразвивающейся беременности была установлена сниженная экспрессия HLA-G клетками трофобласта по сравнению с нормально протекающей беременностью [10]. Эти изменения могут влиять на способность NK-клеток связывать молекулы локуса HLA-C и HLA-G и приводить к снижению индукции толерантности NK-клеток в отношении клеток трофобласта. Кроме того, показано, что количество CD56<sup>bright</sup> CXCR4<sup>+</sup> dNK-клеток, мигрирующих из периферической крови, а также синтез ими цитокинов снижены при ПНБ [648], что указывает на функциональную несостоятельность dNK-клеток при этой патологии.

Количество CD16<sup>+</sup>/CD56<sup>dim</sup> NK-клеток как в периферической крови, так и в эндометрии повышено, а количество CD16<sup>-</sup>/CD56<sup>bright</sup> снижено при ПНБ по сравнению с физиологической беременностью [230]. У женщин с ПНБ dNK-клетки также обладают повышенной экспрессией Toll-like рецепторов 3 типа [78] и гранулизина [475], с чем также связывают повышенную цитотоксическую активность NK-клеток. В децидуальной оболочке при ПНБ по сравнению с

физиологической беременностью снижено количество NK-клеток, секретирующих TGF $\beta$  [281], что может также влиять на развитие плаценты и способствовать развитию патологии.

Предпринимаются попытки разработать методы диагностики и определения рисков развития невынашивания беременности на основе оценки изменений функциональной активности NK-клеток [652]. Существует два подхода к получению биологического материала для исследования NK-клеток при невынашивании беременности: наименее инвазивным способом является забор у пациенток периферической крови с последующим выделением из нее NK-клеток; другим источником NK-клеток является материал биопсии эндометрия. В целом, функциональное состояние NK-клеток матки зависит от степени активации pNK-клеток [504, 652]. Для диагностических целей более предпочтительно использование периферической крови, так как получение биологического материала в этом случае менее инвазивно по сравнению с получением биоптата эндометрия. Кроме того, получение периферической крови возможно как вне, так и во время беременности. Проведение биопсии возможно только в отсутствие беременности и позволяет получить локальную пробу ткани, выделение из которой клеток представляет сложность [645].

В настоящее время для определения цитотоксичности NK-клеток в качестве клеточных мишеней используют линейные клетки хронической миелоидной лейкемии K-562. Применяют разные подходы к мечению клеток-мишеней: обработка флуоресцентными красителями [561, 655], трансфекция плазмидой, содержащей ген зеленого флуоресцентного белка [312] и другие [313]. Все описанные методы позволяют оценивать цитотоксическую активность NK-клеток, однако не позволяют моделировать взаимодействия с клетками трофобласта, которые являются вероятными мишенями для естественных киллеров в децидуальной оболочке при беременности. В настоящее время однозначно определить роль NK-клеток в патогенезе ПНБ не удается.

Суммируя описанные данные, необходимо отметить, что естественные киллеры сохраняют за собой место лимфоцитов врожденного иммунитета, способных за счет разнообразных механизмов цитотоксической активности вызывать гибель трансформированных клеток. В целом, для NK-клеток характерен фенотип CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup>, по интенсивности экспрессии CD56, наличию и интенсивности экспрессии CD16 выделяют субпопуляции естественных киллеров. Созревание NK-клеток также связано с приобретением рецепторов адгезии, позволяющих формировать стабильный контакт с потенциальными клетками-мишенями, а также цитокиновых рецепторов и рецепторов, определяющих цитотоксическую активность. За счет экспрессии рецепторов ко многим хемокинам и про- и противовоспалительным цитокинам NK-клетки могут подвергаться влиянию гуморального микроокружения. В тканях NK-клетки контактируют с клетками микроокружения, что также может изменять их фенотипические и функциональные характеристики. Одной из популяций



естественных киллеров являются dNK-клетки, содержание которых изменяется в зависимости от стадии менструального цикла, беременности и наличия репродуктивной патологии. Клетки трофобласта представляют собой гетерогенную популяцию клеток плодного происхождения. Функциональная активность клеток трофобласта, включающая инвазию в эндометрий и стенки спиральных артерий, и секрецию цитокинов, регулирует развитие структуры плаценты. Близкая локализация NK-клеток и клеток инвазивного трофобласта в децидуальной оболочке определяет их возможное взаимодействие. Механизм формирования пула dNK-клеток в настоящее время четко не определен, предполагают как возможность миграции NK-клеток из периферической крови, так и пролиферацию и дифференцировку непосредственно в ткани. Клетки трофобласта могут влиять как на миграцию NK-клеток из периферической крови, так и на их функциональную активность в децидуальной оболочке. Развитие такой репродуктивной патологии, как ПНБ, ассоциировано с повышением количества NK-клеток в децидуальной оболочке, однако исследования функциональной активности NK-клеток при ПНБ противоречивы. Возможно, изменения во взаимной регуляции NK-клеток и клеток трофобласта способствуют клинической манифестации этой патологии. Отсутствие в литературе комплексного описания взаимодействия NK-клеток и клеток трофобласта и актуальность исследования роли NK-клеток в развитии физиологической беременности и патогенезе ПНБ определило цель настоящего исследования, для реализации которой проведена оценка адгезии, миграции, пролиферации и дифференцировки естественных киллеров, а также оценен характер влияния NK-клеток на клетки трофобласта в присутствии растворимых факторов, секретируемых клетками плаценты.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Материалы

#### 2.1.1 Клеточные культуры

В работе использовали клетки линии NK-92 (ATCC, США). Оригинальная линия NK-92 была получена Dr. Gong J.H. (Институт онкологии им. Раш, США) из периферической крови мужчины, страдающего злокачественной неходжкинской лимфомой [250]. Клетки линии NK-92 воспроизводят все основные морфологические, фенотипические, функциональные характеристики клеток естественных киллеров [250, 266, 270, 332, 537]. Для культивирования клеток линии NK-92 использовали минимальную среду Игла  $\alpha$ -модификации (от англ. Minimum Essential Medium Eagle - alpha modification,  $\alpha$ -MEM) с добавлением 12,5% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) 12,5% инактивированной лошадиной сыворотки (Биолот, Россия), 0,2 мМ мио-инозитола, 0,02 мМ фолиевой кислоты, 2 мМ L-глутамина, 100 мкг/мл стрептомицина, 100 ЕД/мл пенициллина, 20 мМ буфера HEPES, 0,1 мМ меркаптоэтанол (Sigma, США) (далее - полная среда  $\alpha$ -MEM). Также в среду добавляли 500 Ед/мл IL-2 («Ронколейкин», Россия) в качестве ростового фактора. Клетки линии NK-92 - суспензионная культура, требующая пересева 1 раз в 1-2 дня.

Использовали клетки линии JEG-3 (ATCC, США). Клетки этой линии имеют эпителиальную морфологию и были получены Dr. Peter Kohler (Национальный институт здоровья ребенка и развития человека (NICHD), США) путем многократного пассирования клеток хориокарциномы человека в защечных мешках золотистых сирийских хомячков [330]. Клетки линии JEG-3 воспроизводят морфологические, фенотипические и функциональные характеристики инвазивного трофобласта I триместра беременности [53, 195, 270, 330, 447, 515, 527]. Клетки культивировали в модифицированной базовой среде Игла (от англ. Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM), содержащей 10% ЭТС (Биолот, Россия), 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамина, 1% раствора заменимых аминокислот, 1 мМ пирувата натрия (Sigma, США). (далее - полная среда DMEM). Клеточная линия JEG-3 является адгезионной, пересев осуществляется каждые 3-4 дня, по мере формирования клетками монослоя, занимающего 70-80% площади флакона для культивирования. Дезинтеграцию монослоя клеток осуществляли растворами версена и трипсина (Биолот, Россия), смешанных в соотношении 1:1.

В работе также использовали клетки линии K-562 (ATCC, США), являющиеся лимфобластами, изолированными из красного костного мозга мужчины с хронической миелогенной лейкемией. Эта клеточная линия применяется в исследованиях цитотоксической активности NK-клеток *in vitro* в качестве стандартных клеток-мишеней. Клетки линии K-562

культивировали в среде RPMI-1640 (от англ. Roswell Park Memorial Institute medium), с добавлением 10% ЭТС, 2 мМ L-глутамин (Sigma, США), 50 мкМ/мл гентамицина (Дальхимфарм, Россия). Клеточная линия К-562 является суспензионной культурой, пересев осуществляют 1 раз в два дня.

Клетки культивировали при 37°C во влажной атмосфере с 5% содержанием CO<sub>2</sub>. При помощи раствора трипанового синего (Sigma, США) оценивали жизнеспособность клеток при культивировании и в экспериментах, она составляла не менее 96%.

### 2.1.2 Пациенты

Обследовано 492 человека, в том числе 477 женщин, а также 15 здоровых мужчин (группа VI). Все обследованные принадлежали к европеоидной расе, проживали в Северо-Западной части России, находились в репродуктивном возрасте (19 - 39 лет). Пациентки, включенные в исследование, были обследованы врачами на базе ФГБНУ «НИИ АГиР им.Д.О.Отта» (научно-поликлиническое отделение, отделение патологии беременности или отделение вспомогательных репродуктивных технологий в зависимости от диагноза), на базе Санкт-Петербургского научно-практического центра профилактики, диагностики и лечения невынашивания беременности при СПб ГБУЗ «Родильный дом № 1» или на базе гинекологического отделения СПб ГБУЗ «Городская больница № 26». Автор выражает благодарность за помощь в сборе групп пациенток зав.отд. гинекологии СПб ГБУЗ «Городская больница № 26» к.м.н. Беликовой М.Е., врачу акушеру-гинекологу СПб ГБУЗ «Родильный дом № 1» к.м.н. Агнаевой А.А., врачу акушеру-гинекологу Загайновой В.А. ФГБНУ «НИИАГ им.Д.О.Отта», заместителю директора ФГБНУ «НИИАГ им.Д.О.Отта» по научной работе д.м.н. Беспаловой О.Н., директору ФГБНУ «НИИАГ им.Д.О.Отта» член-корр. РАН, д.м.н., проф. Когану И.Ю.

Возраст небеременных женщин колебался от 19 до 28 лет и в среднем составил  $23,3 \pm 2,1$  лет. Возраст беременных женщин находился в диапазоне от 22 до 39 лет и в среднем составил  $31 \pm 4,3$  лет. Группы небеременных женщин были составлены из здоровых добровольцев. У всех включенных в исследование пациентов и добровольцев отсутствовали клинические и лабораторные признаки острых инфекционных заболеваний. При обследовании небеременных женщин учитывали день менструального цикла. У небеременных женщин во второй фазе цикла оценивали концентрацию прогестерона в сыворотке крови, она составила  $13,0 \{3,7; 16,7\}$  нг/мл. Эти значения находятся в рамках референсных значений, предоставленных производителем набора ГК «Алкор Био» (Россия) для женщин в лютеиновой фазе цикла ( $3,1-27,9$  нг/мл,  $10-89$  нмоль/л), в связи с чем цикл обследованных считали овуляторным. У обследованных женщин

во второй фазе цикла овуляцию подтверждали врачи ФГБНУ «НИИ АГиР им.Д.О.Отта» при помощи ультразвуковой фолликулометрии. Периферическую кровь получали натошак венепункцией локтевой вены и собирали в вакуумную пробирку с антикоагулянтом гепарин (Vacuette; Greiner Bio-One, Austria).

При формировании групп были также учтены следующие критерии включения:

Группа I-a: небеременные женщины в пролиферативной фазе менструального цикла

- Регулярный менструальный цикл, 4 - 9 день цикла,
- Отсутствие беременности в анамнезе,
- Неотягощенный акушерско-гинекологический и соматический анамнез.

Группа I-b: небеременные женщины в секреторной фазе менструального цикла

- Регулярный менструальный цикл, 17 - 23 день цикла,
- УЗИ-контроль прохождения овуляции или концентрация прогестерона в крови от 3,1 до 27,9 нг/мл,
- Отсутствие беременности в анамнезе,
- Неотягощенный акушерско-гинекологический и соматический анамнез.

Группа II-a: небеременные фертильные женщины в пролиферативной фазе менструального цикла

- Регулярный менструальный цикл, 4 - 9 день цикла,
- Наличие в прошлом беременностей, закончившихся родами в срок (естественные роды или кесарево сечение),
- Отсутствие неразвивающейся беременности и/или самопроизвольного выкидыша в анамнезе.

Группа II-b: небеременные фертильные женщины в секреторной фазе менструального цикла

- Регулярный менструальный цикл, 17 - 23 день цикла,
- УЗИ-контроль прохождения овуляции или концентрация прогестерона в крови от 3,1 до 27,9 нг/мл,
- Наличие в прошлом беременностей, закончившихся родами в срок (естественные роды или кесарево сечение),
- Отсутствие неразвивающейся беременности и/или самопроизвольного выкидыша в анамнезе.

Группа III-a: женщины с физиологическим течением беременности в I триместре

- Регулярный менструальный цикл до беременности,
- Наличие в прошлом беременностей, закончившихся родами в срок (естественные или кесарево сечение),
- Для исследований периферической крови: настоящая беременность на сроке 6-7 недель,

- Для исследований плацентарных гуморальных факторов: физиологическая беременность на сроке 9-11 недель, электроивный искусственный аборт в стационаре.

Группа III-b: женщины с физиологическим течением беременности в III триместре

- Регулярный менструальный цикл до беременности,
- Наличие в прошлом беременностей, закончившихся родами в срок (естественные роды или кесарево сечение),
- Для исследований периферической крови: настоящая беременность, на сроке 38-39 недель,
- Для исследований плацентарных гуморальных факторов: физиологическая беременность на сроке 38-39 недель, кесарево сечение.

Группа IV-a: небеременные женщины с ПНБ в пролиферативной фазе менструального цикла

- Регулярный менструальный цикл, 4 - 9 день цикла,
- Две и более потери беременности на сроке до 12 недель,
- Нормальный кариотип супругов,
- Отсутствие настоящей беременности.

Группа IV-b: небеременные женщины с ПНБ в секреторной фазе менструального цикла

- Регулярный менструальный цикл, 17 - 23 день цикла,
- УЗИ-контроль прохождения овуляции или концентрация прогестерона в крови от 3,1 до 27,9 нг/мл,
- Две и более потери беременности на сроке до 12 недель,
- Нормальный кариотип супругов,
- Отсутствие настоящей беременности.

Группа V: беременные женщины с ПНБ в анамнезе

- Регулярный менструальный цикл до беременности,
- Две и более потери беременности на сроке до 12 недель в анамнезе,
- Нормальный кариотип супругов,
- Беременность на момент исследования на сроке до 12 недель.

Исследование было проспективным, выполнено согласно Коду Медицинской Этики Всемирной Медицинской Ассоциации (Хельсинская Декларация). План исследования одобрен Этическим Комитетом ФГБНУ «НИИ АГ им.Д.О.Отта» (выписка из протокола №107 от 15.03.2021). У пациенток, вошедших в исследование, получено информированное согласие на обследование.

Параметрами исключения для всех групп являлись сахарный диабет I и II типа, а также инсулинотерапия гестационного сахарного диабета у беременных женщин, воспалительные

заболевания органов малого таза, острые или обострение хронических инфекционных заболеваний, гипертензия или другие сердечно-сосудистые заболевания, отказ от участия в исследовании. Для всех групп женщин параметрами исключения из исследования также являлись миома матки (FIGO 0,1,2,3), НГЭ III-IV степени, программа экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) с использованием донорских ооцитов, верифицированный антифосфолипидный синдром, системные аутоиммунные заболевания, аномалии развития половых органов, прием гормональных препаратов, в том числе гормональная контрацепция. Количество обследованных на каждом из этапов работы пациенток представлено в таблице 2.1.

### **2.1.3 Мононуклеары периферической крови**

Мононуклеары периферической крови выделяли стерильно стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности  $\rho=1,077$  (Histopaque®-1077, Sigma, США) по методике А. Воум. С помощью обработки раствором пропидий иодида оценивали долю жизнеспособных мононуклеарных клеток после выделения на градиенте плотности. Количество жизнеспособных клеток составило 97,6%.

### **2.1.4 Получение НК-клеток из мононуклеарной фракции периферической крови**

С помощью проточного сортировщика клеток FacsAriaIII (BD, США) из состава мононуклеаров периферической крови стерильно выделяли популяцию НК-клеток, используя антитела к CD45, CD3, CD56 (BD, США). Сортировку НК-клеток проводили через сопло диаметром 85 мкм, по фенотипу CD45+CD3-CD56+ (Рисунок 2.1), применяя протокол Purity. Для сортировки клеток на основании измерения пробы, обработанной изотипическим контролем (Isotype), устанавливали границы флюоресценции (Рисунок 2.1). На основании измерения пробы, обработанной антителами, выделяли целевые клетки для сортировки (Presort). Каждое выделение НК-клеток на сортере сопровождалось оценкой чистоты полученной клеточной суспензии (Postsort). Чистота выделения во всех случаях составляла не менее 99%. Долю жизнеспособных НК-клеток после выделения на сортировщике оценивали с помощью обработки клеток раствором 7-амино-актиномицина D (7AAD, Biolegend, США) и она составляла 89-95%. Отсортированные на проточном сортировщике из фракции мононуклеаров НК-клетки далее обозначены как spNK-клетки (от англ. sorted pNK cells).

Таблица 2.1 - Количество обследованных человек

Этап работы	Биологический материал участников исследования соответствующих групп	Количество человек
1	2	3
Оценка функции адгезии и трансмиграции клеток линии НК-92 через клетки трофобласта линии JEG-3, и определение изменений экспрессии поверхностных рецепторов НК-клетками и клетками трофобласта в присутствии кондиционированных сред (КС) ворсин хориона I и III триместров беременности	КС ворсин хориона здоровых женщин в I триместре беременности (группа III-a)	n = 27
	КС ворсин хориона здоровых женщин в III триместре беременности (группа III-b)	n = 28
Оценка экспрессии дифференцировочных рецепторов клетками линии НК-92 при совместном культивировании с клетками трофобласта линии JEG-3 в присутствии КС ворсин хориона I и III триместров беременности	КС ворсин хориона здоровых женщин в I триместре беременности (группа III-a)	n=15
	КС ворсин хориона здоровых женщин в III триместре беременности (группа III-b)	n=15
Оценка экспрессии дифференцировочных рецепторов рНК-клетками здоровых небеременных женщин в секреторной фазе цикла после совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3	Периферическая кровь здоровых небеременных женщин в секреторной фазе цикла (группа I-b)	n=21
Оценка пролиферативной активности рНК-клеток здоровых небеременных и беременных женщин в составе моноклеарной фракции и изолированно из нее, в присутствии клеток трофобласта	Периферическая кровь здоровых небеременных женщин в пролиферативной фазе цикла (группа I-a)	n=20
	Периферическая кровь здоровых небеременных женщин в секреторной фазе цикла (группа I-b)	n=19
	Периферическая кровь здоровых женщин в I триместре беременности (группа III-a)	n=20 *

Продолжение таблицы 2.1		
1	2	3
Оценка пролиферативной активности рНК-клеток в составе моноклеарной фракции при ПНБ, в присутствии клеток трофобласта	Периферическая кровь здоровых небеременных фертильных женщин в пролиферативной фазе цикла (группа II-a)	n=11
	Периферическая кровь здоровых небеременных фертильных женщин в секреторной фазе цикла (группа II-b)	n=13
	Периферическая кровь здоровых женщин в I триместре беременности (группа III-a)	n=20 *
	Периферическая кровь небеременных женщин с ПНБ в пролиферативной фазе цикла (группа IV-a)	n=12
	Периферическая кровь небеременных женщин с ПНБ в секреторной фазе цикла (группа IV-b)	n=13
	Периферическая кровь беременных женщин с ПНБ в анамнезе (группа V)	n=14
Оценка популяционного состава рНК-клеток в составе моноклеарной фракции, после культивирования в присутствии клеток трофобласта	Периферическая кровь здоровых небеременных женщин в пролиферативной фазе цикла (группа I-a)	n=8 **
	Периферическая кровь здоровых небеременных женщин в секреторной фазе цикла (группа I-b)	n=8 **
	Периферическая кровь здоровых женщин в I триместре беременности (группа III-a)	n=8 **
Оценка цитотоксичности клеток линии НК-92 в отношении клеток трофобласта в присутствии КС ворсин хориона I и III триместров беременности	КС ворсин хориона здоровых женщин в I триместре беременности (группа III-a)	n=20
	КС ворсин хориона здоровых женщин в III триместре беременности (группа III-b)	n=15



Продолжение таблицы 2.1		
1	2	3
Оценка цитотоксичности рНК-клеток в составе мононуклеарной фракции в отношении клеток трофобласта	Периферическая кровь здоровых небеременных фертильных женщин в пролиферативной фазе цикла (группа II-a)	n=20
	Периферическая кровь здоровых небеременных фертильных женщин в секреторной фазе цикла (группа II-b)	n=20
	Периферическая кровь здоровых женщин в I триместре беременности (группа III-a)	n=25
	Периферическая кровь небеременных женщин с ПНБ в пролиферативной фазе цикла (группа IV-a)	n=19
	Периферическая кровь небеременных женщин с ПНБ в секреторной фазе цикла (группа IV-b)	n=23
	Периферическая кровь беременных женщин с ПНБ в анамнезе (группа V)	n=23
	Периферическая кровь здоровых небеременных женщин в пролиферативной фазе цикла (группа I-a)	n=25
	Периферическая кровь здоровых небеременных женщин в секреторной фазе цикла (группа I-b)	n=25
Оценка цитотоксичности рНК-клеток, изолированных из фракции мононуклеаров, в отношении клеток трофобласта	Периферическая кровь здоровых небеременных женщин (группа I-a + группа I-b)	n=13
	Периферическая кровь здоровых небеременных фертильных женщин (группа II-a + группа II-b)	n=11
	Периферическая кровь здоровых женщин в I триместре беременности (группа III-a)	n=10

(\*) - экспериментальные данные, полученные для группы, использованы на двух этапах исследования; (\*\*) - участники исследования входят в состав аналогичных групп на этапе работы «оценка пролиферативной активности рНК-клеток здоровых небеременных и беременных женщин в составе мононуклеаров»

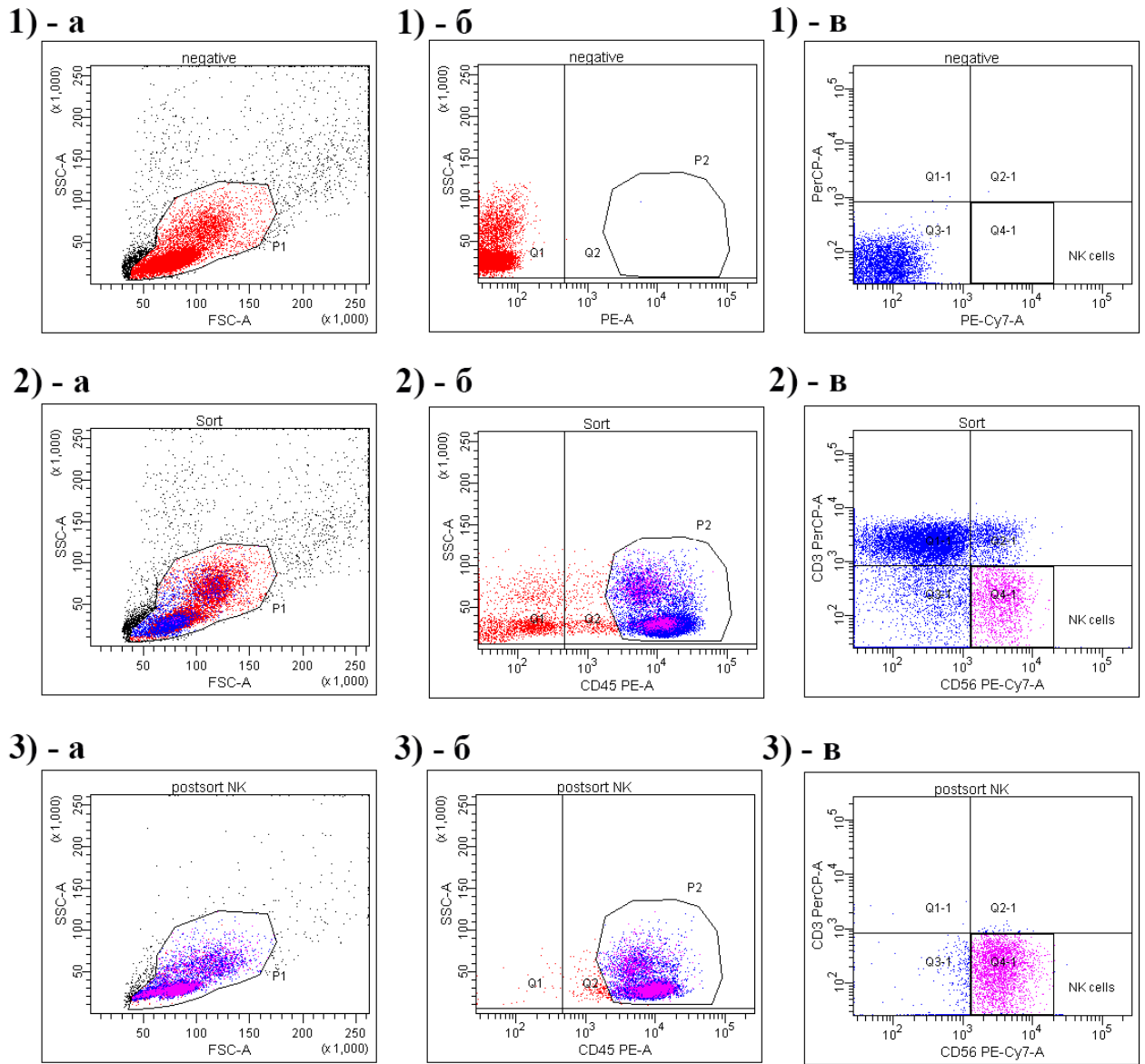


Рисунок 2.1 - Стратегия гейтирования spNK-клеток, использованная при сортировке из состава мононуклеаров. 1) Мононуклеары периферической крови, обработанные изотипическими антителами: а) График распределения в координатах FSC-SSC. Гейт P1 содержит лимфоциты и моноциты; б) График распределения в координатах SSC-PE. Квадрант Q1 содержит лимфоциты и моноциты, в) График распределения в координатах PerCP-PE-Cy7; 2) Presort мононуклеаров периферической крови, обработанных антителами к CD45, CD3, CD56: а) в координатах FSC-SSC; б) в координатах SSC-CD45. Гейт P2 содержит лимфоциты и моноциты; в) в координатах CD3PerCP-CD56PE-Cy7. Гейт P3 содержит NK-клетки; 3) Postsort NK-клеток периферической крови: а) в координатах FSC-SSC; б) в координатах SSC-CD45; в) в координатах CD3PerCP-CD56PE-Cy7

### **2.1.5 Кондиционированные среды эксплантатов плацент, содержащих ворсины хориона**

Плаценты получали после искусственного аборта в I триместре физиологической беременности у соматически здоровых женщин без репродуктивных нарушений в анамнезе или после кесарева сечения в III триместре физиологической беременности. Показаниями к оперативному родоразрешению были заболевания, не ассоциированные с акушерской патологией, такие, как миопия высокой степени, дегенеративные и дистрофические заболевания позвоночника, рубцовая деформация шейки матки. Эксплантаты, содержащие ворсины хориона, получали из центральной части плаценты и инкубировали в 1 мл среды DMEM без добавления ЭТС в течение 24 часов. Средняя масса эксплантатов составила  $110 \pm 15$  мг. После культивирования КС ворсин хориона собирали и замораживали при  $-20$  °С, хранили КС до проведения исследования не более 2 месяцев. Перед экспериментами в образцах измеряли общее количество белка по методу Бредфорда [105], используя спектрофотометр NanoDrop One (Thermo Scientific, США). Затем в лунки добавляли КС ворсин хориона, содержание общего белка в которых составляло 1 мг/мл. Все эксперименты с КС ворсин хориона I и III триместров проведены с тремя повторами для каждой комбинации клеток и КС.

### **2.1.6 Индукторы.**

В качестве индукторов в работе использованы TNF $\alpha$  (препарат «Рефнолин», Латвия), IFN $\gamma$  (препарат «Гаммаферон», Латвия), IL-1 $\beta$  (препарат «Беталейкин», Россия), IL-2 (препарат «Ронколейкин», Россия), IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, IL-18, SDF-1, VEGF, PLGF, bFGF, TGF $\beta$ , GM-CSF, PMA (R&D, США). Концентрации индукторов, использованные в работе, выбраны в соответствии с представленными в литературе данными [28, 208, 650, 725] и рекомендациями производителей.

## **2.2 Дизайн и методы исследования «Оценка влияния клеток трофобласта на фенотип и функции адгезии и трансмиграции НК-клеток в присутствии цитокинов и кондиционированных сред ворсин хориона I и III триместров беременности»**

Исследование состояло из следующих этапов:

1) оценка фенотипа клеток трофобласта, его изменений в присутствии КС или отдельных цитокинов, на примере клеток линии JEG-3, а также определение секреции цитокинов клетками трофобласта линии JEG-3;

2) оценка фенотипа НК-клеток и влияния КС на него на примере клеток линии NK-92;

- 3) исследование функции адгезии клеток линии NK-92 к монослою клеток трофобласта линии JEG-3 в присутствии КС или отдельных цитокинов;
- 4) исследование функции трансмиграции клеток линии NK-92 через монослой клеток трофобласта линии JEG-3 в присутствии КС или отдельных цитокинов;
- 5) конфокальная микроскопия взаимного расположения клеток линий NK-92 и JEG-3 в условиях их контактного культивирования;
- 6) оценка фенотипа клеток линии NK-92 до и после трансмиграции (Рисунок 2.2).

На этом этапе работы культивирование клеток линий NK-92 и JEG-3 в присутствии индукторов проводили в течение 24 часов.



Рисунок 2.2 - Дизайн исследования по оценке влияния клеток трофобласта на фенотип и функции адгезии и трансмиграции NK-клеток в присутствии цитокинов и КС ворсин хориона I и III триместров беременности

Жизнеспособность клеток после эксперимента, в том числе после инкубации клеток с КС, а также после обработки раствором версена, оценивали с помощью окраски раствором трипанового синего (Sigma, США), и она находилась в диапазоне 95-97%. Эксперименты с цитокинами проводили трижды с тремя повторами для каждой комбинации клеток и цитокинов.

Экспрессию НК-клетками и клетками трофобласта рецепторов, секрецию клетками трофобласта цитокинов, а также количество адгезировавших и мигрировавших НК-клеток оценивали на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (BD, США). Оценку расположения клеток линий НК-92 и JEG-3 проводили методом лазерной сканирующей микроскопии.

### **2.2.1 Оценка фенотипа клеток трофобласта линии JEG-3 в присутствии кондиционированных сред ворсин хориона или цитокинов**

Клетки линии JEG-3 инкубировали в плоскодонном 24-луночном планшете (Sarstedt, Австрия) в концентрации  $2 \times 10^5$  клеток на 1 мл полной среды DMEM при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> сутки до образования конфлюэнтного монослоя. Затем клетки трижды омывали теплым раствором Хэнкса, после чего к клеткам вносили следующие цитокины, разведенные в полной среде DMEM до целевой концентрации: TNF $\alpha$  (50 Ед/мл), IFN $\gamma$  (400 Ед/мл), IL-1 $\beta$  (100 Ед/мл), IL-6 (2,5 нг/мл), IL-8 (10 нг/мл), IL-10 (100 Ед/мл), IL-4 (10 нг/мл), VEGF (10 нг/мл), PLGF (5 нг/мл), bFGF (10 нг/мл), TGF $\beta$  (5 нг/мл), GM-CSF (100 нг/мл). Проанализировано три независимых эксперимента для каждого цитокина, с тремя повторами внутри каждого эксперимента. Помимо цитокинов использовали КС ворсин хориона I и III триместров беременности, разведенные средой DMEM в соотношении 1:1, содержание ЭТС доводили до 10%. Ранее в отделе иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «НИИ АГиР им.Д.О.Отта» оценивали цитокиновый состав КС ворсин хориона [28]. В настоящей работе в КС ворсин хориона установили содержание цитокинов IL-15 и IL-18, используя набор для мультиплексного анализа LEGENDplex Multi-Analyte Flow Assay Kit (Biolegend, Canada) в соответствии с указаниями производителя. Часть клеток инкубировали в полной среде DMEM без индукторов. Спустя 24 часа клетки обрабатывали раствором версена. Затем клетки инкубировали в течение 10 мин при 4°C с реагентом, блокирующим Fc-рецепторы (MACS, Германия), для уменьшения неспецифического связывания антител. Затем клетки обрабатывали антителами к рецепторам: CD104 (Интегрин  $\beta$ 4), CD54 (ICAM-1), CD49f (Интегрин  $\alpha$ 6), CD49e (Интегрин  $\alpha$ 5), CD31 (PECAM-1) (BD, США; R&D, США) в соответствии с рекомендациями производителя или изотипическими антителами (BD, R&D, США). Кроме того, при оценке влияния КС ворсин хориона на клетки линии JEG-3 была дополнительно проанализирована экспрессия CD106 (VCAM-1), CD29 (Интегрин  $\beta$ 1), CD95 (Fas), CD49a (Интегрин  $\alpha$ 1), CD51/61 (Интегрин  $\alpha$ V $\beta$ 3), Интегрина  $\beta$ 6, VE-Кадгерина, E-Кадгерина (BD, США; R&D, США). При оценке влияния цитокинов на фенотип клеток линии JEG-3 также дополнительно оценена экспрессия клетками CD105 (корцептор TGF $\beta$  - эндоглин), TGF $\beta$ R2, CD120a (TNFR1), CD120b (TNFR2), CD181 (CXCR1), CD140a (PDGFR $\alpha$ ), CD192 (CCR2), CD130 (IL-6R $\beta$ ), рецептора к лептину (LeptinR).

### 2.2.2 Оценка секреции цитокинов клетками трофобласта линии JEG-3

В 96-ти луночный плоскодонный планшет (Sarstedt, Австрия) помещали клетки трофобласта линии JEG-3 по 20 000 клеток в 100 мкл полной среды DMEM и инкубировали сутки до образования конфлюэнтного монослоя. Затем к клеткам добавляли цитокины TNF $\alpha$  (50 Ед/мл); IFN $\gamma$  (1000 Ед/мл); IL-1 $\beta$  (1000 Ед/мл); IL-10 (10 Ед/мл); PMA (10 нг/мл); TGF $\beta$  (5 нг/мл) и культивировали 24 часа. В качестве контроля использовали интактные клетки линии JEG-3. Далее планшеты центрифугировали 10 минут при 200g, стерильно отбирали супернатант из лунок и замораживали при -20 °С. Оценку содержания и измерение концентрации цитокинов в полученных образцах проводили при помощи метода «Cytometric Bead Array», используя стандартные наборы для определения цитокинов: CBA human TNF $\alpha$  Flex Set, CBA human IL-10 Flex Set, CBA human IFN $\gamma$  Flex Set, CBA human RANTES Flex Set, CBA human VEGF Flex Set, CBA human TGF $\beta$  Flex Set в соответствии с указаниями производителя (BD, США). Для определения концентрации TGF $\beta$  пробы сначала обрабатывали 1 N раствором HCl, затем после 10 минутной инкубации проводили реакцию нейтрализации 1,2 N раствором NaOH, содержащим 0,5 M HEPES, по рекомендации производителя набора (BD, США). Проанализированы пробы от трех независимых экспериментов для каждого цитокина-индуктора.

Дополнительно проанализировано содержание хорионического гонадотропина по его  $\beta$ -субъединице ( $\beta$ HcG) в КС, после культивирования клеток трофобласта линии JEG-3 без цитокинов и в присутствии IL-10, IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , PMA. Содержание  $\beta$ HcG определяли методом электрохемилюминесцентного анализа с использованием коммерческих тест-систем «Elecsys  $\beta$ HcG» фирмы Roche Diagnostics GmbH (Германия) на автоматическом иммунохимическом анализаторе Cobas e411 (Япония) в соответствии с указаниями производителей.

### 2.2.3 Оценка влияния кондиционированных сред ворсин хориона на фенотип клеток линии NK-92

Клетки линии NK-92 вносили в 24-луночный планшет для суспензионных культур (Sarstedt, Австрия) в концентрации  $3 \times 10^5$  клеток на лунку в 500 мкл полной среды  $\alpha$ -MEM. Затем в лунки вносили 500 мкл КС ворсин хориона, достигая таким образом разведения 1:1, содержание ЭТС доводили до 10%. В качестве негативного контроля влияния КС часть клеток инкубировали в полной среде  $\alpha$ -MEM без КС. Далее NK-клетки инкубировали в течение 24 часов, затем собирали среду с клетками в пробирки. Дополнительно обрабатывали лунки планшета раствором версена и также собирали раствор с клетками в пробирки. Затем клетки

центрифугировали при 200g 10 минут, после чего удаляли надосадочную жидкость, добавляли 1 мл раствора Хенкса, ресуспендировали клетки и вновь центрифугировали при 200g 10 минут. Отмывку проводили дважды. Затем клетки линии NK-92 обрабатывали антителами к KIR2DL1, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DS4, KIR3DL1, CD119 (IFN $\gamma$ R1), CD11a (Integrin  $\alpha$ L, LFA-1), CD11b (Integrin  $\alpha$ M, Mac-1), CD11c (Integrin  $\alpha$ X), CD18 (Integrin  $\beta$ 2), CD29 (Integrin  $\beta$ 1), CD49d (Integrin  $\alpha$ 4), CD54, CD58 (LFA-3), CD44 (HCAM), CD47 (TSP-1R), CD192, CD184 (CXCR4) (BD, USA; R&D, USA) в соответствии с указаниями производителей. Пробы, обработанные изотипическими антителами (BD, R&D, США), служили для контроля неспецифического связывания.

#### **2.2.4 Оценка взаимного расположения клеток линии NK-92 и клеток трофобласта линии JEG-3 во время их трансмиграции**

Для оценки расположения клеток в процессе трансмиграции проводили обработку NK-клеток витальным зеленым флуоресцентным красителем Calcein AM (BD, США), а клетки трофобласта - витальным красным флуоресцентным красителем SNARF-1 (ThermoFisher Scientific, США) в соответствии с указаниями производителей. Клетки трофобласта наслаивали на покровное стекло (Carl Roth GmbH, Germany), помещенное в лунку 24-луночного планшета, в концентрации  $2 \times 10^5$  клеток в 1 мл полной среды DMEM. Через 24 часа из лунок с клетками трофобласта убирали среду, затем на клетки трофобласта наносили NK-клетки в концентрации  $5 \times 10^5$  клеток в 1 мл полной среды  $\alpha$ -MEM, после чего инкубировали клетки еще 24 часа. Затем клетки отмывали трижды теплой средой и фиксировали, используя реактив Mounting Medium with DAPI (BIOZOL, Germany). Подготовка препаратов клеток выполнена совместно с сотрудником отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий Баженовым Д.О., за что автор благодарит его. Взаимное расположение NK-клеток линии NK-92 во время их трансмиграции через клетки трофобласта линии JEG-3 оценивали при помощи лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Германия) на базе Ресурсного Центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ совместно с Костиным Н.А., за что автор выражает ему благодарность. Все изображения получены с использованием иммерсионного масляного объектива с увеличением 20.0x0.7, одинаковыми настройками мощностей лазеров и диапазонов детекции флуорохромов. Все иллюстрации соответствуют проекции максимальной яркости, полученные с помощью программы ImageJ.

### **2.2.5 Оценка функции адгезии клеток линии NK-92 к монослою клеток трофобласта линии JEG-3 в присутствии кондиционированных сред ворсин хориона или цитокинов**

Клетки линии JEG-3 инкубировали в 24-луночных планшетах в течение 24 часов как описано выше (п.2.2.1). В лунки другого 24-луночного планшета для суспензионных культур (Sarstedt, Австрия) вносили клетки линии NK-92 по  $3 \times 10^5$  клеток. Затем добавляли индукторы. Для оценки влияния цитокинов на функцию адгезии NK-клеток в 1 мл полной среды  $\alpha$ -MEM добавляли цитокины IL-1 $\beta$  (10 Ед/мл, 100 Ед/мл, 1000 Ед/мл), TNF $\alpha$  (10 Ед/мл, 50 Ед/мл, 400 Ед/мл), IFN $\gamma$  (40 Ед/мл, 400 Ед/мл, 1000 Ед/мл), IL-6 (1 нг/мл, 2,5 нг/мл, 4 нг/мл), IL-8 (1 нг/мл, 10 нг/мл, 100 нг/мл), IL-10 (50 Ед/мл, 100 Ед/мл, 200 Ед/мл) или IL-4 (1 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл). Выполнено три независимых эксперимента для каждого цитокина, с тремя повторами внутри каждого эксперимента. Для оценки влияния КС ворсин хориона I и III триместров беременности NK-клетки вносили в 500 мкл полной среды  $\alpha$ -MEM, затем добавляя в лунки 500 мкл КС ворсин хориона, таким образом получая разведение КС в соотношении 1:1. Концентрацию ЭТС доводили до 10%. Клетки линии NK-92 инкубировали с индукторами 24 часа во влажной при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Через 24 часа из лунок планшетов с клетками линии JEG-3 удаляли среду, трижды омывали клетки теплой средой. Клетки линии NK-92 собирали в пробирки и центрифугировали при 200g 10 минут, для удаления среды с индукторами. Далее к клеткам линии NK-92 добавляли теплый раствор Хенкса и повторяли центрифугирование. После отмывки клетки линии NK-92 разводили в полной среде  $\alpha$ -MEM, вносили в планшет к клеткам линии JEG-3 и инкубировали 30 минут во влажной атмосфере при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Затем для удаления неадгезировавших клеток линии NK-92 клетки трофобласта отмывали трижды теплой средой DMEM, после чего клетки обрабатывали раствором версена, и собирали в пробирки в теплой среде DMEM. Суспензию клеток линии JEG-3 и адгезировавших к ним клеток линии NK-92 дважды отмывали от среды раствором Хенкса, для чего клетки центрифугировали при 200g 10 минут, затем удаляя надосадочную жидкость. Далее суспензию клеток обрабатывали антителами к CD45 в соответствии с рекомендациями производителя (BD, США). Положительным контролем служили NK-клетки, адгезировавшие к клеткам линии JEG-3, предварительно активированным PMA в концентрации 10 нг/мл. В ходе адгезии NK-клеток измерение на проточном цитофлюориметре проводили в течение 30 секунд после установления стабильного потока проточной жидкости, на средней скорости потока.



### 2.2.6 Оценка функции трансмиграции клеток линии NK-92 через монослой клеток трофобласта линии JEG-3 в присутствии кондиционированных сред ворсин хориона или цитокинов

Во вставки для 24-луночных планшетов с поликарбонатным фильтром с диаметром пор 8 мкм (BD Falcon, США) вносили по  $1 \times 10^5$  клеток линии JEG-3 в 500 мкл полной среды DMEM и инкубировали 18 часов до образования конфлюэнтного монослоя во влажной атмосфере при  $37^\circ\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$ . Вставка с клетками линии JEG-3, установленная в лунки 24-луночного планшета, образует верхнюю камеру системы «трансвелл», лунка планшета - нижнюю камеру (Рисунок 2.3).

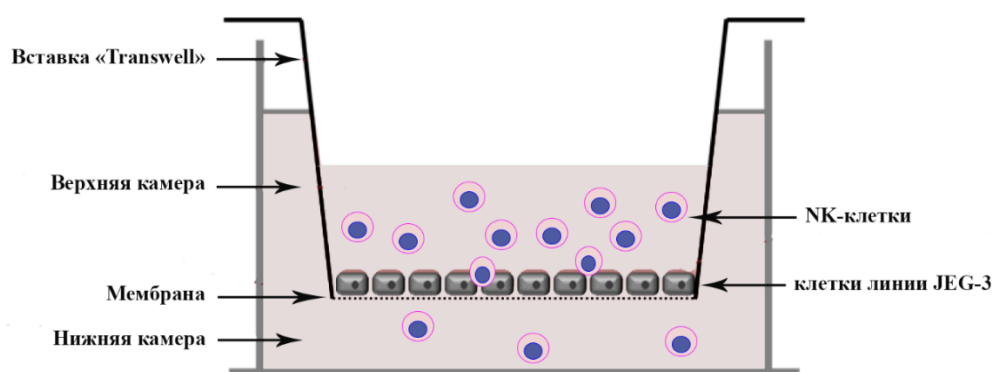


Рисунок 2.3 - Схема системы «трансвелл», использованная в работе

Проводили визуальную оценку однородности монослоя перед каждым экспериментом, используя инвертированный микроскоп (Axio Observer Z1, Zeiss, Германия). Затем из верхней камеры удаляли культуральную среду и вносили клетки линии NK-92 в концентрации  $5 \times 10^5$  в 200 мкл полной среды  $\alpha$ -MEM. В нижнюю камеру добавляли индукторы. Для оценки влияния цитокинов на функцию трансмиграции NK-клеток в нижнюю камеру вносили 700 мкл полной среды  $\alpha$ -MEM, затем добавляя цитокин  $\text{TNF}\alpha$  (50 Ед/мл),  $\text{IFN}\gamma$  (400 Ед/мл),  $\text{IL-1}\beta$  (100 Ед/мл),  $\text{IL-6}$  (2,5 нг/мл),  $\text{IL-8}$  (10 нг/мл),  $\text{IL-10}$  (100 Ед/мл),  $\text{IL-4}$  (10 нг/мл),  $\text{SDF-1}$  (100 Ед/мл),  $\text{bFGF}$  (10 нг/мл),  $\text{TGF}\beta$  (5 нг/мл),  $\text{IL-15}$  (10 нг/мл) или  $\text{IL-18}$  (10 нг/мл). Затем клетки инкубировали 24 часа ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). После инкубации оценивали количество мигрировавших в нижнюю камеру клеток линии NK-92. Для определения абсолютного количества мигрировавших клеток использовали пробирки Truecount (BD, США), каждая из которых содержит известное количество референсных частиц. Проанализированы результаты трех независимых экспериментов, поставленных с каждым цитокином, с тремя повторами внутри каждого эксперимента. Для оценки влияния КС ворсин хориона в нижнюю камеру вносили 700 мкл КС, предварительно разведенных полной средой  $\alpha$ -MEM в соотношении 1:1. Оценка функции

трансмиграции клеток линии NK-92 через монослой клеток трофобласта выполнена совместно с сотрудником отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий Баженовым Д.О., за что автор выражает ему благодарность.

### **2.2.7 Оценка фенотипа клеток линии NK-92 до и после трансмиграции через монослой клеток трофобласта линии JEG-3 в присутствии цитокинов**

Эксперименты по оценке фенотипа NK-клеток до и после трансмиграции через трофобласт оценивали, используя систему «трансвелл» так, как описано выше (п.2.2.6). В качестве индукторов использовали цитокины, как описано в предыдущем пункте. После инкубации клеток линии NK-92 в течение 24 часов в верхней камере оценивали фенотип NK-клеток, немигрировавших через монослой клеток трофобласта. Также оценивали фенотип мигрировавших в нижнюю камеру клеток линии NK-92. Для этого NK-клетки обрабатывали антителами к CD45, CD18, CD11a, CD11b и CD11c (BD, США) в соответствии с указаниями производителя или изотипическими антителами. Проанализированы данные трех независимых экспериментов для каждого цитокина, в три повторения внутри каждого эксперимента. Оценка фенотипа клеток линии NK-92 до и после трансмиграции выполнена совместно с сотрудником отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий Баженовым Д.О., за что автор выражает ему благодарность.

### **2.3 Дизайн и методы исследования «Оценка параметров дифференцировки NK-клеток в присутствии клеток трофобласта»**

Исследование состояло из следующих этапов:

1) оценка изменений рецепторного профиля клеток линии NK-92 в результате совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3 и определение влияния цитокинов и КС ворсин хориона I и III триместров беременности на экспрессию рецепторов клетками линии NK-92 в присутствии трофобласта;

2) оценка содержания мРНК гена *NCAM1*, кодирующего CD56, клетками линии NK-92 в присутствии цитокинов;

3) оценка активации внутриклеточной передачи сигнала в клетках линии NK-92 после культивирования с клетками трофобласта;

4) определение экспрессии рецепторов pNK-клетками в условиях совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3;

5) оценка содержания транскрипционных факторов в клетках линии NK-92 и его изменений после совместного культивирования в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3 (Рисунок 2.4).



Рисунок 2.4 - Дизайн исследования по оценке параметров дифференцировки NK-клеток в присутствии клеток трофобласта

Для оценки параметров дифференцировки NK-клеток проводили их культивирование с клетками трофобласта в течение 96 часов. Активацию внутриклеточной передачи сигнала в NK-клетках после культивирования с клетками трофобласта оценивали через 24 часа совместного культивирования.

Контроль клеточной гибели до и после культивирования проводили с помощью обработки 7-амино-актиномицином Д (7-AAD) и она составила не более 2% (BioLegend, США). Эксперименты с цитокинами проводили дважды с тремя повторами для каждой комбинации клеток и цитокинов. Изменения рецепторного профиля клеток линии NK-92 и pNK-клеток, а также изменения транскрипционных факторов в клетках линии NK-92, без и в присутствии индукторов и клеток трофобласта оценивали с использованием проточного цитофлуориметра

FACSCanto II (BD, США). Оценку изменения содержания мРНК гена, кодирующего CD56, клетками линии NK-92 под влиянием цитокинов, продуцируемых клетками трофобласта, проводили методом RT-PCR. Для определения активации внутриклеточной передачи сигнала в клетках линии NK-92 после культивирования с клетками трофобласта использовали метод WesternBlot.

### **2.3.1 Оценка рецепторного профиля клеток линии NK-92 после культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3 и цитокинами**

Клетки линии JEG-3 инкубировали в 24-луночных планшета как описано выше (п.2.2.1). Далее из лунок с конфлюэнтным монослоем клеток линии JEG-3 убрали среду и добавляли  $2 \times 10^5$  клеток линии NK-92 на лунку в свежей полной среде  $\alpha$ -MEM. В часть лунок вносили только полную среду  $\alpha$ -MEM. Затем в часть лунок цитокины добавляли TNF $\alpha$  (50 Ед/мл), TGF $\beta$  (5 нг/мл), IL-10 (10 нг/мл), IFN $\gamma$  (1000 Ед/мл), IL-15 (10 нг/мл) или IL-18 (10 нг/мл), и инкубировали в течение 96 часов. Клетки линии NK-92 культивировали в присутствии 500 Ед/мл IL-2, в часть лунок IL-2 не вносили для оценки изолированного влияния цитокинов TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IL-10, IFN $\gamma$ , IL-15, IL-18 на рецепторный профиль NK-клеток. После инкубации клетки однократно центрифугировали при 200g 10 минут, и обрабатывали моноклональными антителами к рецепторам CD45, CD56, CD94/NKG2A, NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp44, CD127, CD122, CD215, CD161, CD117, CD57, CD62L (BD, США), KIR2DL3, KIR2DL4, KIR3DL1, KIR2DL1, KIR2DS4 (R&D, США) в соответствии с указаниями производителей. Для контроля неспецифического связывания антител в соответствии с указаниями производителя применяли изотипические антитела (R&D, BD, США). Примененная стратегия гейтирования представлена на рисунке (Рисунок 2.5). Интенсивность экспрессии рецепторов клетками линии NK-92 оценивали, используя стратегию гейтирования, представленную на рисунке (Рисунок 2.6). Для исследования влияния клеток трофобласта на NK-клетки с использованием клеток линии JEG-3 и NK-92 проведено двенадцать независимых экспериментов по три повтора внутри каждого эксперимента для каждой комбинации клеток. Для оценки влияния цитокинов на взаимодействие NK-клеток и клеток трофобласта проведено два независимых эксперимента с каждым цитокином, по три повтора внутри каждого эксперимента для каждой комбинации клеток и цитокинов.

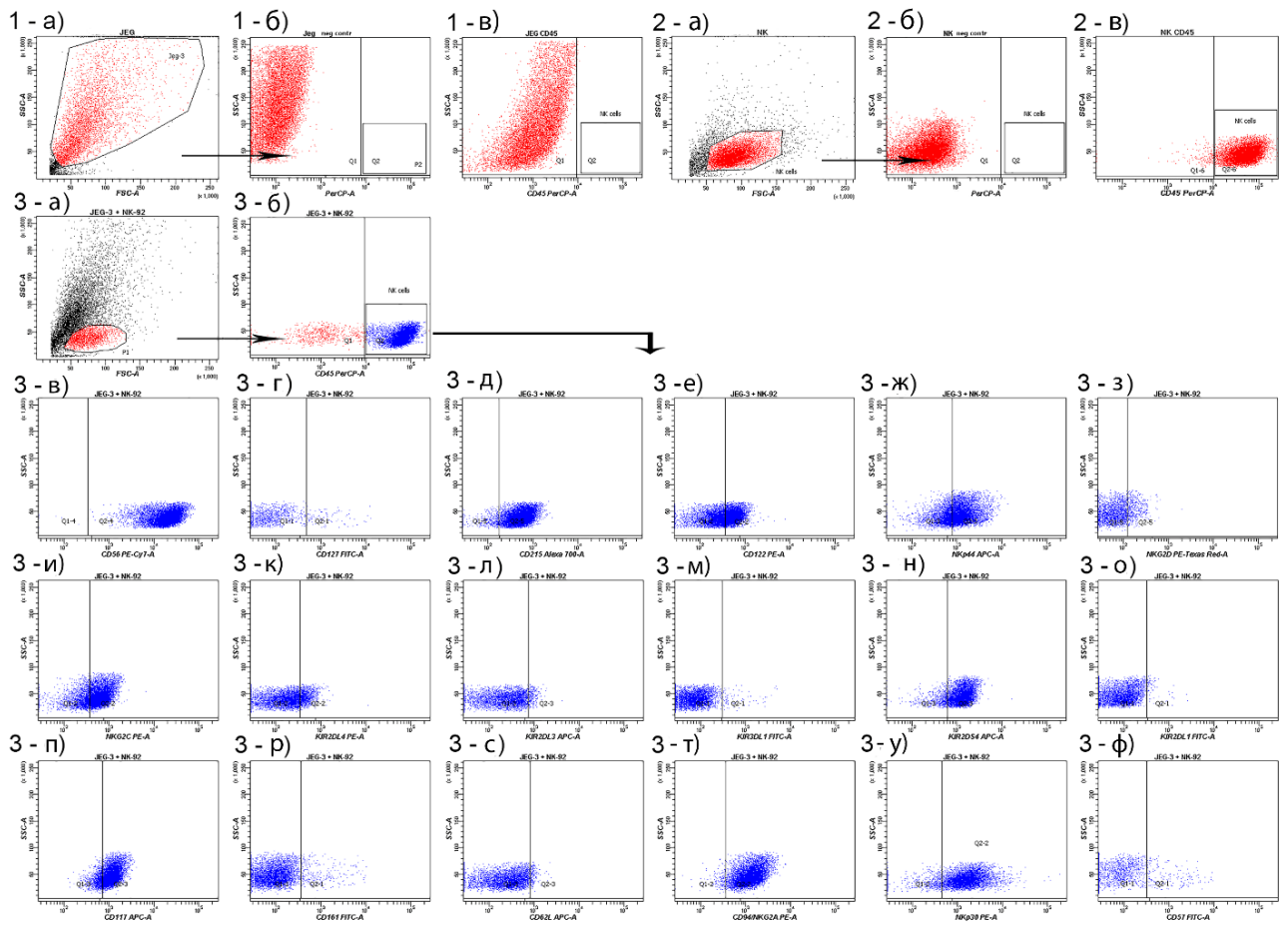


Рисунок 2.5 - Стратегия гейтирования клеток линии NK-92 после культивирования в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3

Двумерные гистограммы распределения клеток трофобласта линии JEG-3, обработанных изотипическими антителами в координатах FSC/SSC (1а) и PerCP /SSC (1б) и обработанных антителами к CD45 в координатах PerCP/SSC (1в). Двумерная гистограмма распределения клеток линии NK-92, обработанных изотипическими антителами в координатах FSC/SSC (2а) и PerCP/SSC (2б), и обработанных антителами к CD45 в координатах PerCP/SSC (2в). Двумерные гистограммы распределения клеток линии NK-92 в сокультуре с клетками трофобласта линии JEG-3, обработанных антителами к CD45 (FSC/SSC (3а) and PerCP/SSC (3б) и антителами к CD56 (3в), CD127 (3г), CD215 (3д), CD122 (3е), NKp44 (3ж), NKG2D (3з), NKG2C (3и), KIR2DL4 (3к), KIR2DL3 (3л), KIR2DL1 (3м), KIR2DS4 (3н), KIR2DL1 (3о), CD117 (3п), CD161 (3р), CD62L (3с), CD94/NKG2A (3т), NKp30 (3у), CD57 (3ф). Для графиков 3 в-ф границы квадрантов устанавливали на основании данных измерения проб с NK-клетками, обработанными изотипическими антителами

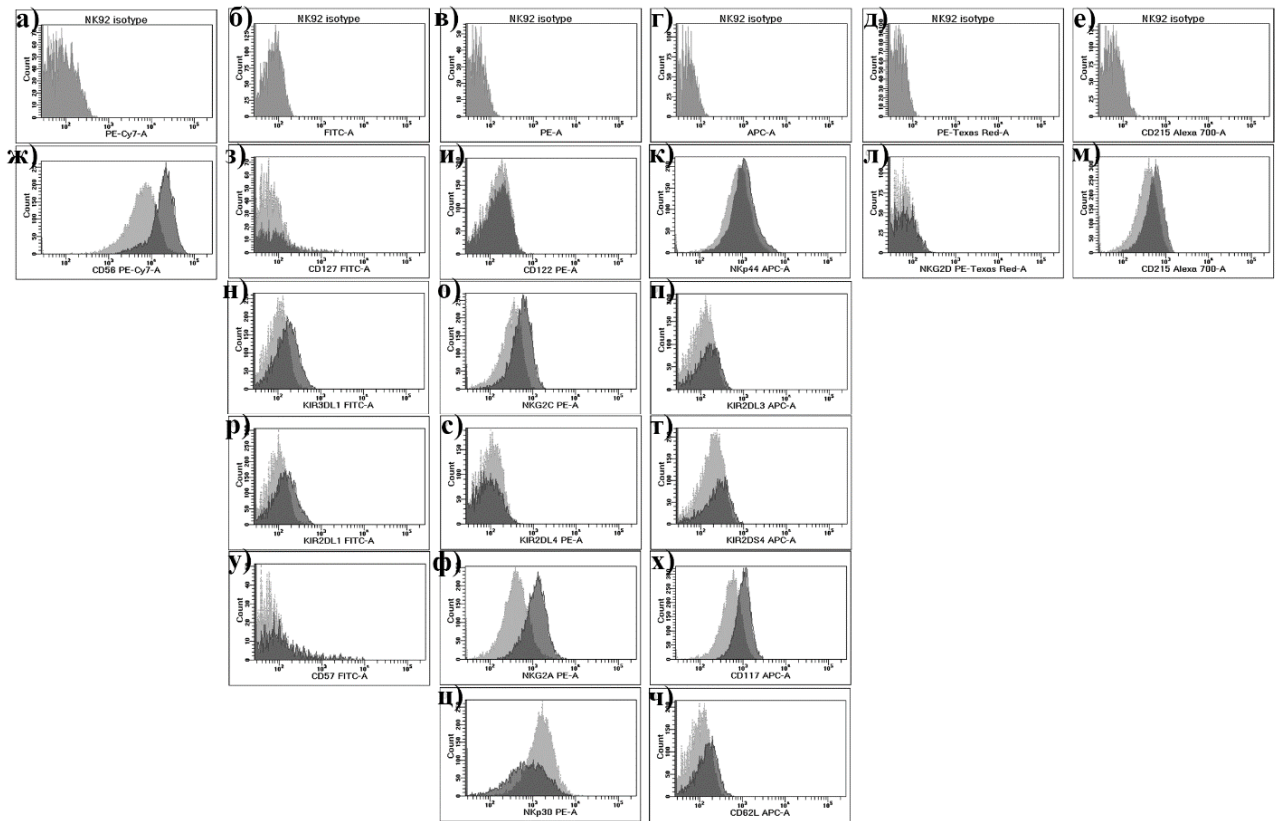


Рисунок 2.6 - Интенсивность экспрессии рецепторов клетками линии NK-92 после культивирования без (светло серая гистограмма) и в присутствии (темно серая гистограмма) клеток трофобласта линии JEG-3.

Для разделения клеток линий NK-92 и JEG-3 использовали стратегию гейтирования, представленную на рисунке 2.5. Верхний ряд гистограмм (а-е) отражает интенсивность флюоресценции клеток линии NK-92, обработанных изотипическими антителами. На гистограммах ж-ч отражена интенсивность флюоресценции клеток линии NK-92, обработанных антителами к CD56 (ж), CD127 (з), CD122 (и), NKp44 (к), NKG2D (л), CD215 (м), KIR3DL1 (н), NKG2C (о), KIR2DL3 (п), KIR2DL1 (р), KIR2DL4 (с), KIR2DS4 (т), CD57 (у), NKG2A (ф), CD117 (х), NKp30 (ц), CD62L (ч)

### 2.3.2 Оценка фенотипа клеток линии NK-92 после культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3 в присутствии кондиционированных сред ворсин хориона

Клетки линии JEG-3 культивировали до образования конфлюэнтного монослоя (п.2.2.1). Затем в лунки с монослоем клеток линии JEG-3 добавляли клетки линии NK-92, как описано в п. 2.3.1, IL-2 (500 Ед/мл) и КС ворсин хориона, разведенные средой  $\alpha$ -MEM в соотношении 1:1. Далее клетки культивировали в течение 96 часов, затем однократно центрифугировали при 200g, 10 минут. Далее клетки обрабатывали моноклональными антителами к рецепторам CD45, CD56,

NKG2C, NKG2D, NKp44, CD127, CD122, CD215, (BD, США), KIR2DL3, KIR2DL4, KIR3DL1, KIR2DL1, KIR2DS4 (R&D, США) в соответствии с указаниями производителей. Оценку экспрессии клетками рецепторов проводили, используя модифицированную в соответствии с набором антител стратегию гейтирования из рисунка 2.4.

### **2.3.3 Оценка содержания мРНК гена *NCAM1*, кодирующего CD56, в клетках линии NK-92 после культивирования в присутствии цитокинов**

В клетках линии NK-92 определяли содержание мРНК гена *NCAM1*, кодирующего поверхностный адгезионный рецептор NK-клеток CD56, а также изменение содержания мРНК, кодирующей CD56, после культивирования клеток линии NK-92 в присутствии цитокинов TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ . Для этого клетки линии NK-92 культивировали в течение 96 часов без и в присутствии цитокинов в культуральных флаконах («Sarstedt», Германия) в полной среде  $\alpha$ -MEM. В часть флаконов вносили цитокины TGF $\beta$  (5 нг/мл), TNF $\alpha$  (50 ЕД/мл), IFN $\gamma$  (1000 ЕД/мл). После культивирования содержимое флаконов центрифугировали в течение 5 минут при 2500g, осадок ресуспендировали в реагенте для выделения суммарной РНК ExtractRNA («Евроген, Россия»). Затем из осадка клеток выделяли РНК методом фенол-хлороформной экстракции. Пробы проанализированы методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР) на амплификаторе Real-time CFX Connect (Bio-Rad, США). Использовали праймеры к гену *NCAM1*: 5'CAT CAC CTG GAG GAC TTC TAC C 3'; 3'CCA AGG ACT CCT GCC CAA TG 5' («Евроген», Россия). Содержание мРНК гена *NCAM1* оценивали относительно референсного гена *HSP90*. Данная часть работы выполнена на базе химико-биологического кластера ИТМО (Международный научный центр SCAMT (Solution Chemistry of Advanced Materials and Technologies / Растворной химии передовых материалов и технологий) совместно с сотрудниками Вершининой С. и к.б.н. Духиновой М., за что автор выражает им благодарность. Проведено пять независимых экспериментов.

### **2.3.4 Оценка активации TGF $\beta$ -сигнального пути в клетках линии NK-92 под влиянием клеток трофобласта линии JEG-3**

Клетки линии JEG-3 культивировали во флаконах 75 см<sup>2</sup> (концентрация  $2 \times 10^5$  клеток/мл). Через 24 часа клетки обрабатывали раствором 4 мкМ CFSE (сукцинимидиловый эфир диацетата 5(6)карбоксифлуоресцеина, Sigma) в темноте 10 мин при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Для удаления раствора CFSE клетки линии JEG-3 после инкубации трижды омывали холодной (4°C) культуральной средой DMEM. Затем к клеткам линии JEG-3 вносили клетки линии NK-92 (концентрация  $3 \times 10^5$

клеток/мл) и инкубировали в течение 24 часов (37 °С, 5% CO<sub>2</sub>). В качестве контроля использовали интактные клетки линии NK-92, прокультивированные без клеток линии JEG-3. После инкубации клетки линий NK-92 и JEG-3 разделяли с помощью проточного сортировщика клеток FACS Aria III (BD, США) через сопло диаметром 85 мкм, используя антитела к CD45 (BD, США). Применяли протокол Purity. Популяцию клеток линии NK-92 выделяли по фенотипу CD45<sup>+</sup>, клетки линии JEG-3 - по флуоресценции CFSE. Чистота выделения (Postsort) клеток линий NK-92 и JEG-3 составляла не менее 99,8%. Эксперименты по контактному совместному культивированию проводили в четырех независимых повторах.

Оценка активации TGF $\beta$ -сигнального пути в клетках линии NK-92 выполнена совместно с сотрудниками группы биохимии ФГБНУ «НИИ АГиР им.Д.О.Отта», руководитель д.б.н. Корневский А.В., исполнитель к.б.н. Милютин Ю.П., за что автор выражает им благодарность. Для этого интактные и полученные после совместного культивирования клетки линий JEG-3 и NK-92 осаждали центрифугированием 200g 22°C в течение 10 мин, трижды промывали охлажденным фосфатным буфером (0,01M, pH 7,4), далее лизировали в буфере RIPA (50 mM Трис-НСl pH=8,1 1% Тритон X-100, 0,1 % додецилсульфат натрия (SDS), 0,5 % дезоксихолат натрия, 1 mM ЭДТА, 150 mM NaCl), с добавлением коктейля ингибиторов протеаз и фосфатаз (Roche Diagnostic GmbH, Германия) в течение 40 минут при периодическом встряхивании.

Затем проводили центрифугирование проб при 16000 g в течение 10 минут для удаления клеточного дебриса, супернатанты хранили до анализа не более 2 месяцев при -80°C. Концентрацию общего белка в пробах оценивали по методу Бредфорда [105] на спектрофотометре NanoDrop One (Thermo Scientific, США). Образцы клеточных лизатов, содержащих по 50 мкг белка для определения, разделяли в 10% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по Лэммли и переносили на PVDF-мембрану. Мембраны блокировали раствором 2%-ного альбумина (Sigma, США) в растворе, содержащем 50 mM Трис-НСl; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20.

Для оценки содержания в клетках линии JEG-3 TGF- $\beta$  использовали первичные антитела к TGF- $\beta$  (rabbit Ab 1:1000, Cell Signaling, США). Содержание белков канонического пути активации TGF- $\beta$ -пути в клетках линии NK-92 определяли с помощью первичных антител против SMAD2/3 (rabbit Ab, 1:1000) и pSMAD2/3 (rabbit Ab, 1:1000), (Cell Signaling, США). Первичные антитела инкубировали при 4°C в течение ночи на шейкере. После инкубации с соответствующими HRP-конъюгированными козыми антителами (1:1000, BioRad, США), сигналы визуализировали с помощью усиленной хемилюминесценции (ECL GE Healthcare, Упсала, Швеция). Интенсивность полос, полученных в результате иммуноблотинга, определяли с помощью программного обеспечения ImageLab. Данные, полученные на клеточных лизатах



нормализованы по глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназе (GAPDH rabbit Ab, 1:1000, Cell Signaling, США). Проанализированы пробы четырех независимых экспериментов.

### **2.3.5 Оценка фенотипа НК-клеток периферической крови после культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3 в присутствии цитокинов**

Клетки линии JEG-3 культивировали в 96-луночном планшете как описано выше (п.2.2.2), до образования конфлюэнтного монослоя. Через 24 часа из периферической крови выделяли мононуклеарные клетки. Из лунок планшета удаляли культуральную среду и помещали мононуклеары к клеткам трофобласта либо в пустые лунки в концентрации  $1 \times 10^5$  клеток в 100 мкл полной среды DMEM. Во все лунки добавляли IL-2 (200 Ед/мл), в часть лунок добавляли IL-18 (10 нг/мл), IL-15 (10 нг/мл) или TGF $\beta$  (5нг/мл) («Sigma Aldrich», США), получая комбинации IL-2+/IL-15+ и IL-2+/IL-18+, IL-2+/TGF $\beta$ +. Затем клетки инкубировали в течение 96 часов при 37°C во влажной атмосфере с 5% содержанием CO<sub>2</sub>. После инкубации планшет центрифугировали в течение 5 минут при 200g, 22°C, после чего из лунок убрали культуральную среду, добавляли по 100 мкл раствора версена (БиолоТ, Россия) и ресуспендировали клетки. После этого клетки центрифугировали 5 минут при 200g, 22°C, сливали раствор версена и повторно отмывали клетки в растворе Хенкса с помощью центрифугирования (5 минут при 200g, 22°C). Затем клетки последовательно обрабатывали реагентом для блокирования Fc-рецепторов (MACS, Германия) и моноклональными антителами к рецепторам CD45, CD3, CD56, CD14, KIR3DL1, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DS4, NKp44, CD215, CD122, CD127, NKG2D (BD, США), KIR2DL1, NKG2C (R&D, США) согласно указаниям производителей. Выделяли популяцию pNK-клеток (Рисунок 2.7), которую затем анализировали на предмет экспрессии рецепторов. Пробы, обработанные изотипическими антителами, служили для контроля неспецифического связывания. Дополнительно оценивали жизнеспособность pNK-клеток после культивирования без и в присутствии клеток трофобласта с помощью обработки раствором 7AAD (Biolegend, США), и она составляла 95-98%.

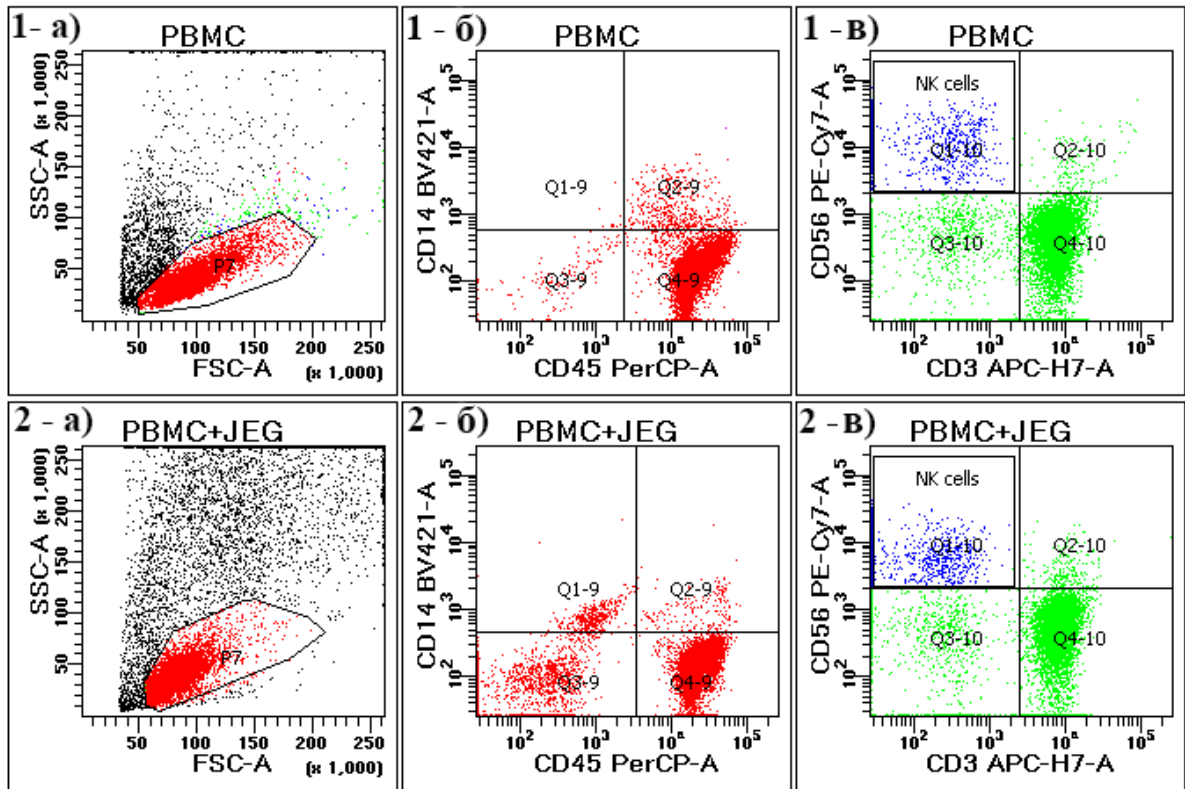


Рисунок 2.7 - Стратегия гейтирования, использованная для выделения популяции рНК-клеток из мононуклеарной фракции, после культивирования без и в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3. Двумерные гистограммы распределения мононуклеаров периферической крови (PBMC), обработанных антителами к CD45, CD14, CD3, CD56 в координатах FSC/SSC (1а), CD45/CD14 (1б), CD3/CD56 (1в)). Двумерные гистограммы распределения мононуклеаров периферической крови в сокультуре с клетками трофобласта линии JEG-3, обработанные антителами к CD45, CD14, CD3, CD56 в координатах FSC/SSC (2а), CD45/CD14 (2б), CD3/CD56 (2в)

### 2.3.6 Оценка содержания транскрипционных факторов в клетках линии NK-92 после культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3

Клетки линии JEG-3 культивировали, как описано выше (п.2.2.2). Затем в лунки с монослоем клеток линии JEG-3 добавляли клетки линии NK-92 по  $2 \times 10^5$  клеток в 1 мл свежей полной среды  $\alpha$ -MEM и IL-2 (500Ед/мл). После этого клетки инкубировали 96 часов. Затем проводили пермеабиллизацию клеток с последующим внутриклеточным окрашиванием, используя набор реагентов «Transcription-Factor Buffer Set» (BD, США) в соответствии с указаниями производителя. Пробы обрабатывали антителами к рецепторам CD45, CD56, и к транскрипционным факторам AhR, Eomes, GATA-3, ROR $\alpha$ , ROR $\gamma$ t, T-bet. Для контроля неспецифического связывания антител использовали изотопические антитела (BD, США).

Выполнено шесть независимых экспериментов. Оценка содержания транскрипционных факторов в клетках линии NK-92 выполнена совместно с сотрудником отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий Баженовым Д.О., за что автор выражает ему благодарность.

#### **2.4 Дизайн и методы исследования «Оценка пролиферативной активности NK-клеток периферической крови в присутствии клеток трофобласта»**

Исследование включало следующие этапы:

1) определение пролиферативной активности рNK-клеток в составе мононуклеаров здоровых небеременных женщин и ее изменения у беременных женщин в I триместре в присутствии клеток трофобласта;

2) оценка пролиферативной активности spNK-клеток, изолированных из мононуклеарной фракции здоровых небеременных женщин и беременных женщин в I триместре, в присутствии клеток трофобласта;

3) оценка изменений популяционного состава рNK-клеток после культивирования фракции мононуклеаров в присутствии клеток трофобласта;

4) определение пролиферативной активности рNK-клеток в присутствии клеток трофобласта у небеременных женщин с ПНБ в разных фазах менструального цикла, беременных женщин с привычным невынашиванием беременности в анамнезе, и сравнение с параметрами пролиферации NK-клеток у здоровых небеременных фертильных и беременных женщин (Рисунок 2.8).

Для оценки пролиферации рNK-клеток и изменения их популяционного состава клетки культивировали в течение 144 часов в присутствии клеток трофобласта.

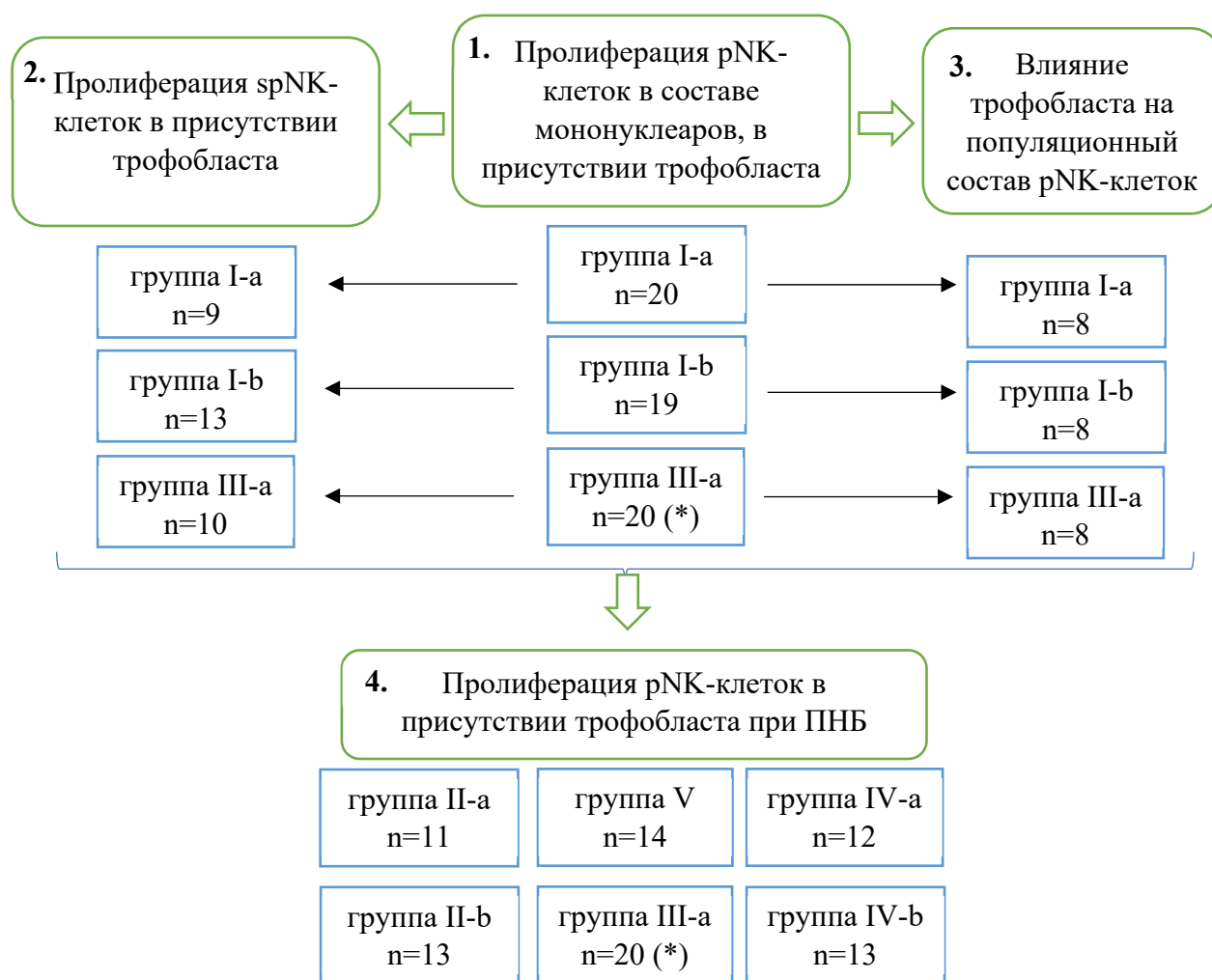


Рисунок 2.8 - Дизайн исследования для оценки пролиферативной активности рНК-клеток в присутствии клеток трофобласта. (\*) - использованы данные, полученные на этапе 1

#### 2.4.1 Оценка пролиферативной активности рНК-клеток, в составе мононуклеаров, в присутствии клеток трофобласта, у здоровых небеременных женщин и беременных женщин в I триместре

Клетки линии JEG-3 культивировали в 96-луночном планшете как описано выше (п.2.2.2), до образования конфлюэнтного монослоя. Затем из лунок убрали культуральную среду и помещали в планшет с клетками линии JEG-3 мононуклеарные клетки периферической крови в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток на лунку в 100 мкл полной среды DMEM. Часть мононуклеарных клеток периферической крови культивировали без клеток трофобласта. В лунки также добавляли IL-2 (200 МЕ/мл) для поддержания жизнеспособности клеток. Часть клеток культивировали без IL-2 для оценки его изолированного влияния на пролиферацию. Перед использованием мононуклеарных фракций оценивали в них содержание НК-клеток

методом проточной цитофлюориметрии, обрабатывая моноклональными антителами к CD45, CD3, CD56 (BD, США). Мононуклеарные клетки и клетки трофобласта совместно культивировали в течение 72 часов во влажной среде при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Через 72 часа в лунки добавляли по 100 мкл свежей культуральной среды и IL-2 (200 МЕ/мл). Затем культивирование продолжали еще в течение 72 часов. После шести суток культивирования также контролировали жизнеспособность клеток с помощью окраски трипановым синим. Доля жизнеспособных мононуклеарных клеток периферической крови составила 93%±2%.

После культивирования клетки фиксировали и пермеабилizировали при помощи набора Cytotfix/Cytoperm (BD, США) согласно протоколу, рекомендованному производителем. Затем мононуклеарные клетки обрабатывали антителами к CD45, CD56, CD3 и Ki-67 (BD, USA). Белок Ki-67 локализуется в клеточном ядре и экспрессирован на стадиях клеточного цикла G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> и M. Интенсивность его экспрессии коррелирует с продвижением клетки по жизненному циклу и отражает пролиферативную активность клетки [360, 576]. Также использовали изотипические антитела согласно рекомендациям производителя (BD, USA). Анализировали относительное количество NK-клеток среди всех мононуклеаров с фенотипом CD45<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> и интенсивность экспрессии NK-клетками маркера пролиферации Ki-67 в составе мононуклеаров (Рисунок 2.9).

#### **2.4.2 Оценка пролиферативной активности spNK-клеток, изолированных из мононуклеарной фракции, в присутствии клеток трофобласта у здоровых небеременных женщин и беременных женщин в I триместре**

Применяли методику, описанную ранее (п.2.4.1). В лунки 96-ого планшета к монослою клеток линии JEG-3 помещали spNK-клетки, изолированные из мононуклеарной фракции при помощи метода проточной сортировки клеток, описанного выше (п.2.1.4). Естественные киллеры использовали в концентрации  $1 \times 10^5$  клеток на лунку в 100 мкл полной среды DMEM. Часть spNK-клеток культивировали без клеток трофобласта. В часть лунок добавляли IL-2 (200 МЕ/мл). Клетки культивировали в течение 72 часов, затем добавляли по 100 мкл свежей культуральной среды, IL-2 (200 МЕ/мл) и продолжали культивирование еще в течение 72 часов. Доля жизнеспособных spNK-клеток после культивирования с клетками трофобласта составила 98,5%±4%. Затем клетки фиксировали, пермеабилizировали и обрабатывали моноклональными антителами к CD45 и Ki-67 (BD, США). Использовали изотипические антитела согласно рекомендациям производителя (BD, USA). Количество spNK-клеток и интенсивность экспрессии Ki-67 оценивали, используя стратегию гейтирования (Рисунок 2.10).

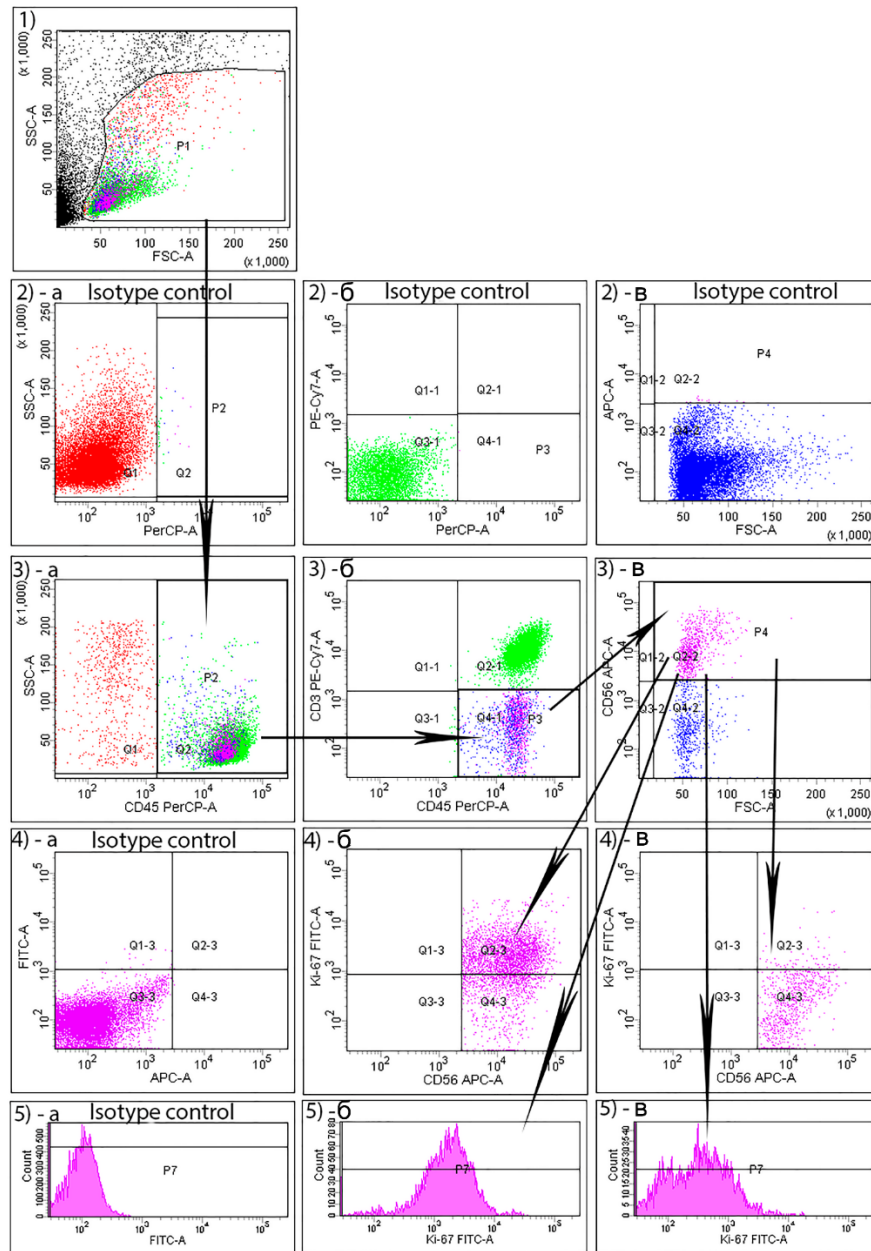


Рисунок 2.9 - Стратегия гейтирования рНК-клеток в составе мононуклеарной фракции для оценки пролиферативного маркера Ki-67. 1) Двумерная гистограмма распределения сокультуры мононуклеарных клеток и клеток трофобласта в координатах FSC/SSC: регион P1 содержит мононуклеары и клетки трофобласта. 2) Двумерная гистограмма распределения сокультуры мононуклеарных клеток и клеток трофобласта, обработанных изотипическими антителами, в координатах: а) PerCP/FSC; б) PerCP/PE/Cy7; в) APC/FSC. 3) Двумерная гистограмма распределения сокультуры мононуклеарных клеток, обработанных антителами к CD45, CD3, and CD56, в координатах: а) CD45PerCP/FSC; б) CD45PerCP/CD3PE/Cy7; в) CD56APC/FSC. 4) Двумерная гистограмма распределения НК-клеток, обработанных: а) изотипическими антителами; б) антителами к Ki-67 после культивирования без клеток трофобласта; в) антителами к Ki-67 после культивирования в присутствии клеток трофобласта. 5) Одномерная гистограмма распределения НК-клеток, обработанных: а) изотипическими антителами, б) антителами к Ki-67 после культивирования с IL-2 без клеток трофобласта; в) антителами к Ki-67 после культивирования в присутствии IL-2 и клеток трофобласта

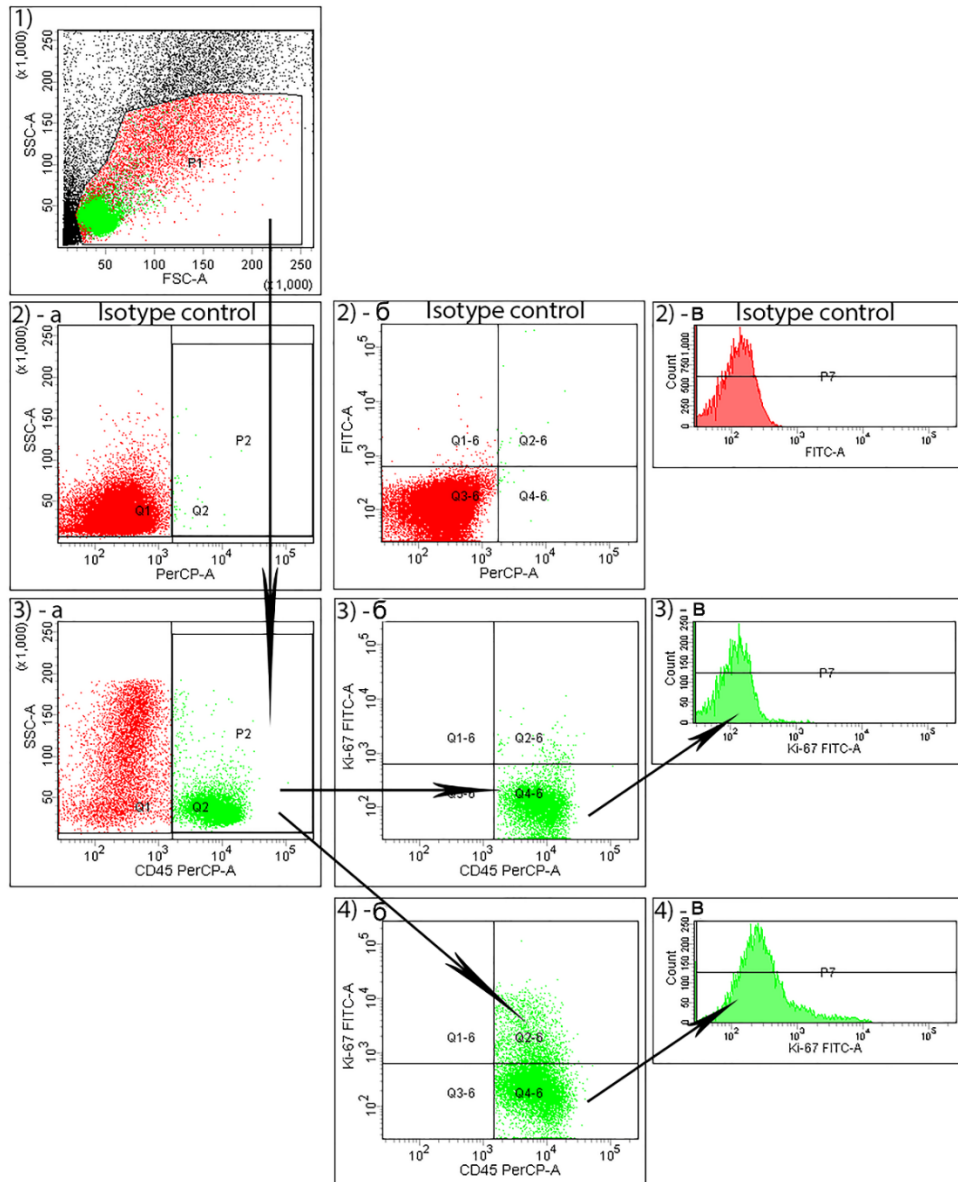


Рисунок 2.10 - Стратегия гейтирования srNK-клеток, предварительно изолированных из мононуклеарной фракции, для оценки пролиферативного маркера Ki-67

1) Двумерная гистограмма распределения сокультуры NK-клеток и клеток трофобласта в координатах FSC/SSC: регион P1 содержит NK-клетки и клетки трофобласта. 2) Двумерная гистограмма распределения NK-клеток в сокультуре мононуклеарных клеток и клеток трофобласта, обработанной изотипическими антителами в координатах: а) PerCP/SSC; б) PerCP/FITC; в) одномерная гистограмма распределения по флюоресцентному каналу FITC. 3) Двумерная гистограмма распределения NK-клеток в сокультуре, обработанных антителами к CD45, в координатах: а) CD45PerCP/FSC; б) CD45PerCP/Ki-67 FITC; в) одномерная гистограмма распределения по флюоресцентному каналу FITC. 4) Двумерная гистограмма распределения NK-клеток в сокультуре, обработанных: б) антителами к Ki-67 после культивирования с клетками трофобласта; в) антителами к Ki-67 после культивирования с клетками трофобласта и IL-2

### 2.4.3 Оценка популяционного состава рNK-клеток в составе мононуклеарной фракции периферической крови в присутствии клеток линии JEG-3

Оценку популяционного состава рNK-клеток проводили до и после сокультивирования с клетками линии JEG-3. Клетки отмывали от культуральной среды и обрабатывали моноклональными антителами, в соответствии с рекомендациями производителя. Для выявления NK-клеток использовали антитела к CD45, CD3, CD56 (Beckman Coulter, США), также оценивали уровень экспрессии CD16 и CD57 (Beckman Coulter, США). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), на базе отдела иммунологии ФГБНУ «Институт Экспериментальной Медицины», совместно с к.б.н. Кудрявцевым И.В., за что автор выражает ему благодарность. Стратегия гейтирования представлена в Рисунок 2.11.

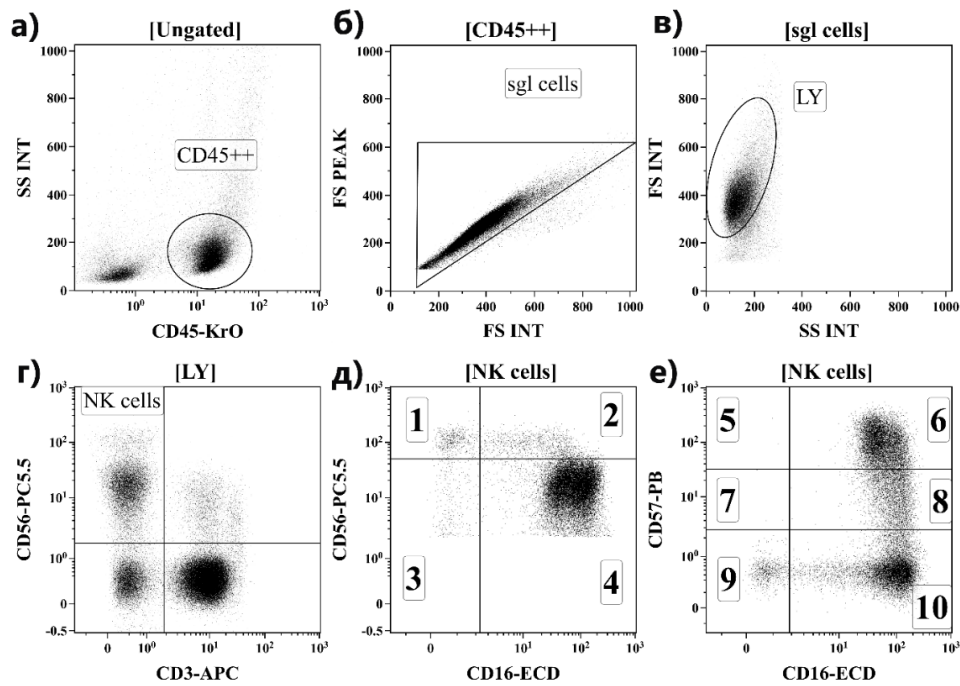


Рисунок 2.11 - Стратегия гейтирования рNK-клеток в сокультуре с клетками трофобласта для оценки популяционного состава NK-клеток. Двумерная гистограмма распределения в координатах: а) CD45/SS, регион CD45++ содержит лимфоциты; б) пиковых значений и интегральных значений прямого светорассеяния (FSC. Регион SGL содержит одинарные клетки и не содержит дублеты; в) FS/SS, регион LY содержит лимфоциты; г) CD3/CD56, регион NK cell содержит NK-клетки с фенотипом CD3- CD56+; д) CD16-CD56, квадранты содержат NK-клетки с фенотипом CD56<sup>bright</sup>CD16- (квадрант 1), CD56<sup>bright</sup>CD16+ (квадрант 2), CD56<sup>dim</sup>CD16- (квадрант 3), и CD56<sup>dim</sup>CD16+ (квадрант 4); е) CD16/CD57, квадранты содержат NK-клетки с фенотипом CD16-CD57<sup>bright</sup> (квадрант 5), CD16+CD57<sup>bright</sup> (квадрант 6), CD16-CD57<sup>dim</sup> (квадрант 7), CD16+CD57<sup>dim</sup> (квадрант 8), CD16-CD57- (квадрант 9), and CD16+CD57- (квадрант 10)



#### **2.4.4 Определение пролиферативной активности рNK-клеток в составе мононуклеарной фракции в присутствии клеток трофобласта у женщин с привычным невынашиванием беременности**

Пролиферативную активность рNK-клеток оценивали, как описано выше (п.2.4.1). Использовали мононуклеары периферической крови, содержащие рNK-клетки. Оценивали относительное количество рNK-клеток до и после культивирования, а также интенсивность экспрессии клетками Ki-67, CD56 и CD16.

### **2.5 Дизайн и методы исследования «Оценка продукции клетками линии NK-92 цитокинов и микровезикул»**

Исследование состояло из следующих этапов:

- 1) оценка продукции цитокинов клетками линии NK-92;
- 2) оценка продукции МВ клетками линии NK-92, включавшее гранулометрический анализ, трансмиссионную электронную микроскопию и атомно-силовую микроскопию МВ;
- 3) определение состава МВ клеток линии NK-92, включавшее оценку содержания каспаз в МВ и фенотипа МВ;
- 4) оценка переноса содержимого МВ клеток линии NK-92 в клетки трофобласта и влияние влияния МВ на фенотип, функции пролиферации и миграции клеток трофобласта, а также влияние на активацию внутриклеточных путей передачи сигнала в клетках трофобласта (Рисунок 2.12).

Для оценки продукции NK-клетками МВ, определения их характеристик и их влияния на клетки трофобласта естественные киллеры линии NK-92 культивировали как описано ниже, в течение 24 часов. Для оценки секреции NK-клетками цитокинов проводили экспозицию клеток индукторам в течение 96 часов, аналогично времени инкубации для оценки параметров дифференцировки NK-клеток.

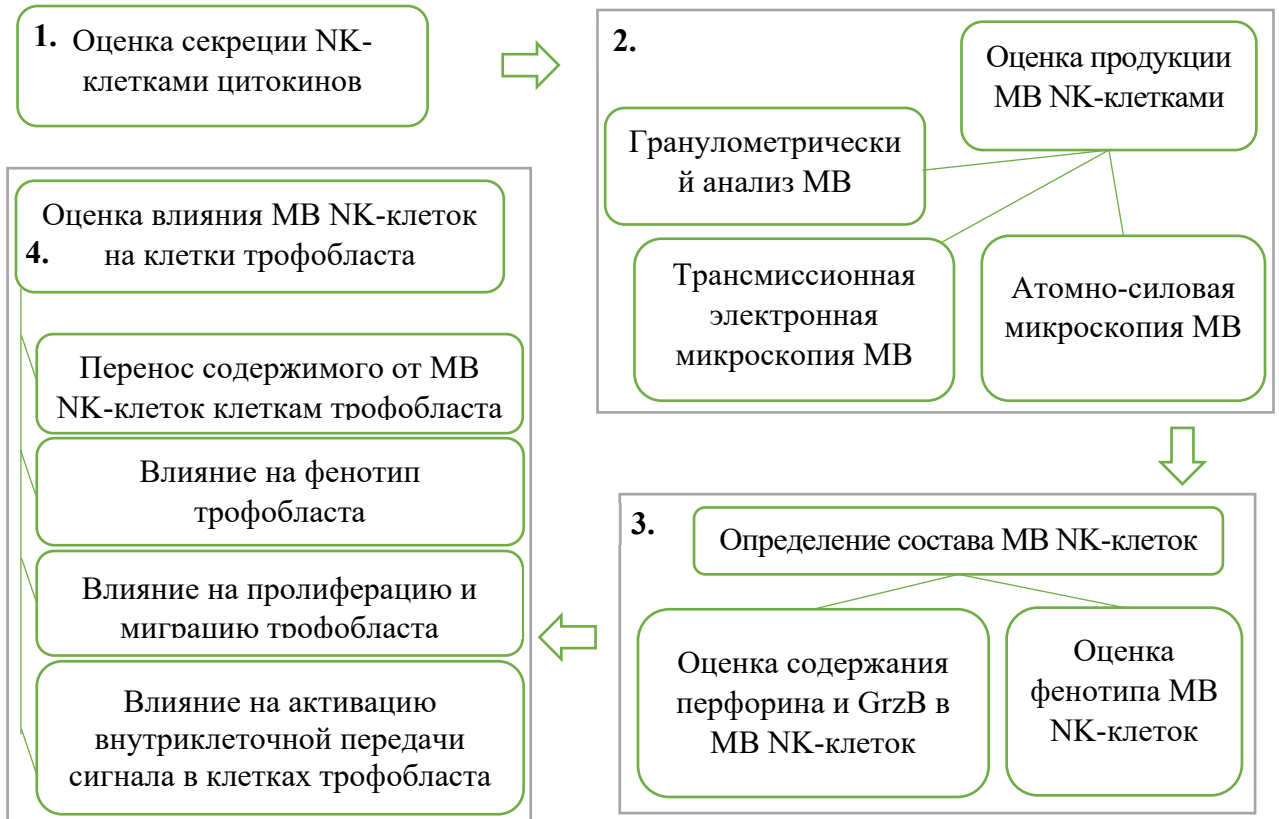


Рисунок 2.12 - Дизайн исследования для оценки продукции клетками линии NK-92 цитокинов и микровезикул

### 2.5.1 Оценка секреции цитокинов клетками линии NK-92

Для определения секреции цитокинов клетки линии NK-92 культивировали в течение 96 часов без и в присутствии цитокинов в 24-луночных планшетах («Sarstedt», Германия) по  $3 \times 10^5$  клеток в 1 мл полной среды  $\alpha$ -MEM. Во все флаконы добавляли IL-2 (500 Ед/мл). В часть флаконов вносили цитокины IL-15 (10 нг/мл), IL-18 (10 нг/мл), IL-10 (10 нг/мл), TNF $\alpha$  (50 Ед/мл), IFN $\gamma$  (1000 Ед/мл), TGF $\beta$  (5 нг/мл). Через 96 часов клетки центрифугировали при 200g 10 минут, собирали и замораживали супернатанты  $-20^\circ\text{C}$ . Пробы хранили до проведения экспериментов не более 2 месяцев. Для выявления цитокинов в супернатантах NK-клеток использовали стандартные наборы: BD CBA human TNF $\alpha$  Flex Set, BD CBA human IL-10 Flex Set, BD CBA human IFN $\gamma$  Flex Set, BD CBA human RANTES Flex Set, BD CBA human VEGF Flex Set, BD CBA human TGF $\beta$  Flex Set в соответствии с указаниями производителя. Проанализированы пробы от четырех независимых экспериментов для каждого цитокина.

## 2.5.2 Оценка продукции микровезикул клетками линии NK-92

Работа по оценке продукции NK-клетками МВ, определению их состава и оценке влияния МВ NK-клеток на фенотип, миграцию и пролиферацию клеток трофобласта выполнена совместно с сотрудниками отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий к.б.н. Марковой К.Л. и Горшковой А.А., за что автор благодарит их. Оценка содержания GrzB и перфорина в МВ клеток линии NK-92 и определение активации внутриклеточной передачи сигнала в клетках трофобласта выполнены совместно с сотрудниками группы биохимии ФГБНУ «НИИ АГиР им.Д.О.Отта», д.б.н. Корневским А.В. и к.б.н. Милютиной Ю.П., за что автор выражает им благодарность.

### 2.5.2.1 Выделение микровезикул клеток линии NK-92

Для получения МВ клетки линии NK-92 культивировали в флаконах для суспензионных культур в полной среде  $\alpha$ -MEM. За 24 часа до выделения МВ NK-клеткам полностью заменяли культуральную среду, до концентрации  $4 \times 10^5$  клеток в 1 мл. Перед выделением МВ оценивали жизнеспособность NK-клеток, используя обработку клеток раствором трипанового синего. Жизнеспособными были не менее 96% клеток.

Для выделения МВ применяют различные технологические подходы [378, 732], которые отличаются по результирующему выходу МВ и их чистоте. В настоящей работе использовали модифицированный метод дифференциального центрифугирования [600] МВ в растворе Хэнкса без  $\text{CaCl}_2$  (Sigma, США). Для этого после культивирования клеток из флаконов собирали культуральную среду и центрифугировали ее для осаждения клеток при 200g 10 мин при комнатной температуре (22°C). Затем полученные супернатанты центрифугировали 10 мин при 500g и 4°C, 11 мин при 9900g и 4°C, последовательно собирая надосадочные жидкости. Затем жидкости центрифугировали 11 мин при 19800g и 4°C, получая осадок, содержащий МВ, который затем дважды промывали раствором Хэнкса без  $\text{CaCl}_2$  и повторно центрифугировали при 19800g и 4°C 20 минут, удаляя супернатант. Описанный метод позволяет получать МВ диаметром от 100нм до 1000нм, избавляясь от клеточного дебриса и апоптотических телец, а также экзосом [188, 342, 614]. Все использованные для работы с МВ растворы и среды, в том числе раствор Хэнкса без  $\text{CaCl}_2$ , ЭТС и лошадиную сыворотку предварительно фильтровали, используя фильтры с диаметром пор 0,1 мкм (Corning, Германия).

### **2.5.2.2 Гранулометрический анализ микровезикул клеток линии НК-92**

Применяли метод динамического светорассеяния с помощью лазерного анализатора nanoPARTICA SZ-100 (Horiba, Япония). Исследование МВ провели в пяти независимых экспериментах на базе ресурсного центра «Оптические и лазерные методы исследования вещества» СПбГУ совместно с Капуткиной С.Ю., за что автор выражает ей благодарность. В качестве контроля оценен размер частиц, присутствующих в супернатантах после выделения МВ при 19800g.

### **2.5.2.3 Атомно-силовая микроскопия микровезикул клеток линии НК-92**

Суспензию МВ в растворе Хэнкса без  $\text{CaCl}_2$  помещали на обезжиренные покровные стекла, покрытые полилизинном (Sigma, США), добавляли 10% формалин (pH=7,1) и высушивали при 37°C. В качестве контроля использовали препарат раствора Хэнкса без  $\text{CaCl}_2$ . Затем стекла промывали в дистиллированной воде и сушили при комнатной температуре. Пробы проанализированы с использованием атомно-силового микроскопа Integra Aura (NT-MDT, Россия) на базе Ресурсного Центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ совместно с сотрудниками биологического факультета СПбГУ Бенкеным К.А. и Онохиным К.В., за что автор выражает им благодарность. Сканирование поверхности образцов проводили с использованием бесконтактных кремниевых датчиков высокого разрешения NSG01-A (NT-MDT, Россия) с жесткостью 5.1 Н/м<sup>2</sup> и резонансной частотой 150 кГц в полуконтактном режиме. Исследование выполнено в пяти независимых экспериментах. Изображения обработаны с помощью программного обеспечения Nova (NT-MDT, Россия). Распределение высот в препарате раствора Хэнкса без  $\text{CaCl}_2$  (препарат контроля) составило диапазон от 15 до 50 нм.

### **2.5.2.4 Трансмиссионная электронная микроскопия микровезикул клеток линии НК-92**

Для приготовления препаратов 10мкл суспензии МВ клеток линии НК-92 в растворе Хэнкса без  $\text{CaCl}_2$ , а также супернатанты после выделения МВ, и профильтрованный раствор Хэнкса без  $\text{CaCl}_2$  смешивали с 5% глутаровым альдегидом в равных количествах. Капли полученного раствора помещали на медные сетки 300 меш, покрытые углеродом (Electron Microscopy Sciences, США), и инкубировали 1 минуту. Затем сетки промывали деионизированной водой. Образцы контрастировали в смеси 2% раствора уронил ацетата (SPI, США) и 0,5 сахарозы (Sigma, США). Получали изображения препаратов с использованием трансмиссионного электронного микроскопа Jeol JEM 1400 (Япония), ускоряющее напряжение

90 кВ, с помощью боковой камеры Olympus Veleta (100 000-250 000-кратное увеличение, Япония). Выполнено пять независимых экспериментов.

Также анализировали срезы сухого осадка МВ. Для этого осадок МВ помещали в эпоксидную смолу (Electron Microscopy Sciences, США), предварительно смешивая с 5% глутаровым альдегидом, промывая раствором Хэнкса без  $\text{CaCl}_2$ , фиксируя 1%  $\text{OsO}_4$  (Electron Microscopy Sciences, США) и проведя стандартные спиртовую и ацетоновую проводку. Затем получали срезы препаратов толщиной 70 нм, регистрировали изображения препаратов с помощью трансмиссионного электронного микроскопа Jeol JEM 2100 (Япония), ускоряющее напряжение 160 кВ, используя камеру Galan Ultrascan 4000 (100 000-250 000-кратное увеличение). Исследование МВ с применением трансмиссионной электронной микроскопии выполнено на базе Ресурсного Центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ совместно с сотрудником ресурсного центра Ивановой А.Н., за что автор выражает ей благодарность.

#### ***2.5.2.5 Фенотипический анализ микровезикул клеток линии NK-92 методом проточной цитофлюориметрии***

Клетки линии NK-92 помещали в 24-луночный планшет в 1 мл полной среды  $\alpha$ -MEM в концентрации  $4 \times 10^5$  кл/мл, культивировали при 37°C во влажной атмосфере с 5%  $\text{CO}_2$  в течение 24 часов в присутствии индуктора  $\text{TNF}\alpha$  (10 МЕ/мл, 50 МЕ/мл, 400 МЕ/мл),  $\text{IFN}\gamma$  (40 МЕ/мл, 400 МЕ/мл, 1000 МЕ/мл),  $\text{IL-1}\beta$  (10 нг/мл, 100 нг/мл, 1000 нг/мл), или PMA (10 нг/мл) или без него. Через сутки планшеты центрифугировали при 200g, 22°C в течение 10 минут для осаждения клеток, затем из супернатанта выделяли МВ, как описано выше (п.2.5.2.1). Полученные МВ, а также клетки, полученные после центрифугирования при 200g, обрабатывали моноклональными антителами к CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD119, CD54, CD95, CD56 в соответствии с указаниями производителя (BD, США). Экспрессию рецепторов NK-клетками и МВ оценивали методом высокоточной проточной цитофлюориметрии с помощью проточного цитофлюориметра Cytotflex (Beckman Coulter, США), который позволяет детектировать частицы размером от 0,1 мкм. Для настройки прибора использовали калибровочные частицы размером 0,1 мкм; 0,2 мкм; 0,5 мкм; 1,0 мкм (Invitrogen, США) в соответствии с указаниями производителя прибора (Рисунок 2.13).

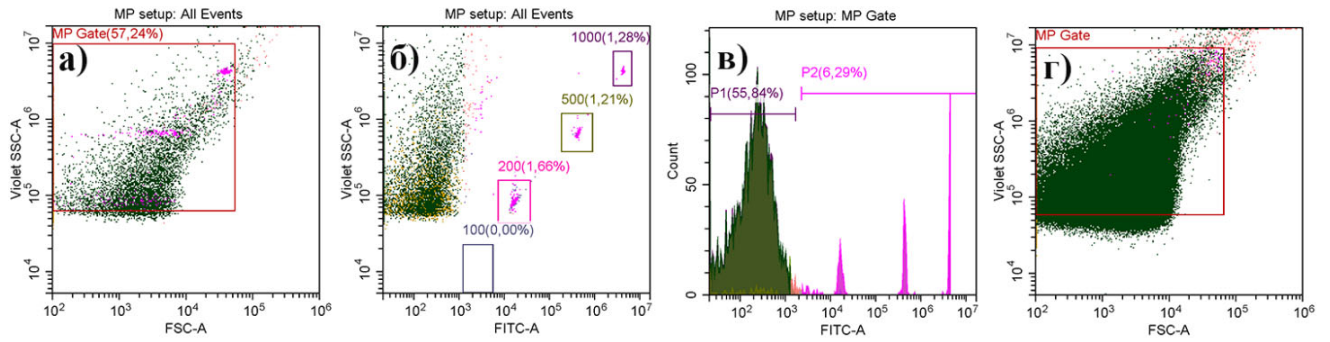


Рисунок 2.13 - Графики распределения калибровочных частиц, меченных флуоресцентным красителем FITC, и MB, образованных НК-клетками линии NK-92. Калибровочные частицы в координатах: а) FSC-Violet SSC (Violet SSC - параметр бокового светорассеяния, полученный при использовании лазера 405 нм и фильтра 405/10); б) FITC - Violet SSC (содержит калибровочные частицы размером 200нм, 500 нм, 1000нм); в) FITC - count (гистограмма распределения калибровочных частиц размером 200нм, 500 нм, 1000нм); г) MB NK-клеток в координатах FSC - Violet SSC

Проанализированы пробы от двух независимых экспериментов, по три повтора для каждого индуктора. Стратегии гейтирования для оценки экспрессии рецепторов отражены для клеток линии NK-92 на рисунке 2.14, для MB клеток линии NK-92 на рисунке 2.15. В качестве отрицательного контроля использовали пробы, обработанные изотипическими контролями.

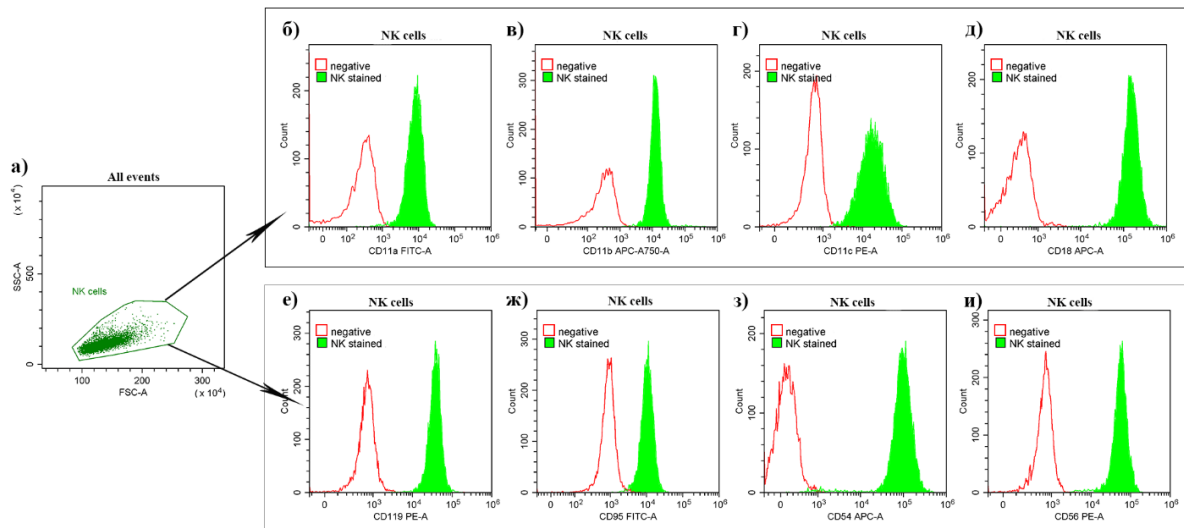


Рисунок 2.14 - Графики распределения клеток линии NK-92, обработанные изотипическими антителами (negative control) и антителами к CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD119, CD95, CD54, CD56 (NK stained). Распределение клеток в координатах а) FSC-SSC, гистограммы распределения экспрессии б) CD11a (FITC), в) CD11b (APC-A 750), г) CD11c (PE), д) CD18 (APC), е) CD119 (PE), ж) CD95 (FITC), з) CD54 (APC), и) CD56 (PE)

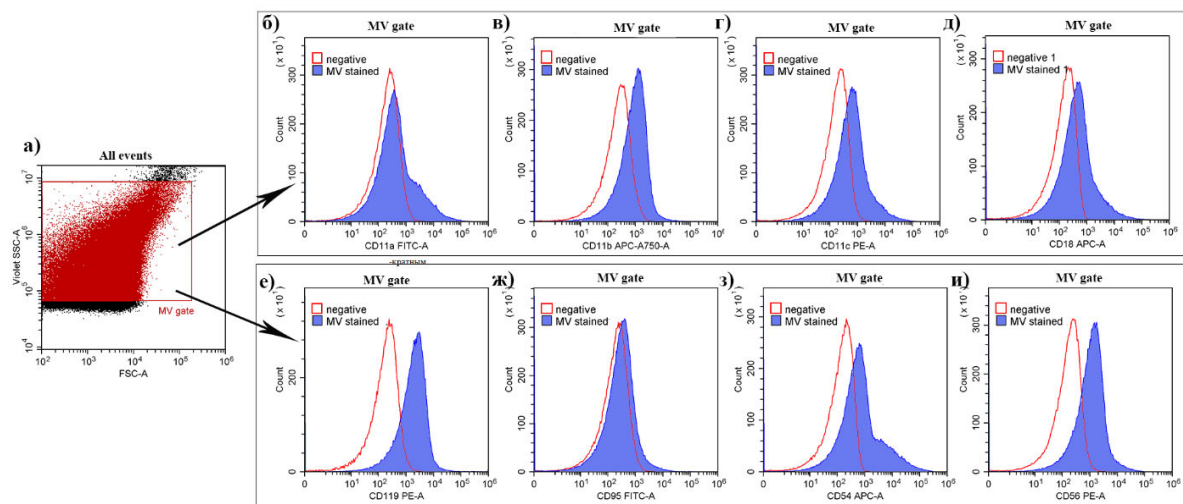


Рисунок 2.15 - Графики распределения МВ клеток линии NK-92, обработанные изотипическими антителами (negative control) и антителами к CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD119, CD95, CD54, CD56 (NK stained). Распределение МВ клеток в координатах а) FSC-SSC (Violet 405нм), гистограммы распределения экспрессии б) CD11a (FITC), в) CD11b (APC-A750), г) CD11c (PE), д) CD18 (APC), е) CD119 (PE), ж) CD95 (FITC), з) CD54 (APC), и) CD56 (PE)

### 2.5.2.6 Оценка содержания гранзима В и перфорины в микровезикулах клеток линии NK-92

Для определения наличия GrzB и перфорины в МВ клетки линии NK-92 культивировали в культуральных флаконах в концентрации  $4 \times 10^5$  кл/мл, без и в присутствии индукторов TNF $\alpha$  (50 ЕД/мл), IFN $\gamma$  (400 ЕД/мл), IL-1 $\beta$  (100 нг/мл), PMA (10 нг/мл). Затем выравнивали пробы по содержанию общего белка (оценка по Бредфорду) и применяли метод WesternBlot, для этого МВ выделяли методом дифференциального центрифугирования (п. 2.5.2.1). Полученные МВ лизировали в буфере RIPA (Sigma, США) с добавлением полной смеси ингибиторов протеаз (Roche Diagnostic GmbH, Германия) как описано выше (п.2.3.4). Затем образцы разделяли в 10% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по методу Лэммли и переносили на мембраны PVDF (BioRad, США). Мембраны блокировали раствором 2%-ного альбумина (Sigma, США), а затем инкубировали с первичным моноклональными мышинными антителами к GrzB (1:1000, Biolegend, США) или к перфोरину (1:1000, eBioscience Inc., США) при 4 °C в течение ночи. После инкубации с соответствующими HRP-конъюгированными вторичными антителами (1:1000, Cell Signaling, США), визуализацию результатов проводили методом хемилюминисценции (ECL GE Healthcare, Упсала, Швеция), использовали программное обеспечение ImageLab. Проанализированы пробы от пяти независимых экспериментов.

### ***2.5.2.7 Оценка переноса флуоресцентной метки от микровезикул клеток линии NK-92 клеткам линии JEG-3***

Клетки линии JEG-3 вносили во флаконы площадью 25 см<sup>2</sup> (BD, США) в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток в 3 мл культуральной среды, содержащей 10% ЭТС, культивировали 24 часа. Для окраски внутриклеточного белка клетки линии NK-92 обрабатывали раствором 5(6)-карбоксифлуоресцеина диацетат сукцинилмидилового эфира (CFSE) (Sigma-Aldrich Chem. Co., США) в концентрации 50 мкМ в соответствии с указаниями производителя. Часть клеток линии NK-92 оставляли интактными. Затем интактные и окрашенные клетки линии NK-92 культивировали 24 часа во флаконах площадью 75 см<sup>2</sup> в 40 мл полной культуральной среды с концентрацией клеток  $4 \times 10^5$  в 1 мл. Выделяли МВ описанным выше способом. Затем на 1 флакон клеток линии JEG-3 добавляли МВ, выделенные из  $24 \times 10^6$  клеток линии NK-92 (концентрация по общему белку МВ: 80 мкг), инкубировали 24 часа. Затем трижды отмывали клетки раствором версена и дважды ресуспендировали в растворе Хенкса без CaCl<sub>2</sub> и центрифугировали при 200g 10 мин., избавляясь от супернатанта. Оценивали включение флуоресцентной формы CFSE в клетки линии JEG-3 с помощью цитофлуориметра FACS Canto II (BD, США). Эксперименты повторяли трижды.

### ***2.5.2.8 Оценка влияния микровезикул клеток линии NK-92 на фенотип клеток трофобласта***

Накануне эксперимента клетки линии JEG-3 вносили во флаконы площадью 25 см<sup>2</sup> в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток в 3 мл культуральной среды, содержащей 10% ЭТС, культивировали 24 часа. Клетки линии NK-92 культивировали 24 часа во флаконах площадью 75 см<sup>2</sup> в 40 мл полной культуральной среды с концентрацией клеток  $4 \times 10^5$  в 1 мл. Выделяли МВ описанным выше способом. Затем на 1 флакон клеток линии JEG-3 добавляли МВ от  $24 \times 10^6$  клеток линии NK-92 (концентрация по общему белку МВ: 80 мкг) и инкубировали 24 часа. В качестве контроля использовали интактные клетки линии JEG-3; в качестве положительного контроля использовали клетки линии JEG-3, активированные IL-1 $\beta$ . После инкубации клетки трижды отмывали раствором версена и дважды ресуспендировали в растворе Хенкса без CaCl<sub>2</sub> и центрифугировали при 200g 10 мин., избавляясь от супернатанта. Для контроля жизнеспособности клеток трофобласта проводили обработку клеток раствором 7-AAD (BD, США), затем оценивая с помощью проточного цитометра FACS Canto II количество мертвых клеток по включению в них красителя, как это было описано ранее [707]. Количество нежизнеспособных клеток линии JEG-3 после культивирования с МВ клеток линии NK-92 составило  $7.9\% \pm 2,1$ . Затем клетки линии JEG-3 обрабатывали раствором, блокирующим Fc-



рецепторы, в соответствии с указаниями производителя (Miltenyi Biotec, США). После этого клетки линии JEG-3 обрабатывали моноклональными антителами против CD45, CD54, CD56, CD105, CD126, CD130, CD181, CD119 (BD, США), CD120a (R&D Systems, США), а также изотипическими антителами в соответствии с указаниями производителя. Выбор антител был основан на данных об изменении фенотипа клеток линии JEG-3 в присутствии цитокинов, полученных в отделе иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «НИИ АГиР им.Д.О.Отта» [611], а также собственных данных фенотипирования клеток линии NK-92 и их микровезикул. Флуоресценцию анализировали с помощью проточного цитофлуориметра FACS Canto II (Becton Dickinson, США). Анализ экспрессии рецепторов повторяли в четырех независимых экспериментах.

#### ***2.5.2.9 Оценка влияния микровезикул клеток линии NK-92 на пролиферацию и миграцию клеток трофобласта линии JEG-3***

Для оценки влияния МВ клеток линии NK-92 на пролиферацию клеток линии JEG-3 использовали метод, основанный на окраске белковых компонентов цитоплазмы клеток витальным красителем кристаллическим фиолетовым. Чувствительность этого метода сопоставима с другими методами оценки пролиферации [6], в том числе и для клеток трофобласта [611]. За сутки до эксперимента  $4 \times 10^3$  клеток линии JEG-3 вносили в 0,1 мл среды (10% ЭТС) в лунки 96-луночного плоскодонного планшета и культивировали 24 часа. Затем среду заменяли разведениями МВ клеток линии NK-92 в трех концентрациях по общему белку МВ: 2 мкг/100 мкл, 10 мкг/100 мкл и 20 мкг/100 мкл, приготовленные на культуральной среде для клеток линии JEG-3, содержащей 2% ЭТС. Затем клетки культивировали 72 часа. В качестве контроля использовали культуральную среду, содержащую 2% ЭТС; среда, содержащая 10% ЭТС, являлась положительным контролем. Затем клетки линии JEG-3 обрабатывали 0,2% раствором кристаллического фиолетового, с 5% содержанием метанола, добавляя (100 мкл) в каждую лунку и инкубируя 10 минут. Затем клетки промывали дистиллированной водой четыре раза и высушивали планшет. Экстрагирование красителя проводили 50% раствором уксусной кислоты. Оптическую плотность обработанных красителем образцов оценивали с помощью Labsystems Microplate Reader (Финляндия) на длине волны 540 нм (отсекающая 620 нм). Полученные оптические плотности переводили в количество клеток при помощи кривой титрования и выражали результаты в количестве клеток. Об изменении уровня пролиферации судили по изменению оптической плотности пробы и количеству клеток по сравнению с инкубацией в культуральной среде клеток линии JEG-3 с добавлением 2% ЭТС без МВ. Каждая

концентрация МВ внутри каждого эксперимента была проанализирована в трех повторах. Эксперименты проводили независимо, трижды.

Для оценки миграции использовали вставки с поликарбонатными фильтрами (размер пор 8 мкм, BD, USA) для 24-луночных планшетов. Клетки линии JEG-3 ( $1 \times 10^5$ ) в 300 мкл культуральной среды с добавлением 2% ЭТС вносили в верхнюю камеру вставки и инкубировали 3 часа для прикрепления клеток. Затем в те же вставки вносили МВ так, чтобы конечная концентрация по белку составила 20 мкг/100 мкл и инкубировали 24 часа. После инкубации клетки фиксировали на фильтрующей поверхности поликарбонатных вставок 70% раствором этанола с последующим окрашиванием гематоксилином Майера. Клетки на верхней части поликарбонатного фильтра удаляли ватным диском. Клетки, мигрировавшие на нижнюю поверхность поликарбонатного фильтра, фотографировали (Рисунок 2.16) с нижней стороны при помощи инвертированного микроскопа AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Германия). Каждый эксперимент повторяли трижды, в каждой лунке было выбрано не менее 8 полей зрения. С помощью программного обеспечения AxioVision (Carl Zeiss, Германия) оценивали относительное количество ядер мигрировавших клеток и площадь, занимаемую мигрирующими клетками ( $\mu\text{м}^2$ ). Миграция клеток после инкубации в среде с 2% ЭТС служила контролем; клетки, инкубированные в среде с 10% ЭТС, служили положительным контролем (Рисунок 2.16).

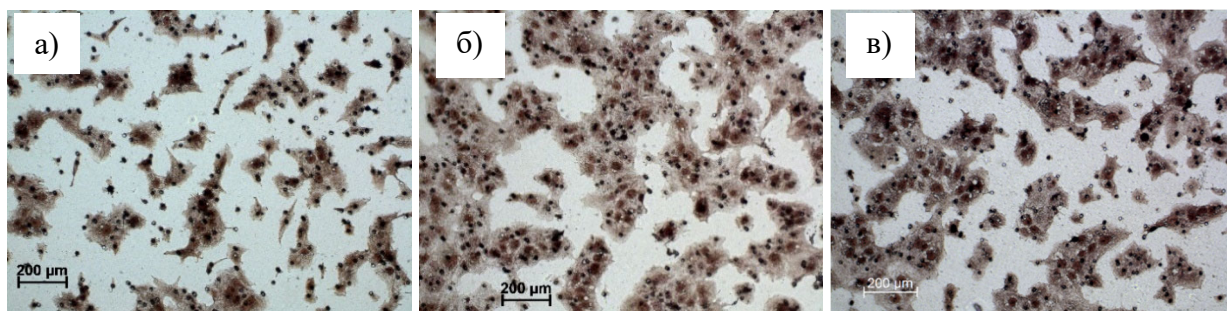


Рисунок 2.16 - Миграция клеток линии JEG-3 в присутствии: а) среды DMEM с добавлением 2% ЭТС (спонтанный уровень); б) среды DMEM с добавлением 10% ЭТС; в) среды DMEM с добавлением 2% ЭТС и МВ клеток линии NK-92. Препарат окрашен гематоксилином Майера, увеличение  $\times 100$

#### **2.5.2.10 Оценка влияния микровезикул клеток линии NK-92 на активацию внутриклеточной передачи сигнала в клетках трофобласта линии JEG-3**

Оценивали фосфорилирование внутриклеточных мессенджеров ERK1/2, STAT1 и STAT 3. Для этого полученный осадок МВ клеток линии NK-92, а также интактные клетки линии JEG-3 или клетки линии JEG-3, обработанные МВ клеток NK-92 трижды промывали охлажденным

фосфатным буфером (0,01М PBS, pH 7,4) и лизировали в буфере RIPA (50 мМ Трис-НСl pH=8,1 1% Тритон X-100, 0,1 % додецилсульфата натрия (SDS), 0,5 % дезоксихолата натрия, 1 мМ ЭДТА, 150 мМ хлорида натрия), содержащим коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз (Sigma, США). Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 16000g (4°C, 10 мин.). Концентрацию общего белка в супернатантах оценивали по методу Бредфорда как указано выше. Образцы клеточных лизатов с равным содержанием белка разделяли в 10% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по Лэммли и переносили на PVDF-мембрану с помощью системы Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad, США). PVDF-мембраны блокировали 2% BSA (AppliChem GmbH, Германия) в трис-буферном солевом растворе, содержащем 0,1% Tween-20 (TBST, Bio-Rad, США), в течение 1,5 ч при комнатной температуре. В течение ночи мембраны при 4° С инкубировали с первичными моноклональными антителами против STAT3 (Rabbit mAb 1:1000), phospho-STAT3 (S727) (Mouse mAb 1:1000), phospho-STAT3 (Y705) (Mouse mAb 1:1000), ERK1/2 (p44/42 MAPK (ERK1/2), Mouse mAb 1:2000), phospho-ERK1/2 (phospho-p44/42 MAPK, rabbit mAb 1:1000), STAT1 (Rabbit mAb, 1:1000), phospho-STAT1 (Ser727) (Rabbit mAb 1:1000), phospho-STAT1 (Tyr701) (Rabbit mAb 1:1000) (Cell Signaling technology, США). В качестве контроля нагрузки белка для клеточных лизатов использовали глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH) (1:1000; Cell Signaling Technology, США). После реакции с соответствующим вторичным антителом (1:1000; Cell Signaling Technology, США) сигналы визуализировали на ChemiDoc™ Touch Gel Imaging System (Bio-Rad, США) с помощью усиленной хемилюминесценции (Clarity Western ECL Substrate; Bio-Rad, США). Интенсивность полос, полученных в результате иммуноблоттинга, оценивали с помощью программного обеспечения ImageLab (Bio-Rad, США). Различные формы белков STAT и ERK1/2 были нормализованы по GAPDH. Активацию STAT оценивали как отношение обнаруженной фосфорилированной формы STAT (phospho-STAT) к уровню общего STAT и выражали в условных единицах. Сходным образом оценивали активацию ERK1/2. Все эксперименты независимо друг от друга повторяли трижды.

## **2.6 Дизайн и методы исследования «Оценка цитотоксической функции клеток линии НК-92 в отношении клеток трофобласта линии JEG-3»**

Исследование включало следующие этапы:

- 1) оценка гибели клеток-мишеней линии К-562 и клеток трофобласта линии JEG-3 после инкубации с клетками линии НК-92;
- 2) определение влияния КС или отдельных цитокинов на цитотоксичность НК-клеток в отношении клеток трофобласта;

3) оценка экспрессии NK-клетками проапоптотических рецепторов DR4, DR5, DcR1, CD107a, Fas и FasL в условиях культивирования в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3, цитокинов и КС ворсин хориона;

4) определение содержания GrzB и перфорина в клетках линии NK-92 и каспаз 3 и 8 в клетках линии JEG-3 после контактного и дистантного взаимодействия;

5) оценка цитотоксичности клеток линии NK-92 после их совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3;

6) определение содержания перфорина, гранзимов и серпинов в клетках линий NK-92 после их совместного культивирования;

7) определение содержания перфорина, гранзимов и серпинов в клетках линий JEG-3 после их совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3 (Рисунок 2.17).

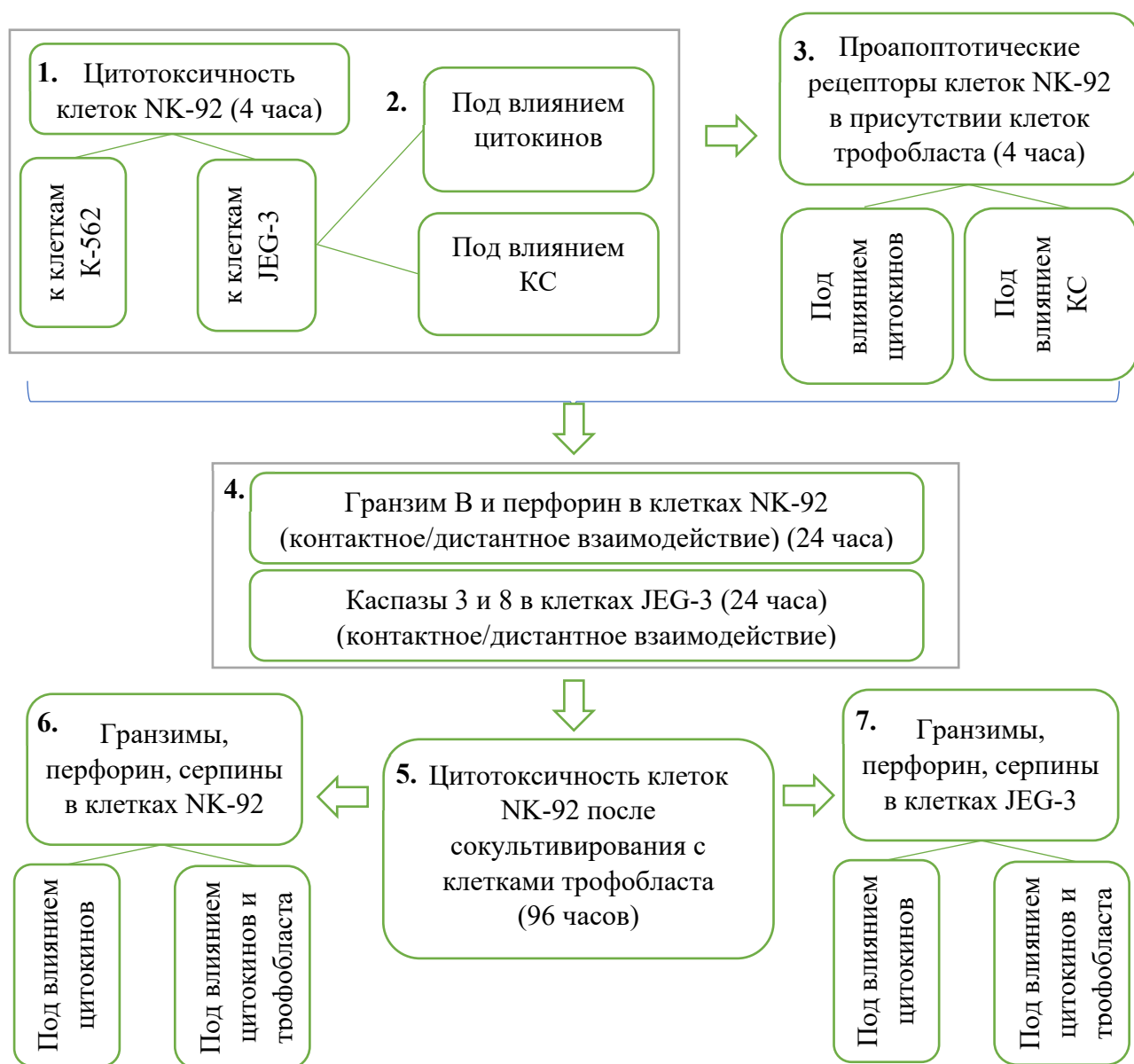


Рисунок 2.17 - Дизайн исследования по оценке параметров цитотоксической функции клеток линии NK-92 в отношении клеток трофобласта

Влияние цитокинов на цитотоксичность клеток линии NK-92 в отношении клеток линии K-562 и клеток линии JEG-3 оценивали, инкубируя смесь NK-клеток с клетками-мишенями в течение 4 часов, а также предварительно прокультивировав NK-клетки с цитокинами в течение 24 часов. Оценку проапоптотических рецепторов клеток линии NK-92 проводили после совместной инкубации NK-клеток с клетками трофобласта линии JEG-3 в течение 4 часов. Содержание GrzB, перфорины, каспаз 3 и 8 в NK-клетках и клетках трофобласта оценивали после контактного и дистантного культивирования клеток линий NK-92 и JEG-3 в течение 24 часов. Для оценки цитотоксической функции NK-клеток в модели длительного совместного культивирования с клетками трофобласта проводили предварительную экспозицию NK-клеток цитокинам в течение 96 часов. Также оценили цитотоксическую функцию NK-клеток в отношении клеток линии K-562 после непосредственной экспозиции клеток линии NK-92 клеткам трофобласта линии JEG-3 в течение 96 часов. Определение содержания перфорины, гранзимов и серпинов проведено в сокультуре клеток линии NK-92 и JEG-3 после контактного культивирования в течение 96 часов.

Гибель клеток-мишеней, экспрессию NK-клетками проапоптотических рецепторов, в также содержание гранзимов, перфорины и серпинов в NK-клетках и клетках трофобласта оценивали с помощью проточного цитофлуориметра FACSCanto II (BD, США). Для выявления GrzB и перфорины в NK-клетках, и каспаз 3 и 8 в клетках трофобласта применяли метод Western Blot.

Оценка цитотоксической активности клеток линии NK-92 в отношении клеток линий K-562 и JEG-3, и содержания проапоптотических белков в клетках линии NK-92 выполнена совместно с сотрудником отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий Баженовым Д.О., за что автор выражает ему благодарность.

### **2.6.1 Оценка гибели клеток-мишеней линии K-562 после инкубации с клетками линии NK-92**

За сутки до эксперимента проводили пересев клеток линии K-562. Через 24 часа клетки линии K-562 обрабатывали CFSE (Sigma, США) в конечной концентрации 4 мкМ и инкубировали в темноте 10 мин при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Затем клетки линии K-562 трижды омывали холодной (4°C) культуральной средой и вносили в лунки круглодонного 96-луночного планшета (BD, США) по  $5 \times 10^4$  клеток линии K-562 в 50 мкл полной среды  $\alpha$ -MEM. В эти же лунки добавляли 100 мкл среды  $\alpha$ -MEM с клетками линии NK-92, достигая соотношений мишень:эффектор - 1:1, 1:2, 1:5, 1:8, 1:10. После этого в каждую лунку добавляли IL-2 (75 Ед). Планшет центрифугировали 3 минуты 100g и инкубировали 4 часа (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). После

инкубации клетки обрабатывали в течение 10 минут раствором пропидий иодида (2 мкг/мл, Sigma, США) при 4°C. Анализ флуоресценции проводили, используя стратегию гейтирования, представленную на Рисунке 2.18 (Рисунке 2.18 а,б). Проведено три независимых эксперимента, с тремя повторами внутри каждого эксперимента для каждого соотношения клеток.

Также оценили гибель клеток линии К-562 после инкубации с клетками линии NK-92, которые были предварительно в течение 24 часов прокультивированы в присутствии цитокинов. Для этого клетки линии NK-92 прокультивировали в планшетах в концентрации  $4 \times 10^5$  клеток в 1 мл полной среды  $\alpha$ -MEM в присутствии IL-15 (10 нг/мл), IL-18 (10 нг/мл), TNF $\alpha$  (50 Ед/мл), IFN $\gamma$  (1000 Ед/мл), IL-10 (10 нг/мл) или TGF $\beta$  (5 нг/мл) в течение 24 часов. Затем NK-клетки собирали в пробирки, центрифугировали при 200g 10 минут, добавляли раствор Хенкса и вновь центрифугировали, удаляя таким образом среду с цитокинами. Затем клетки линии NK-92 помещали в 96-луночный планшет к клеткам линии К-562 в соотношении «эффектор:мишень» 5:1, и инкубировали 4 часа и анализировали, как описано выше. Проведено три независимых эксперимента для каждого цитокина, с четырьмя повторами внутри каждого эксперимента.

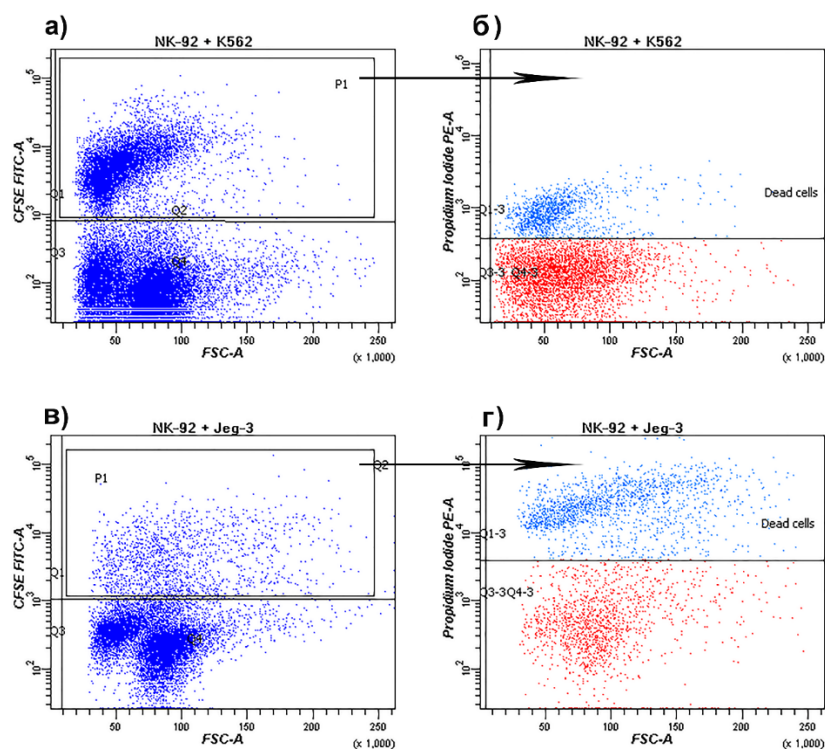


Рисунок 2.18 - Стратегия гейтирования клеток-мишеней после культивирования с клетками линии NK-92. Двумерная гистограмма распределения клеток линии К-562 (а) и клеток трофобласта линии JEG-3 (в), обработанных CFSE, после культивирования с клетками линии NK-92, в координатах FSC/CFSE. События из региона P1 отражены на двумерных гистограммах в координатах FSC/Propidium Iodide, оценивают количество клеток, включивших краситель пропидия иодид (Propidium Iodide), линии К-562 (б), JEG-3 (г)

### 2.6.2 Оценка гибели клеток трофобласта линии JEG-3 после инкубации с клетками линии NK-92 в присутствии цитокинов или кондиционированных сред ворсин хориона

За сутки до эксперимента пересевали клетки линии JEG-3 в концентрации  $3 \times 10^6$  клеток в 10 мл полной среды DMEM. Через 24 часа клетки обрабатывали раствором 4 мкМ CFSE (Sigma, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Затем проводили дезинтеграцию монослоя обработанных CFSE клеток трофобласта с помощью смеси растворов версена и трипсина (3:1) (Biolog, Россия (BD, США)). В лунки круглодонного 96-луночного планшета вносили  $3 \times 10^4$  клеток линии JEG-3 в 50 мкл полной среды DMEM и клетки линии NK-92 в 100 мкл, в соотношении эффектор:мишень 5:1 и 10:1. После этого в каждую лунку вносили IL-2 (75 Ед). В полученную смесь добавляли цитокины в различных концентрациях или КС ворсин хориона. Использовали следующие концентрации цитокинов TNF $\alpha$  (10 Ед/мл, 50 Ед/мл, 400 Ед/мл), IFN $\gamma$  (40 Ед/мл, 400 Ед/мл, 1000 Ед/мл), IL-1 $\beta$  (10 Ед/мл, 100 Ед/мл, 1000 Ед/мл), IL-6 (1 нг/мл, 2,5 нг/мл, 4 нг/мл), IL-8 (1 нг/мл, 10 нг/мл, 100 нг/мл), IL-10 (50 Ед/мл, 100 Ед/мл, 200 Ед/мл), IL-4 (1 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл) VEGF (1 нг/мл, 10 нг/мл, 100 нг/мл), PLGF (1 нг/мл, 5 нг/мл, 20 нг/мл), bFGF (1 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл), TGF $\beta$  (1 нг/мл, 5 нг/мл, 10 нг/мл), GM-CSF (10 нг/мл, 100 нг/мл, 1000 нг/мл). Эксперименты с цитокинами проводили трижды с тремя повторами для каждой комбинации клеток и цитокинов. Эксперименты с КС ворсин хориона I и III триместров проведены с тремя повторами для каждой комбинации клеток с КС. Затем планшет центрифугировали 3 минуты 100g, после чего инкубировали 4 часа (37°C, 5% CO $_2$ ). После инкубации клетки обрабатывали в течение 10 минут раствором пропидия йодида (2 мкг/мл, Sigma, США) при 4°C.

Также оценили гибель клеток линии JEG-3 после инкубации с клетками линии NK-92, которые были предварительно прокультивированы в присутствии цитокинов. Для этого клетки линии NK-92 прокультивировали в планшетах в концентрации  $4 \times 10^5$  клеток в 1 мл полной среды  $\alpha$ -MEM в присутствии IL-15 (10 нг/мл), IL-18 (10 нг/мл), TNF $\alpha$  (50 Ед/мл), IFN $\gamma$  (1000 Ед/мл), IL-10 (10 нг/мл) или TGF $\beta$  (5 нг/мл) в течение 24 часов и 96 часов. Затем NK-клетки дважды отмывали от среды с цитокином раствором Хенкса и помещали в 96 луночный планшет к клеткам линии JEG-3 в соотношении «эффектор:мишень» 5:1, так как на предыдущем этапе установлено, при использовании этого соотношения гибель клеток трофобласта отличалась от базовой гибели. Затем клетки инкубировали 4 часа и анализировали, как описано выше. Оценена гибель клеток линии JEG-3 в трех независимых экспериментах, в каждом по три повтора для каждой комбинации клеток и цитокинов, с использованием стратегии гейтирования на Рисунке 2.18 (Рисунке 2.18 в,г).

### **2.6.3 Определение экспрессии проапоптотических рецепторов клеток линии NK-92 после инкубации с клетками трофобласта линии JEG-3 и цитокинами**

Клетки линии NK-92 инкубировали с клетками трофобласта линии JEG-3 в течение 4 часов в присутствии цитокинов IL-1 $\beta$  (100 Ед/мл), IL-15 (10 нг/мл), IL-18 (10 нг/мл), TNF $\alpha$  (50 Ед/мл), IL-10 (10 нг/мл), TGF $\beta$  (5 нг/мл) или КС ворсин хориона I и III триместра, как описано выше (п. 2.6.2). Затем клетки обрабатывали антителами к CD45, TRAIL, DR4, DR5, DcR1, CD107a, Fas и FasL в соответствии с рекомендациями производителя (BD, США). Эксперименты с цитокинами проводили трижды с тремя повторами для каждой комбинации клеток и цитокинов. Эксперименты с КС ворсин хориона I и III триместров проведены с тремя повторами для каждой комбинации клеток с КС.

### **2.6.4 Оценка содержания гранзима В и перфорина в клетках линии NK-92 и каспаз 3 и 8 в клетках линии JEG-3 после контактного и дистантного взаимодействия**

#### ***2.6.4.1 Дистантное сокультивирование NK-клеток и клеток трофобласта.***

Для обеспечения обмена растворимыми факторами и исключения прямого контакта между клетками использовали вставки с поликарбонатной мембраной с диаметром пор 1 мкм для 6-луночных планшетов (система «трансвелл», BD, США). Клетки линии JEG-3 инкубировали 24 часа до образования конфлюэнтного монослоя в нижней камере (лунка 6-луночного планшета) в концентрации  $1,2 \times 10^6$  клеток на лунку в 8 мл полной среды DMEM. На второй день удаляли 4 мл среды из каждой лунки и помещали в них вставку с поликарбонатной мембраной, в которую вносили  $1,8 \times 10^6$  клеток линии NK-92 в 4 мл полной среды  $\alpha$ -MEM. Затем клетки инкубировали 24 часа (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). В качестве контроля использовали интактные клетки линий NK-92 и JEG-3, проинкубированные отдельно.

#### ***2.6.4.2 Контактное сокультивирование NK-клеток и клеток трофобласта.***

Клетки линии JEG-3 культивировали во флаконах площадью 75 см<sup>2</sup> в полной ростовой среде DMEM в концентрации  $2 \times 10^6$  клеток/мл в течение 24 часов для достижения монослоя. Затем клетки линии JEG-3 обрабатывали раствором 4мкМ CFSE (Sigma, США). Затем к клеткам линии JEG-3 вносили клетки линии NK-92 в концентрации  $3 \times 10^6$  клеток/мл и инкубировали 24 часа (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). После инкубации клетки собирали из лунок, обрабатывая их раствором версена. В качестве контроля использовали клетки линий NK-92 и JEG-3, которые культивировали отдельно в аналогичных условиях.



Разделение клеток линии NK-92 и клеток линии JEG-3 после их контактного сокультивирования проводили при помощи проточного сортировщика клеток FACS Aria III (BD, США), как описано выше (п.2.3.4). Применяли протокол Purity и сопло диаметром 85 мкм. Популяцию клеток линии NK-92 выделяли по фенотипу CD45<sup>+</sup>, клетки линии JEG-3 - по включению окраски CFSE. Во всех случаях чистота выделения клеток линии NK-92 и клеток линии JEG-3 составила не менее 99,0±1,0%. Долю жизнеспособных клеток после выделения на сортировщике оценивали с помощью обработки клеток раствором 7AAD (Biolegend, США), и она составила 91,6 % ± 2,9%.

#### ***2.6.4.3 Оценка содержания гранзима В и перфорина в клетках линии NK-92 и каспаз 3 и 8 в клетках линии JEG-3***

Определение содержания цитотоксических белков выполнено методом WesternBlot выполнена совместно с сотрудниками группы биохимии ФГБНУ «НИИ АГиР им.Д.О.Отта», руководитель д.б.н. Корневский А.В., исполнитель к.б.н. Милютин Ю.П., за что автор выражает им благодарность. Для анализа содержания GrzB и перфорина поставлено шесть независимых экспериментов по контактному и дистантному сокультивированию. Для анализа содержания каспаз 3 и 8 проводили четыре независимых эксперимента по контактному и дистантному сокультивированию. Клетки, полученные после экспериментов, обрабатывали как описано выше (п.2.3.1). Содержание прокаспаз и активных каспаз выявляли с помощью специфичных первичных антител к каспазе-8 (mouse Ab 1:1000, Cell Signaling, США), к каспазе-3 (rabbit Ab, 1:1000, Cell Signaling, США). Содержание белков литических гранул определяли с помощью моноклональных антител против GrzB (mouse Ab, 1:1000, Biolegend, США) или перфорина (mouse Ab, 1:1000, eBioscience Inc., США). После инкубации с HRP-конъюгированными козьими антителами против кролика или мыши (1:1000, BioRad, США), сигналы регистрировали с помощью усиленной хемилюминесценции (ECL GE, Швеция). Полученные данные были нормализованы по β-актину (rabbit Ab, Cell Signaling, США), либо по глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназе (GAPDH rabbit Ab, 1:1000, Cell Signaling, США). Активацию каспазы-3 оценивали, как отношение обнаруженного активного фрагмента каспазы-3 (p17), полученного в результате расщепления, к эндогенному уровню неактивного профермента каспазы-3 (p35). Активацию каспазы-8 рассчитывали, как отношение ее активного фрагмента (p18) к прокаспазе-8 (p57) и выражали в условных единицах.

### **2.6.5 Оценка цитотоксичности клеток линии NK-92 к клеткам линии K-562 после их совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3**

Эксперименты проводили по схеме сокультивирования для оценки параметров дифференцировки NK-клеток в присутствии клеток трофобласта, как описано выше (п.2.3.1). Для этого клетки линии JEG-3 помещали во флаконы для адгезионных клеточных культур в концентрации  $2 \times 10^5$  клеток в 1 мл среды. Через 24 часа клетки обрабатывали раствором CFSE (Sigma, США) и вносили клетки линии NK-92 в концентрации  $2 \times 10^5$  клеток в 1 мл полной среды  $\alpha$ -MEM, IL-2 (500 Ед/мл). После этого клетки культивировали в течение 96 часов. Затем клетки линии NK-92 отделяли от клеток линии JEG-3 с помощью клеточного сортера FACSAria III (BD, США) по фенотипу CD45+CD56+, используя протокол Purity и сопло диаметром 85 мкм. Затем полученные клетки линии NK-92 культивировали в полной среде  $\alpha$ -MEM в течение 24 часов для снижения негативного эффекта сортировки на функциональную активность NK-клеток. Через 24 часа оценивали цитотоксичность клеток линии NK-92 в отношении клеток мишеней линии K-562 описанным выше способом. Проведено четыре независимых эксперимента.

### **2.6.6 Определение содержания перфорина, гранзимов и серпинов в клетках линий NK-92 и JEG-3 после их совместного культивирования**

Клетки линии JEG-3 помещали в лунки 96-луночного планшета в 100 мкл полной ростовой среды DMEM по  $2 \times 10^5$  клеток/мл. Через 24 часа в часть лунок со сформировавшимся монослоем добавляли клетки линии NK-92 в 100 мкл полной ростовой среды по  $2 \times 10^5$  клеток/мл. Также клетки линии NK-92 помещали в пустые лунки. Во все лунки добавляли IL-2 (500 Ед/мл), в часть лунок добавляли цитокины IL-15 (10 нг/мл), IL-18 (10 нг/мл), TNF $\alpha$  (50 Ед/мл), IFN $\gamma$  (1000 Ед/мл), IL-10 (10 нг/мл) или TGF $\beta$  (5 нг/мл). Через 96 часов проводили внутриклеточную окраску белков с применением набора CytoFix/CytoPerm (BD, США). Затем содержимое лунок окрашивали антителами к: CD45, CD56, GrzA и GrzB, перфорину, цитокератину 7 (BD, США), серпинам B6 и B9 (NOVUS, США) а также HLA-G (Biolegend, США). Уровень неспецифического связывания антител оценивали по пробам, обработанным изотипическими антителами. После инкубации содержимое лунок отмывали в 200 мкл буфера «PermWash», затем ресуспендировали в 200 мкл буфера для окрашивания. Проанализировано четыре независимых эксперимента, по две повторности для каждой комбинации клеток и цитокинов.

## 2.7 Дизайн и методы исследования «Оценка цитотоксической функции NK-клеток периферической крови в отношении клеток трофобласта при привычном невынашивании беременности»

Исследование включало следующие этапы: 1) оценка цитотоксичности рNK-клеток в составе мононуклеаров в отношении клеток трофобласта линии JEG-3 у здоровых небеременных женщин без акушерского анамнеза, здоровых небеременных фертильных женщин и женщин в первом триместре беременности; 2) оценка цитотоксичности spNK-клеток, изолированных из фракции мононуклеаров, в отношении клеток трофобласта линии JEG-3 у здоровых небеременных женщин без акушерского анамнеза, здоровых небеременных фертильных женщин и женщин в первом триместре беременности; 3) оценка цитотоксичности рNK-клеток в отношении клеток трофобласта линии JEG-3 у небеременных женщин с ПНБ в разных фазах менструального цикла, беременных женщин с ПНБ в анамнезе, и сравнение с цитотоксичностью NK-клеток у здоровых небеременных женщин в разных фазах цикла и беременных женщин (Рисунок 2.19). Гибель клеток трофобласта линии JEG-3 после инкубации с NK-клетками оценивали с помощью проточного цитофлуориметра FACSCanto II (BD, США).

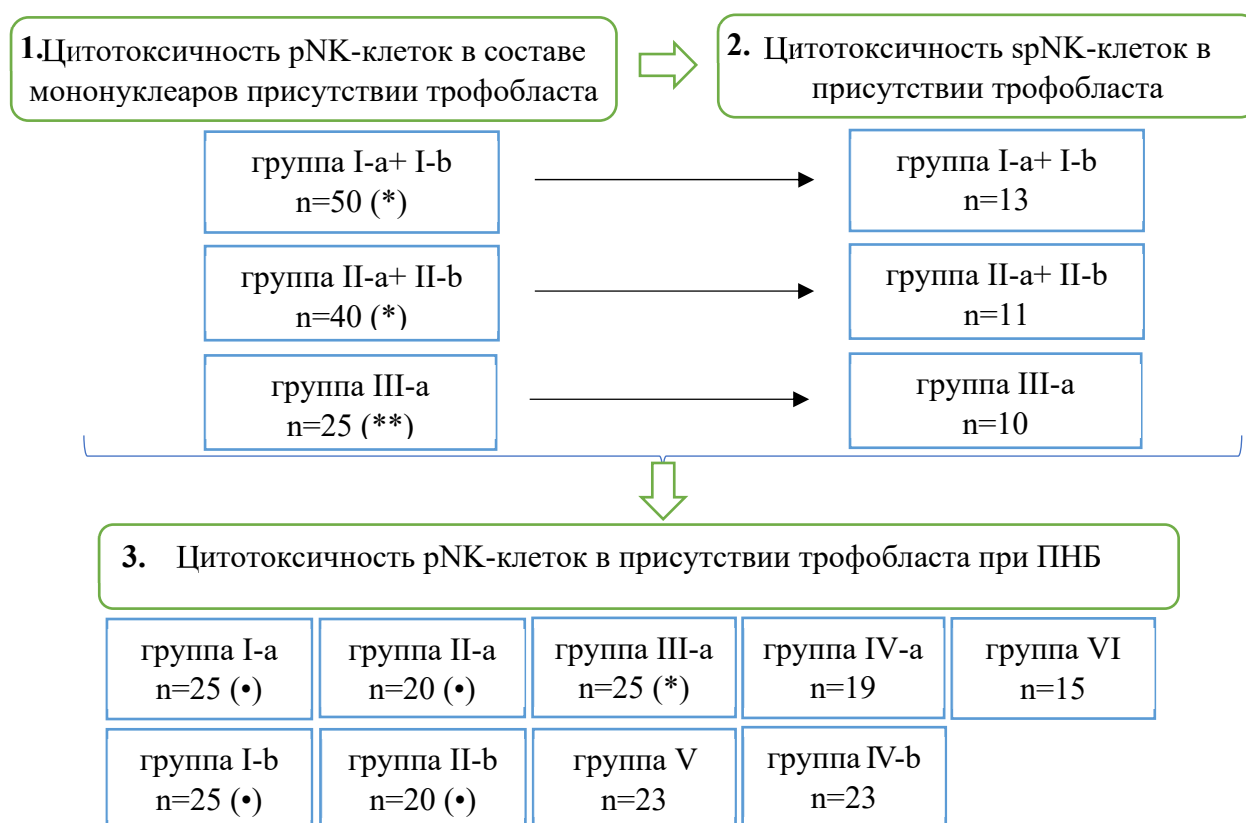


Рисунок 2.19 - Дизайн исследования для оценки цитотоксичности рNK-клеток в присутствии клеток трофобласта. (•) - данные, полученные для этих групп на этапе 1, разделены на подгруппы для этапа 3. (\*) - на этапе 3 использованы данные, полученные на этапе 1

### **2.7.1 Оценка цитотоксичности рНК-клеток и spNK-клеток периферической крови, в отношении клеток трофобласта, у здоровых небеременных женщин и беременных женщин в I триместре**

Клетки трофобласта пересеивали за сутки до эксперимента, затем обрабатывали раствором 4 мкМ CFSE как описано выше (п.2.6.2). Затем клетки линии JEG-3 помещали в 96-луночный планшет по  $3 \times 10^4$  клеток в 50 мкл полной среды DMEM. На первом этапе исследования в часть планшетов с клетками трофобласта также вносили мононуклеары периферической крови в 100 мкл среды в соотношении эффектор:мишень 10:1. На втором этапе исследования к клеткам трофобласта добавляли изолированные из состава мононуклеаров spNK-клетки в соотношении 5:1 в связи с ограниченным количеством клеточного материала после сортировки мононуклеарных фракций. Предварительно была проведена оценка влияния соотношения эффектор:мишень на цитотоксическую активность НК-клеток. Различий между гибелью клеток трофобласта в присутствии spNK-клеток в соотношении 5:1 и 10:1 не выявлено. В часть лунок с мононуклеарами вносили IL-2. Затем центрифугировали планшеты в течение 3 минут при 100g и инкубировали клетки в течение 4 часов. Часть клеток трофобласта инкубировали в культуральной среде без добавления мононуклеаров. Затем обрабатывали клетки раствором пропидий йодида (Sigma, США). Оценка цитотоксической активности spNK-клеток выполнена совместно с сотрудником отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий Баженовым Д.О., за что автор выражает ему благодарность.

### **2.7.2 Оценка цитотоксичности рНК-клеток в составе мононуклеаров, в отношении клеток трофобласта, у здоровых небеременных фертильных женщин и женщин с привычным невынашиванием беременности**

Использовали метод, описанный выше (п.2.7.1). Оценивали цитотоксичность рНК-клеток в составе мононуклеарной фракции в группах I, II, III-1, IV-a, IV-b. Группы небеременных женщин I и II были разделены по фазам цикла на подгруппы (a - пролиферативная фаза, b - секреторная фаза). Дополнительной группой контроля была группа здоровых мужчин, у которых оценивали цитотоксичность рНК-клеток к клеткам трофобласта линии JEG-3.

## **2.8 Статистическая обработка данных**

Статистическую обработку полученных данных проводили в программах Statistica 10 ([www.statsoft.com](http://www.statsoft.com), США) и GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, California, USA). Для оценки

распределения данных выборок применяли тест Шапиро-Уилка (the Shapiro-Wilk's test). Также проводили оценку наличия аномальных значений (outliers), в случае выявления таковых их исключали из анализа. Оценивали однородность дисперсий, используя тест Бартлета (Bartlett test). В случае равенства дисперсий применяли методы параметрической статистики: t-критерий Стьюдента для двух независимых переменных и однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) для множественных сравнений. Для представления данных применяли методы описательной статистики, рассчитывали среднее значение (M), ошибку среднего (SEM), стандартное отклонение (SD) для нормальных распределений. В случае распределения данных, отличного от нормального, применяли методы непараметрической статистики: ранговый критерий Манна-Уитни для независимых выборок (Mann-Whitney U test), критерий Уилкоксона для связанных выборок (Wilcoxon test), тест Краскела-Уоллиса (Kruskal-Wallis test) с последующим тестом множественных сравнений Данна (Dunn's post test). Для представления данных рассчитаны значения медиан (m), верхнего (75%) и нижнего (25%) квартилей, по которым построены боксовые диаграммы, минимум и максимум распределения обозначены «усами» бокса. Проведена иерархическая кластеризация интенсивности экспрессии рецепторов НК-клетками с использованием метода Варда (Ward's method). Корреляционный анализ проводили, рассчитывая ранговый коэффициент Спирмена (Spearman's rank correlation coefficient). Значение коэффициента корреляции (r) менее |0.70| расценивали, как отсутствие достоверной корреляции. В случае коэффициента корреляции  $r > +0,7$  считали, что между признаками выявлена прямая корреляционная связь, в случае  $r < -0,7$  - обратная корреляционная связь. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### **ГЛАВА 3. ВЛИЯНИЕ КЛЕТОК ТРОФОБЛАСТА НА ФЕНОТИП И ФУНКЦИИ АДГЕЗИИ И ТРАНСМИГРАЦИИ НК-КЛЕТОК В ПРИСУТСТВИИ ЦИТОКИНОВ И КОНДИЦИОНИРОВАННЫХ СРЕД ВОРСИН ХОРИОНА I И III ТРИМЕСТРОВ БЕРЕМЕННОСТИ**

Для анализа фенотипа клеток линии JEG-3 и клеток линии НК-92 в присутствии цитокинов и КС ворсин хориона, определения секреции клетками трофобласта цитокинов и анализа функций адгезии и трансмиграции НК-клеток через клетки трофобласта, клетки культивировали в присутствии индукторов в течение 24 часов, как описано выше (п.2.2.1 - п.2.2.3, п.2.2.5 - п.2.2.7). Для определения взаимного расположения НК-клеток и клеток трофобласта при в процессе трансмиграции совместное культивирования клеток проводили также в течение 24 часов (п.2.2.4).

#### **3.1 Фенотипические изменения клеток трофобласта линии JEG-3 в присутствии цитокинов**

Продемонстрировано, что клетки линии JEG-3 в случае культивирования без индукторов экспрессируют рецепторы CD105, TGF $\beta$ R2, TNFR2, CD49e, CD49f, CD181, CD192, CD29, CD104, CD54, CD130, LeptinR. Анализ фенотипа клеток линии JEG-3 проводили как на интактных, так и на активированных цитокинами клетках. Установлено, что в присутствии цитокинов VEGF (100 нг/мл, 10 нг/мл), IL-6 (4 нг/мл, 2 нг/мл), IFN $\gamma$  (1000 Ед/мл, 400 нг/мл), IL-1 $\beta$  (1000 нг/мл) относительное количество клеток линии JEG-3, несущих на своей поверхности TGF $\beta$ R2, было выше по сравнению с интактными клетками линии JEG-3 (Рисунок 3.1а). Количество клеток линии JEG-3, несущих на своей поверхности TNFR2, было больше в присутствии VEGF в концентрации 100 нг/мл по сравнению с интактными клетками. Цитокин IL-4 в концентрации 1 нг/мл увеличивал относительное количество клеток линии JEG-3, несущих на своей поверхности CD54 и рецептор к лептину (Рисунок 3.1б).

Интенсивность экспрессии клетками линии JEG-3 рецептора CD29 была выше в присутствии PLGF в концентрациях 20 нг/мл и 5 нг/мл по сравнению с интактными клетками (Рисунок 3.1в). Интенсивность экспрессии клетками линии JEG-3 рецептора CD54 была повышена в присутствии VEGF во всех использованных концентрациях (100 нг/мл, 10 нг/мл и 1 нг/мл) по сравнению с интактными клетками (Рисунок 3.1в). Интенсивность экспрессии клетками линии JEG-3 рецептора CD104 была повышена в присутствии VEGF в концентрациях 10 нг/мл и 1 нг/мл по сравнению с интактными клетками (Рисунок 3.1г). Остальные цитокины не влияли на изменение экспрессии рецепторов клетками линии JEG-3.

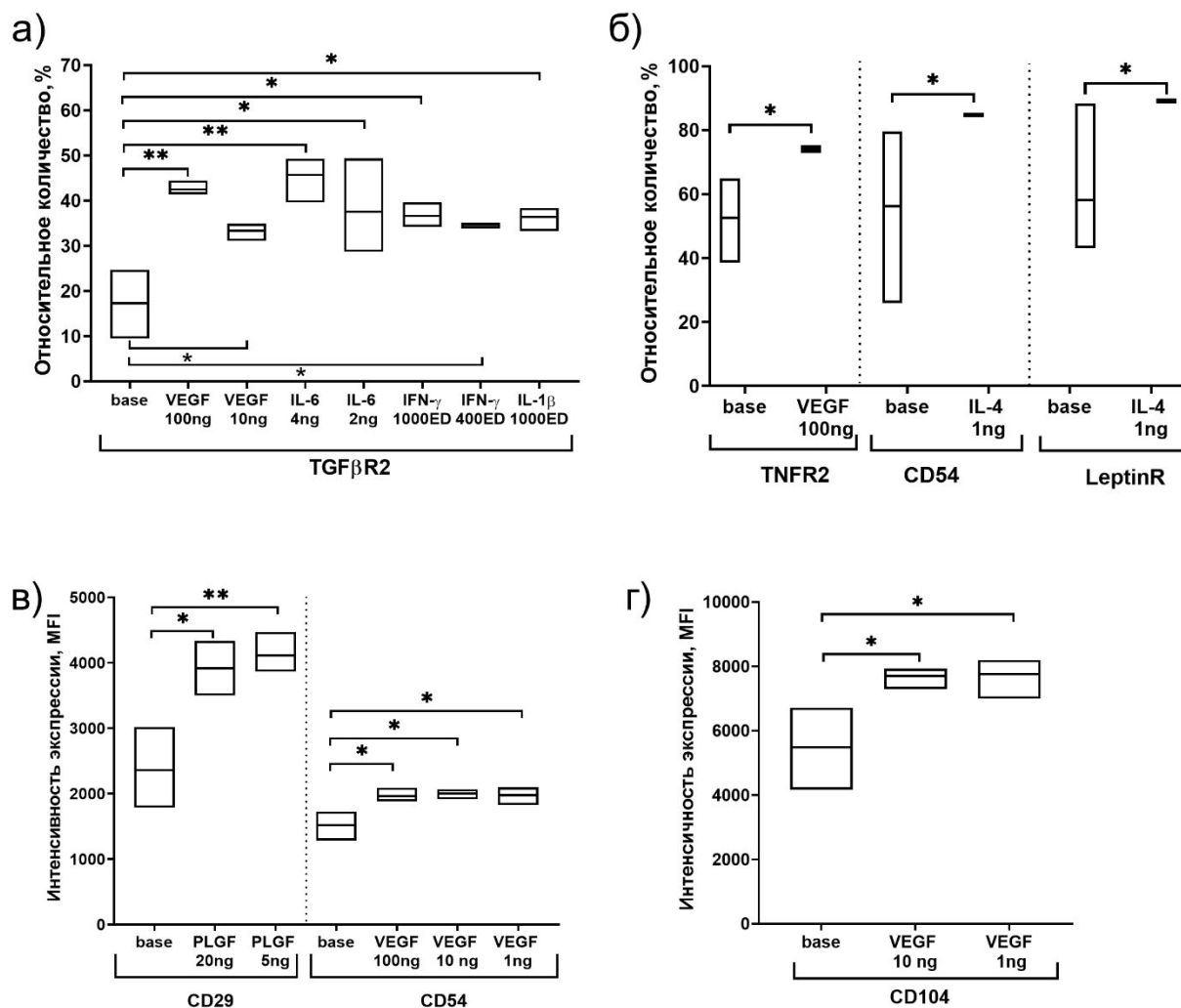


Рисунок 3.1 - Фенотип клеток линии JEG-3 в присутствии цитокинов. Относительное количество клеток, экспрессирующих на своей мембране TGFβ2 (а), TNFR2, CD54, LeptinR (б). Интенсивность экспрессии клетками рецепторов CD29, CD54 (в), CD104 (г). Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

### 3.2 Фенотипические изменения клеток трофобласта линии JEG-3 в присутствии КС ворсин хориона

Ранее в отделе иммунологии ФГБНУ «АГиР им.Д.О.Отта» установлено, что КС ворсин хориона I и III триместров содержат цитокины IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IFNγ, TNFα [28]. В настоящей работе в КС ворсин хориона были выявлены IL-15 и IL-18 (Рисунок 3.2), что согласуется с данными литературы [364, 661, 699, 705]. Их концентрации не различались в зависимости от триместра беременности.

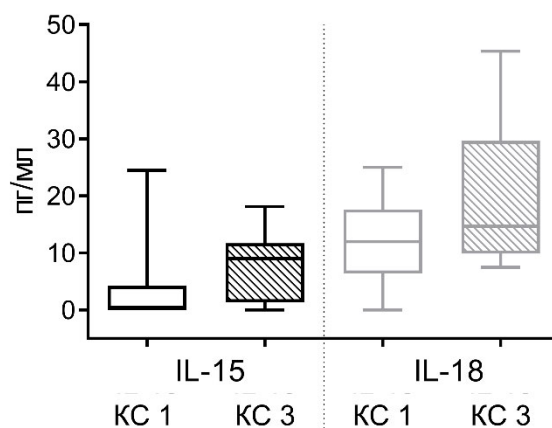


Рисунок 3.2 - Содержание IL-15 и IL-18 в КС ворсин хориона первого (КС 1) и третьего (КС 3) триместров беременности

Установлено, что после культивирования клеток линии JEG-3 в присутствии КС ворсин хориона I триместра повышено относительное количество клеток, экспрессирующих интегрин  $\beta 6$  и VE-кадгерин снижено количество клеток, экспрессирующих E-кадгерин по сравнению с нестимулированными КС клетками (Рисунок 3.3 а,б).

В присутствии КС ворсин хориона I триместра беременности по сравнению со спонтанным уровнем отмечали снижение интенсивности экспрессии клетками линии JEG-3 E-кадгерина (Рисунок 3.3в) и повышение интенсивности экспрессии CD29, интегрин  $\beta 6$ , VE-кадгерина, (Рисунок 3.3 в, г), CD49а, CD31, CD51/61, CD106, CD95 (Рисунок 3.3д), CD49е (Рисунок 3.3е). Инкубация клеток линии JEG-3 в присутствии КС ворсин хориона III триместра беременности по сравнению со спонтанным уровнем приводила к увеличению относительного количества клеток, экспрессирующих интегрин  $\beta 6$  и снижению относительного количества клеток, экспрессирующих E-кадгерин (Рисунок 3.3б). Параллельно в присутствии КС ворсин хориона III триместра беременности по сравнению со спонтанным уровнем отмечена повышенная интенсивность экспрессии клетками JEG-3 интегрин  $\beta 6$  (Рисунок 3.3г), CD106, CD95, CD49а, CD31, CD51/61 (Рисунок 3.3д), CD49е (Рисунок 3.3е). Напротив, интенсивность экспрессии E-кадгерина и CD104 в этом случае была снижена (Рисунок 3.3 б, е). Относительное количество клеток линии JEG-3, экспрессирующих VE-кадгерин (Рисунок 3.3а), а также интенсивность экспрессии клетками VE-кадгерина и E-кадгерина (Рисунок 3.3в,г) была снижена в присутствии КС ворсин хориона III триместра физиологической беременности по сравнению с КС I триместра.

Экспрессия рецепторов CD54, CD49f клетками линии JEG-3 не изменялась в зависимости от инкубации с КС ворсин хориона I или III триместра физиологической беременности, а также не изменялась по сравнению со спонтанным уровнем экспрессии.



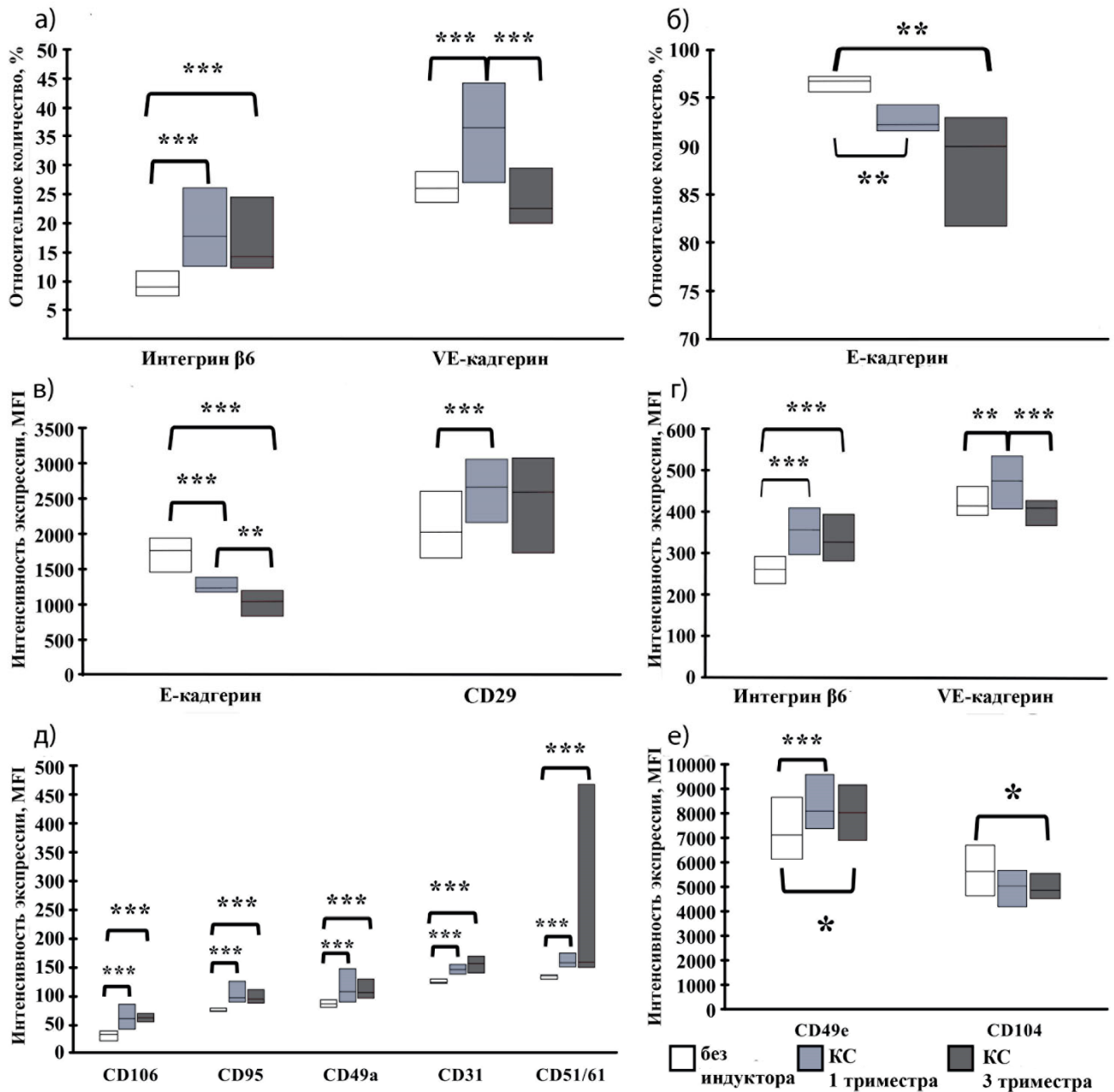


Рисунок 3.3 - Фенотип клеток линии JEG-3 в присутствии КС ворсин хориона. Относительное количество клеток, экспрессирующих на своей мембране интегрин β6 и VE-кадгерин (а), E-кадгерин (б). Интенсивность экспрессии клетками E-кадгерина и CD29 (в), интегрин β6 и VE-кадгерина (г), CD106, CD95, CD49a, CD31, CD51/61 (д), CD49e, CD104 (е). Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ . На графиках белые боксы соответствуют параметрам клеток после инкубации без индукторов, светло-серые боксы - после инкубации с КС ворсин хориона I триместра, темно-серые боксы - после инкубации с КС ворсин хориона III триместра

### 3.3 Секреция клетками трофобласта линии JEG-3 цитокинов

Оценку секреции цитокинов клетками линии JEG-3 проводили после культивирования клеток в течение 24 часов. Оценена секреция  $\beta$ HсG клетками трофобласта линии JEG-3. В среднем она составила 25 {17; 29} ЕД/мл и не изменялась после культивирования клеток в присутствии индукторов (IL-10, IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , PMA).

Установлено, что клетки трофобласта линии JEG-3 секретируют VEGF, RANTES и TGF $\beta$ . В присутствии индукторов TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PMA, IL-10 концентрации цитокинов VEGF, RANTES, секретируемых клетками трофобласта линии JEG-3, не изменялись (Рисунок 3.4 а,б). В присутствии TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PMA, IL-10, IFN $\gamma$  секреция TGF $\beta$  клетками линии JEG-3 возрастала по сравнению со базовым уровнем секреции (Рисунок 3.4 в).

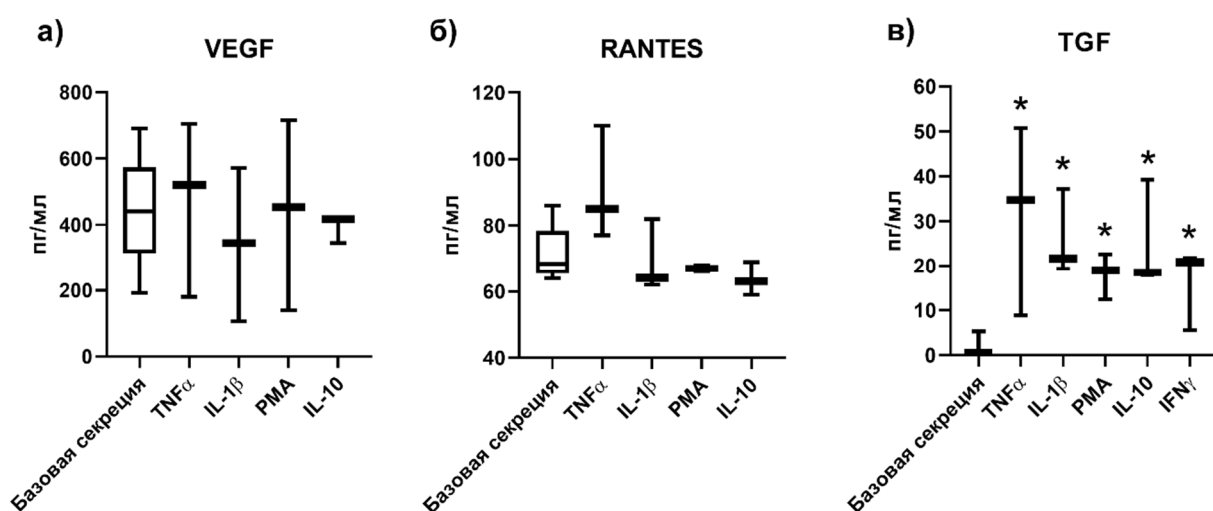


Рисунок 3.4 - Концентрация VEGF (а), RANTES (б), TGF $\beta$  (в), секретируемые клетками трофобласта линии JEG-3, в присутствии индукторов. Статистическая значимость отличия от базового уровня секреции: \* -  $p < 0,05$

### 3.4 Влияние кондиционированных сред ворсин хориона на фенотип клеток линии NK-92

Инкубация клеток линии NK-92 в присутствии КС ворсин хориона I триместра беременности приводила к увеличению относительного количества клеток, экспрессирующих KIR2DL3, CD119, CD29 и снижению относительного количества клеток, экспрессирующих CD184, по сравнению со спонтанным уровнем. Параллельно в присутствии КС ворсин хориона I триместра беременности отмечена повышенная интенсивность экспрессии клетками линии NK-92 CD29, CD58, CD11a, CD49d (Рисунок 3.5 в,г,д) и сниженная интенсивность экспрессии CD184 по сравнению со спонтанным уровнем (Рисунок 3.5 в).

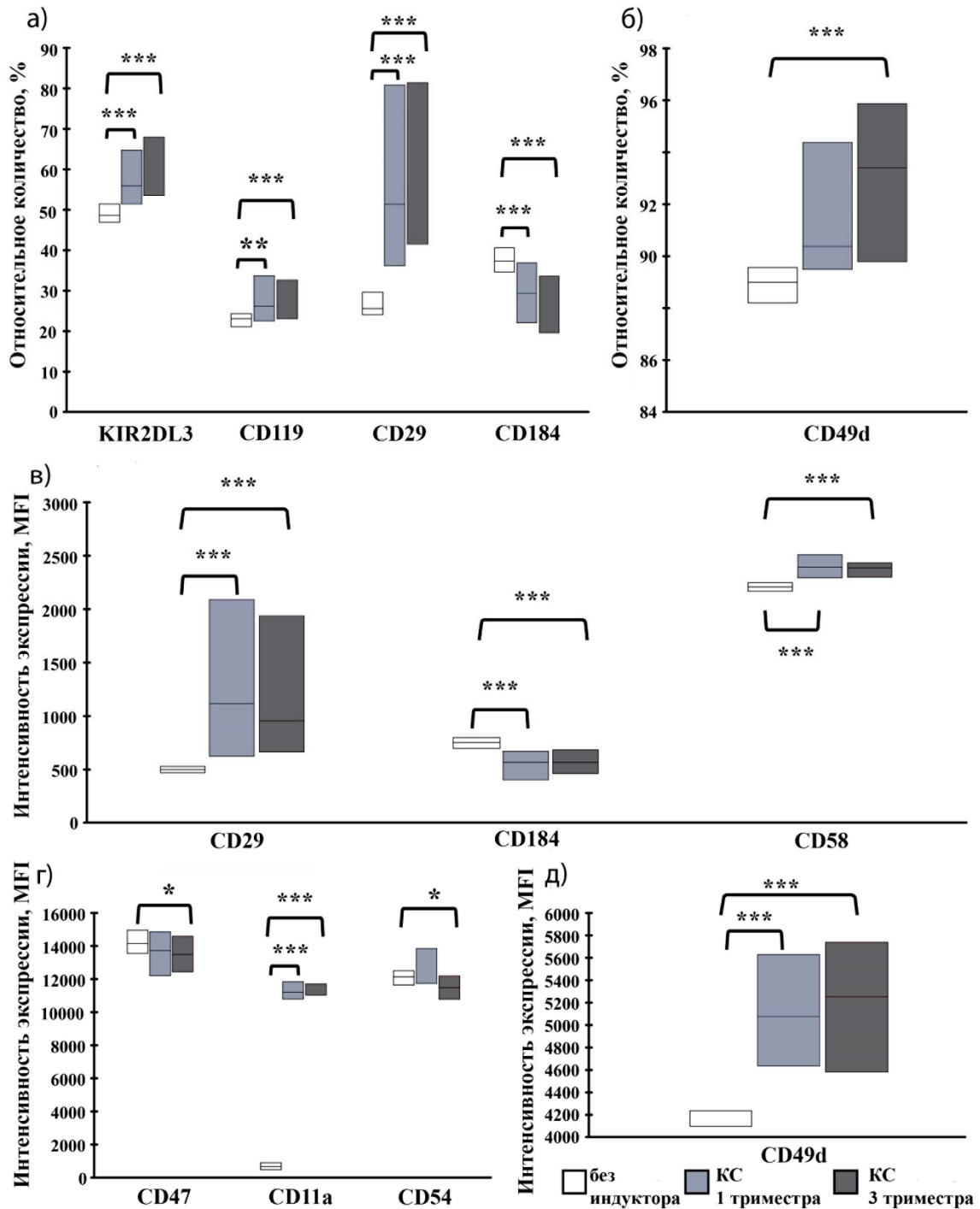


Рисунок 3.5 - Фенотип клеток линии NK-92 в присутствии КС ворсин хориона. Относительное количество клеток, экспрессирующих на своей мембране KIR2DL3, CD119, CD29, CD184 (а), CD49d (б). Интенсивность экспрессии клетками CD29, CD184, CD58 (в), CD47, CD11a, CD54 (г), CD49d (ж). Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ . На графиках белые боксы соответствуют параметрам клеток после инкубации без индукторов, светло-серые боксы - после инкубации с КС ворсин хориона I триместра, темно-серые боксы - после инкубации с КС ворсин хориона III триместра

Инкубация клеток линии NK-92 в присутствии КС ворсин хориона III триместра беременности приводила к увеличению относительного количества клеток, экспрессирующих KIR2DL3, CD119, CD29, CD49d и снижению относительного количества клеток, экспрессирующих CD184 по сравнению со спонтанным уровнем (Рисунок 3.5 а,б). Параллельно в присутствии КС ворсин хориона III триместра беременности отмечена повышенная интенсивность экспрессии клетками линии NK-92 CD29, CD58, CD11a, CD49d и сниженная интенсивность экспрессии CD184, CD47, CD54 по сравнению со спонтанным уровнем (Рисунок 3.5 в,г,д).

Относительное количество клеток линии NK-92, экспрессирующих KIR2DL1, KIR2DL4, KIR2DS4, KIR3DL1, CD11a, CD11c, CD58, CD44, CD47, CD54, CD192, а также интенсивность экспрессии KIR2DL1, KIR2DL3, KIR2DS4, KIR2DL4, KIR3DL1, CD192, CD11c, CD119, CD11b, CD18, CD44, CD54 не изменялись в присутствии КС ворсин хориона I и III триместров физиологической беременности, а также не отличалась от спонтанного уровня экспрессии.

### **3.5 Взаимное расположения клеток линии NK-92 и клеток трофобласта линии JEG-3 во время их адгезии и трансмиграции**

Проведена конфокальная микроскопия для оценки расположения клеток линии NK-92 относительно клеток трофобласта в случае контактного взаимодействия. На конфокальном микроскопе получены микропрепараты клеток трофобласта, образующие неоднородный монослой. В отдельных участках визуализированы NK-клетки, находящиеся внутри слоя трофобласта (Рисунок 3.6).

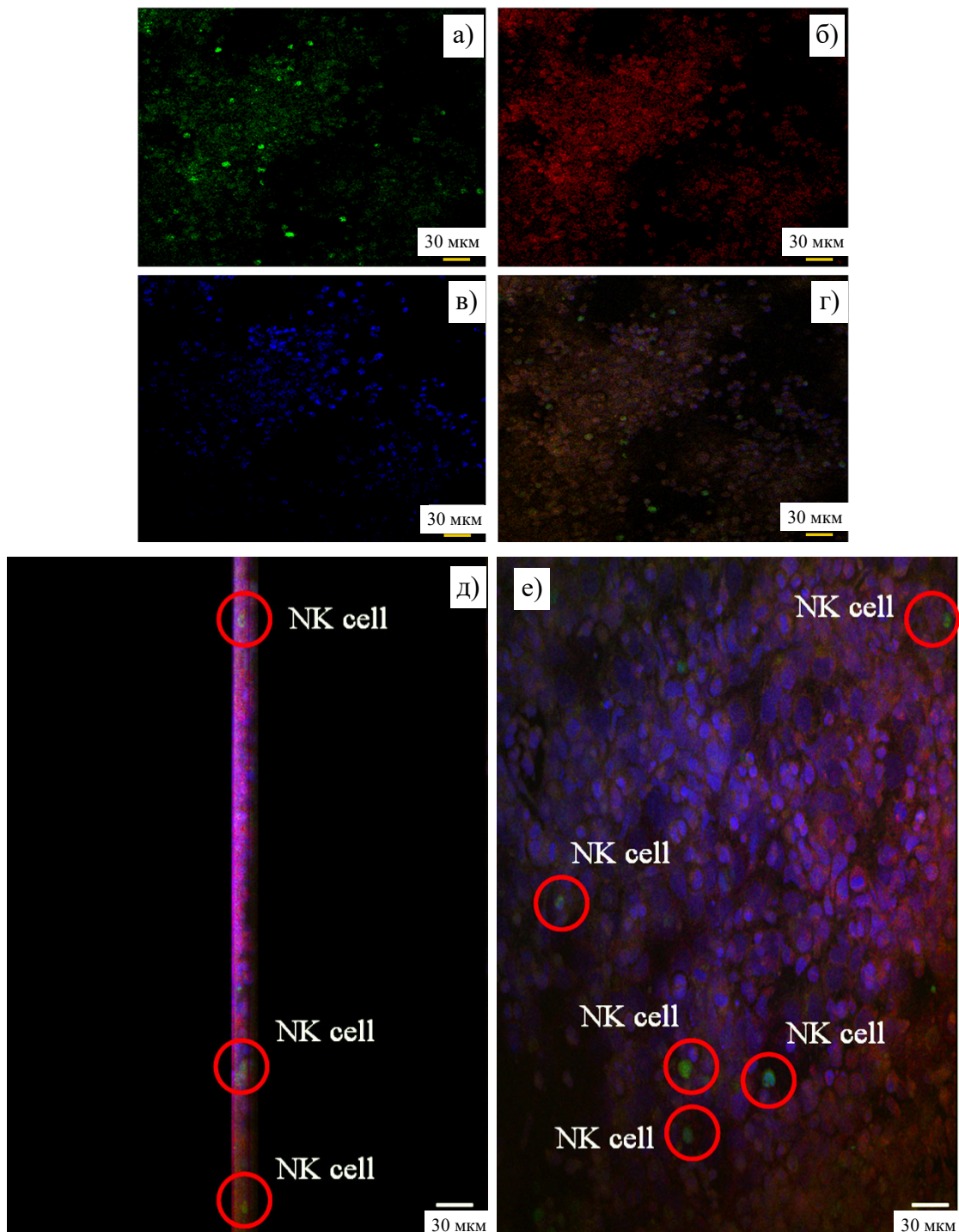


Рисунок 3.6 - Взаимное расположение клеток линии NK-92 и клеток трофобласта линии JEG-3, x200. а) клетки линии NK-92, окрашенные Calcein AM; б) клетки трофобласта линии JEG-3, окрашенные SNARF-1; в) ядра линии NK-92 и клеток трофобласта, обработанные красителем DAPI; г) наложение зеленого (клетки линии NK-92), красного (клетки трофобласта линии JEG-3) и синего (ядра, окрашенные DAPI) каналов, д) латеральная проекция Z-stack фотографий клеток линии NK-92 и клеток трофобласта линии JEG-3, x200, 3-D модель, е) аксиальная проекция Z-stack фотографий клеток линии NK-92 и клеток трофобласта линии JEG-3, x200, 3-D модель

### 3.6 Адгезия к монослою клеток трофобласта линии JEG-3 и трансмиграция клеток линии NK-92 в присутствии цитокинов и кондиционированных сред ворсин хориона

Количество клеток линии NK-92, адгезировавших к монослою клеток линии JEG-3, предварительно обработанному РМА, было выше, по сравнению с интактными клетками. Количество адгезировавших клеток линии NK-92 к нестимулированным клеткам линии JEG-3 было повышено по сравнению с нестимулированными NK-клетками только в присутствии TNF $\alpha$  50 ЕД/мл (Рисунок 3.7). Цитокины IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$ , а также дополнительно проанализированные bFGF, SDF-1, TGF $\beta$ , IL-15 и IL-18 не влияли на трансмиграцию NK-клеток: количество клеток линии NK-92, мигрировавших через клетки трофобласта линии JEG-3 не отличалось от базовой миграции в отсутствии цитокинов.

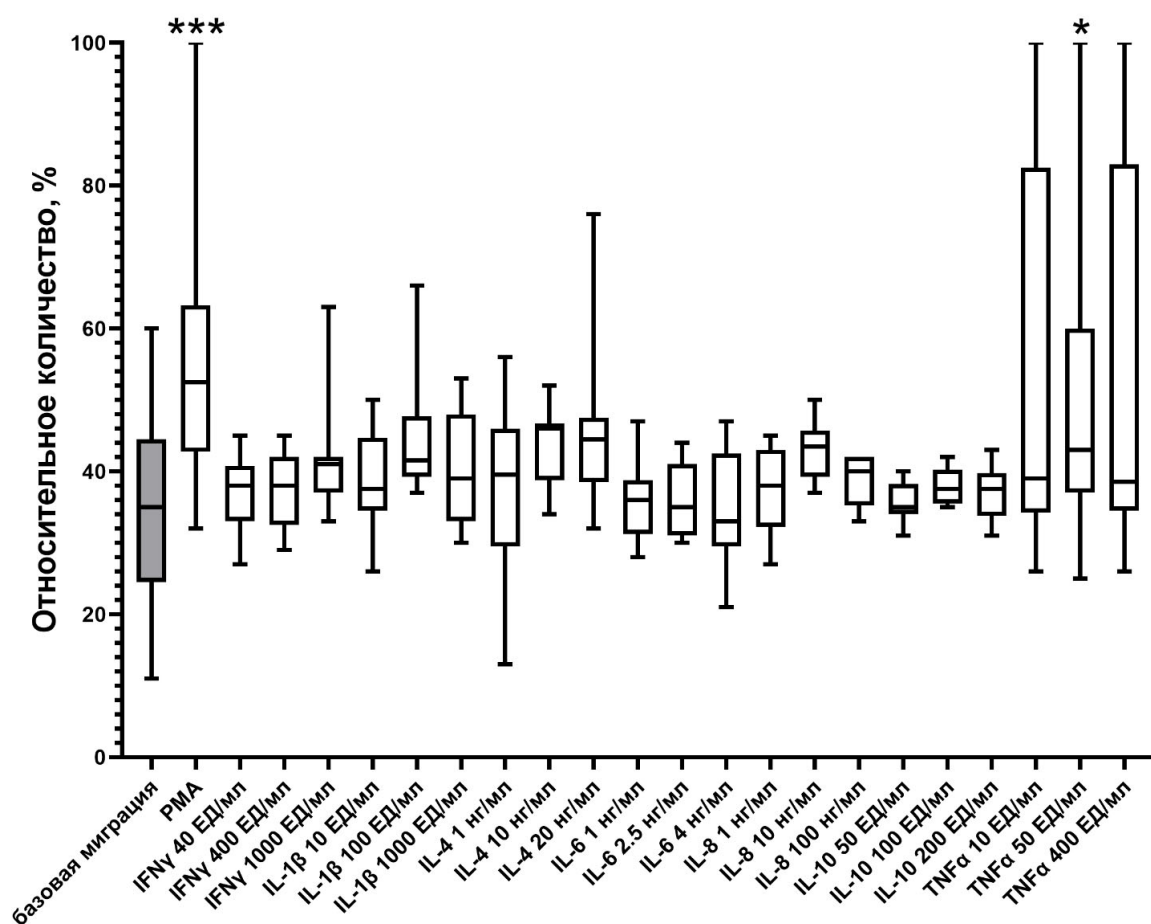


Рисунок 3.7 - Количество клеток линии NK-92, адгезировавших к клеткам трофобласта линии JEG-3. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$

Количество адгезировавших клеток линии NK-92, предварительно обработанных КС ворсин хориона как I, так и III триместра беременности, к клеткам линии JEG-3 было снижено по сравнению количеством адгезировавших интактных клеток. В присутствии КС III триместра

количество адгезировавших клеток линии NK-92 было снижено по сравнению с базовым уровнем адгезии, но повышено по сравнению с количеством адгезировавших клеток, преактивированных КС I триместра (Рисунок 3.8 а).

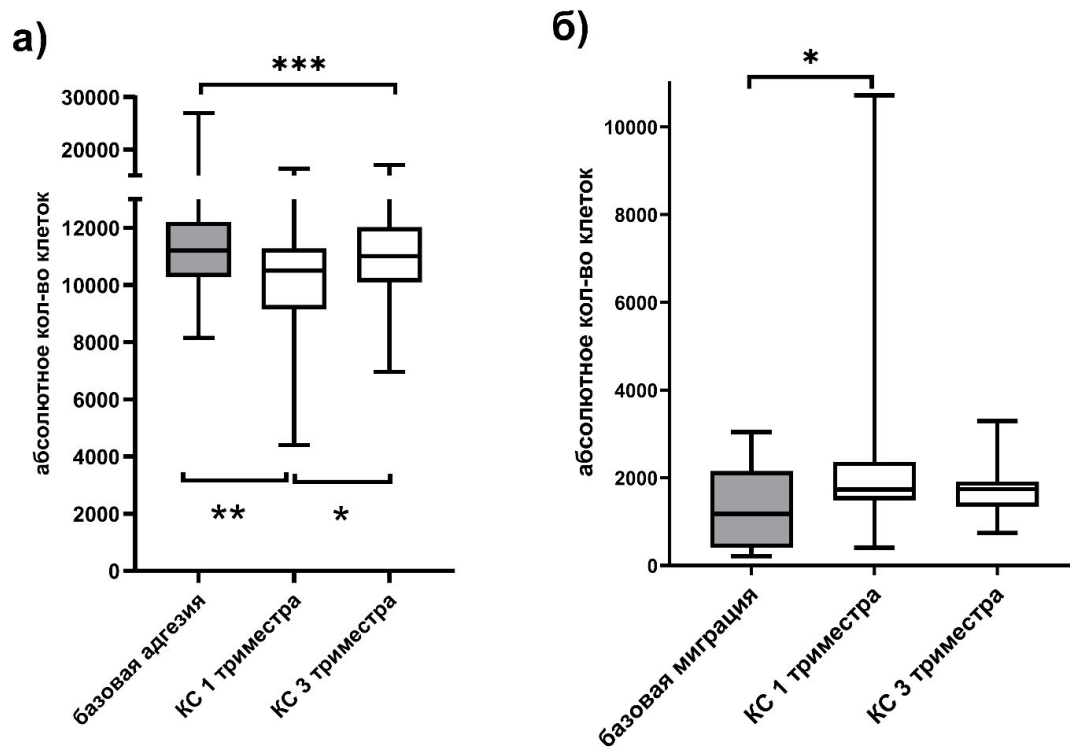


Рисунок 3.8 - Количество клеток линии NK-92, адгезировавших (а) и мигрировавших (б) через монослой клеток трофобласта линии JEG-3. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$

В присутствии КС ворсин хориона I триместра беременности количество мигрировавших клеток линии NK-92 через слой клеток линии JEG-3 было повышено по сравнению с уровнем их базовой миграции без индукторов (Рисунок 3.8 б). В присутствии КС ворсин хориона III триместра беременности количество мигрировавших клеток линии NK-92 через слой клеток линии JEG-3 не отличалось от их базовой миграции.

### 3.7 Фенотип клеток линии NK-92 до и после трансмиграции через монослой клеток трофобласта линии JEG-3 в присутствии цитокинов

Установлено, что среди клеток линии NK-92, мигрировавших в нижнюю камеру «трансвелла» через монослой клеток трофобласта, присутствует больше клеток с фенотипом CD11a<sup>+</sup>, чем в верхней камере (Рисунок 3.9 а). Для клеток линии NK-92, мигрировавших в нижнюю камеру также характерна более высокая экспрессия рецептора CD11a, чем для NK-

клеток, не прошедших через трофобластический барьер. Эти различия выявлены как в случае миграции клеток в отсутствие индукторов, так и в присутствии всех цитокинов, использованных на в работе (bFGF, IL-10, IL-8, SDF-1, TGF $\beta$ , IL-15, IL-18, IFN $\gamma$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IL-4, IL-1 $\beta$ ). В присутствии IL-18, также в присутствии IL-4, интенсивность экспрессии CD11a NK-клеток, мигрировавших через клетки трофобласта, была выше, чем у клеток, мигрировавших спонтанно (Рисунок 3.9 б).

Установлено, что относительное количество клеток линии NK-92, экспрессирующих CD11b, среди клеток, мигрировавших в нижнюю камеру в присутствии bFGF, IL-8, IL-15, IL-18, было повышено по сравнению с клетками в верхней камере «трансвелла» (Рисунок 3.10 а). Клетки линии NK-92, находящиеся в верхней камере и не преодолевшие трофобластический барьер в присутствии SDF-1 и TNF $\alpha$ , характеризуются повышенной экспрессией CD11b по сравнению с мигрировавшими клетками. У клеток, мигрировавших в нижнюю камеру в присутствии bFGF, интенсивность экспрессии CD11b была повышена по сравнению с экспрессией клетками, оставшимися в верхней камере (Рисунок 3.10 б).

Среди клеток, мигрировавших через трофобластический барьер в присутствии bFGF и IL-8 количество клеток линии NK-92 с фенотипом CD11c<sup>+</sup> было выше, чем среди клеток немигрировавших через монослой трофобласта (Рисунок 3.11 а). В присутствии IL-15 количество CD11c<sup>+</sup> NK-клеток среди всех клеток, мигрировавших в нижнюю камеру через монослой клеток трофобласта, было выше, чем среди клеток, мигрировавших спонтанно (Рисунок 3.11 а). Интенсивность экспрессии CD11c была повышена у клеток линии NK-92, мигрировавших в присутствии IL-8, по сравнению с интенсивностью экспрессии CD11c NK-клетками, мигрировавшими спонтанно, в отсутствие индукторов (Рисунок 3.11 б).

Количество клеток линии NK-92 с фенотипом CD18<sup>+</sup> среди клеток, мигрировавших через монослой клеток трофобласта в присутствии bFGF, IL-8, SDF-1, TGF- $\beta$ , IL-15, было выше, чем среди немигрировавших клеток (Рисунок 3.12 а). Количество CD18<sup>+</sup> клеток линии NK-92, среди мигрировавших через монослой клеток трофобласта клеток в присутствии SDF-1, IL-15, IL-18 было выше, чем среди клеток мигрировавших спонтанно ( $p < 0.05$ ), ( $p < 0.01$ ), ( $p < 0.05$ ) (Рисунок 3.12 а). Для клеток линии NK-92, мигрировавших в нижнюю камеру «трансвелла» в присутствии bFGF, IL-10, IL-8, SDF-1, TGF- $\beta$ , была установлена повышенная интенсивность экспрессии CD18 по сравнению с немигрировавшими клетками (Рисунок 3.12 а).



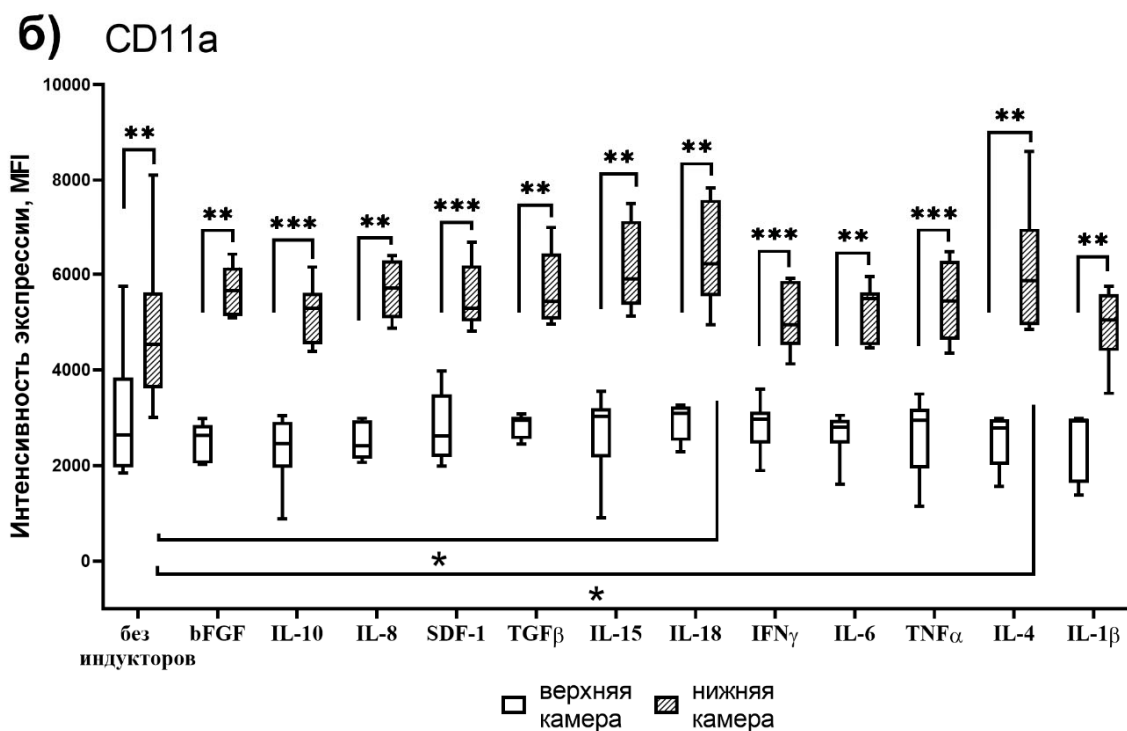
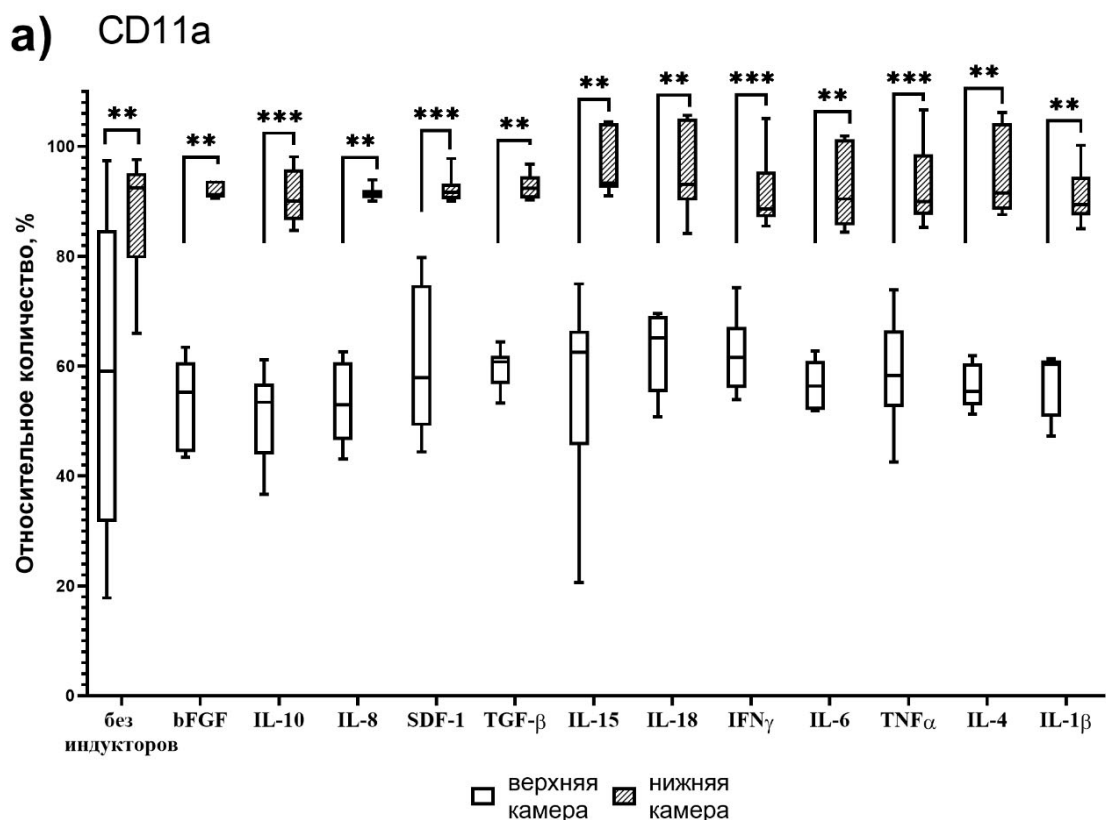


Рисунок 3.9 - Экспрессия клетками линии NK-92 рецептора CD11a в верхней и нижней камере «трансвелла», разделенные монослоем клеток трофобласта. (а) Количество клеток линии NK-92, экспрессирующих CD11a; (б) интенсивность экспрессии клетками линии NK-92 рецептора CD11a. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$

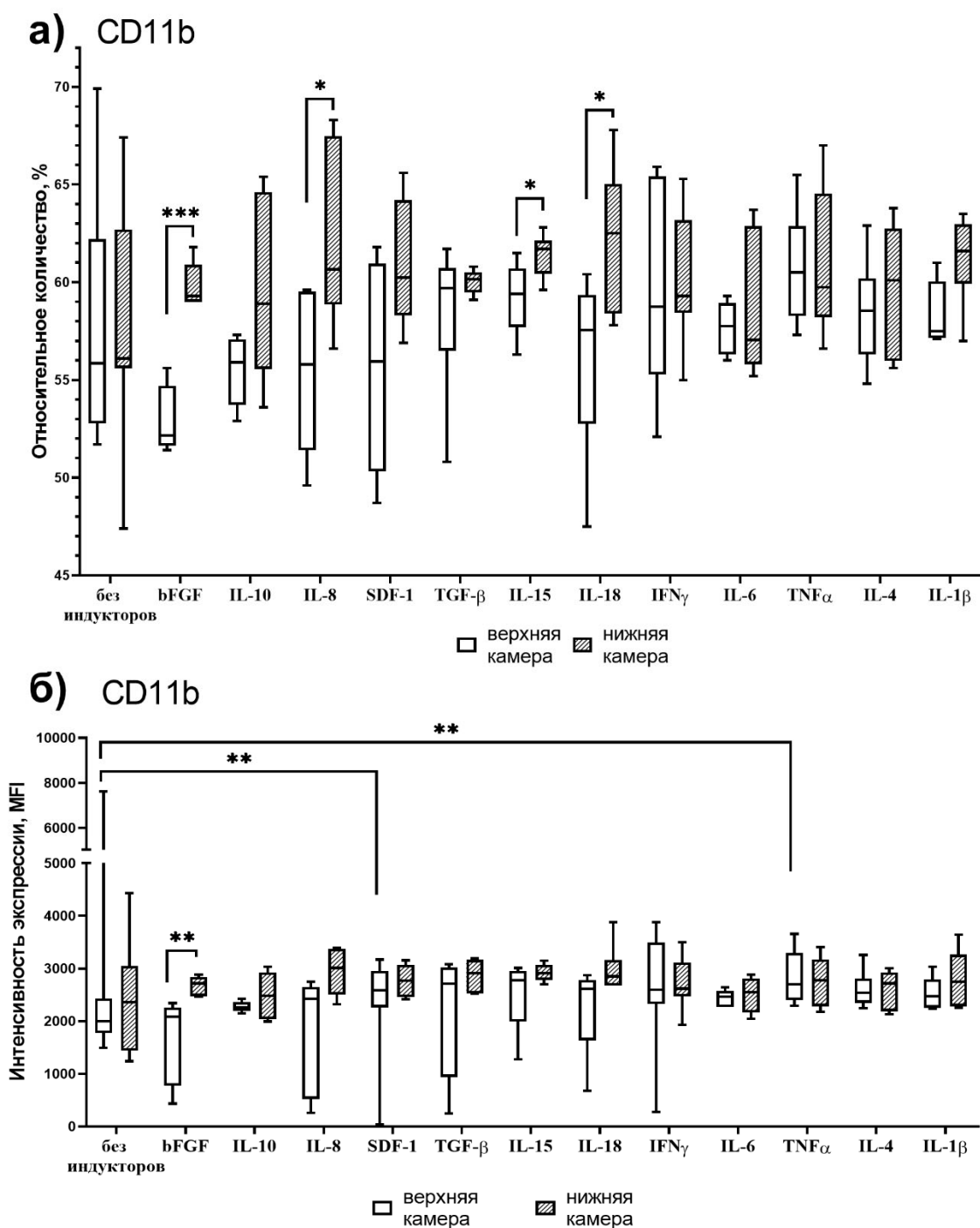


Рисунок 3.10 - Экспрессия клетками линии NK-92 рецептора CD11b в верхней и нижней камере «трансвелла», разделенные монослоем клеток трофобласта. (а) Количество клеток линии NK-92, экспрессирующих CD11b; (б) интенсивность экспрессии клетками линии NK-92 рецептора CD11b. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$

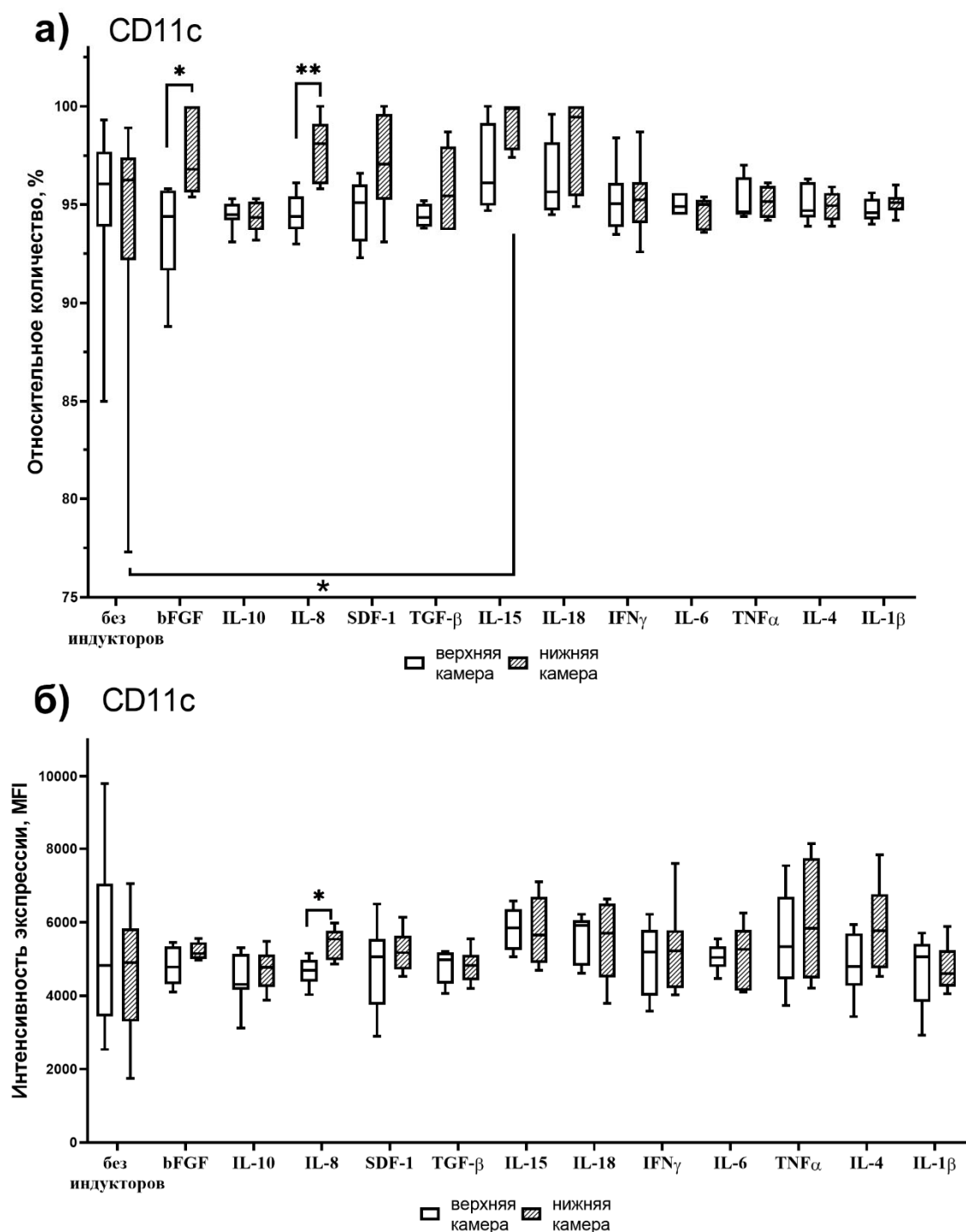


Рисунок 3.11 - Экспрессия клетками линии НК-92 рецептора CD11c в верхней и нижней камере «трансвелла», разделенные монослоем клеток трофобласта. (а) Количество клеток линии НК-92, экспрессирующих CD11c; (б) интенсивность экспрессии клетками линии НК-92 рецептора CD11c. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

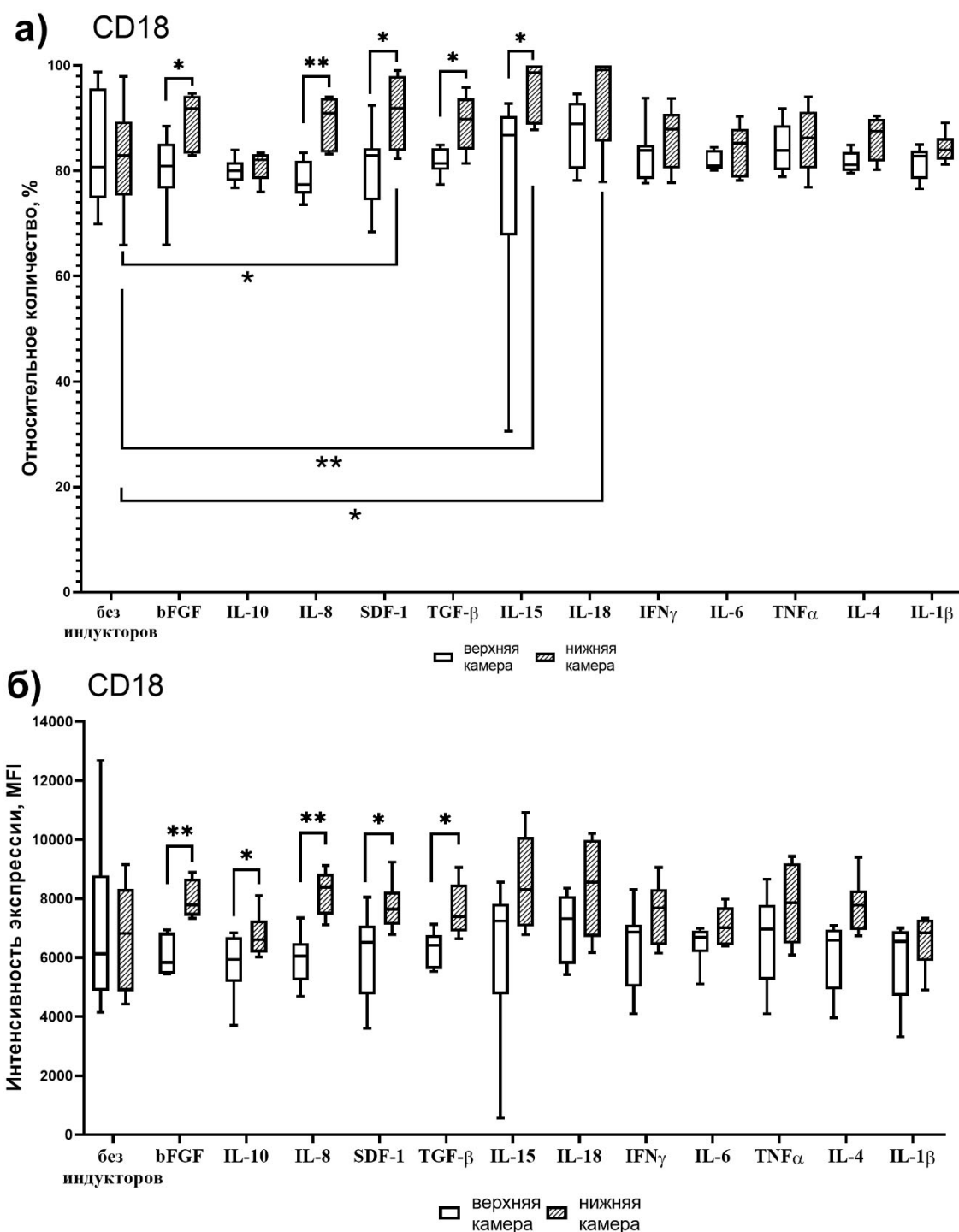


Рисунок 3.12 - Экспрессия клетками линии NK-92 рецептора CD18 в верхней и нижней камере «трансвелла», разделенные монослоем клеток трофобласта. (а) Количество клеток линии NK-92, экспрессирующих CD18; (б) интенсивность экспрессии клетками линии NK-92 рецептора CD18. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

В целом, продемонстрировано, что провоспалительные цитокины IL-6,  $IFN\gamma$ , IL-1 $\beta$ , а также ростовой фактор VEGF усиливают экспрессию клетками трофобласта TGF $\beta$ R2. Установлено, что клетки трофобласта линии JEG-3, используемые в работе могут секретировать

TGF $\beta$ . Ростовой фактор VEGF вызывает усиление экспрессии клетками трофобласта TNFR2 и адгезионных рецепторов CD54 и CD104, а PLGF усиливает экспрессию клетками трофобласта адгезионных рецепторов CD29. Продемонстрировано, что PMA и TNF $\alpha$  усиливают адгезию NK-клеток к клеткам трофобласта, однако большинство проанализированных цитокинов не влияет на функции адгезии и трансмиграции NK-клеток. Установлено, что в случае трансмиграции NK-клеток через монослой клеток трофобласта в нижнюю камеру «трансвелла» повышено количество и интенсивность экспрессии NK-клетками субъединицы адгезионного рецептора LFA-1 - CD11a. Эта тенденция сохранялась в случае добавления в нижнюю камеру «трансвелла» цитокинов: bFGF, IL-10, IL-8, SDF-1, TGF $\beta$ , IL-15, IL-18, IFN $\gamma$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IL-4, IL-1 $\beta$  вызывали повышение интенсивности экспрессии субъединицы CD11a в нижней камере по сравнению с уровнем экспрессии в отсутствие цитокинов. Изменения экспрессии рецепторов CD11b и CD11c установлены только в присутствии отдельных цитокинов - bFGF, IL-8, IL-15, IL-18. Продемонстрирована повышенная экспрессия CD18 NK-клетками, мигрировавшими в нижнюю камеру «трансвелла» в присутствии bFGF, IL-10, IL-8, SDF-1, TGF $\beta$ , а также большее количество мигрировавших CD18<sup>+</sup> NK-клеток в присутствии SDF-1, IL-15, IL-18. Продемонстрировано масштабное влияние КС ворсин хориона на фенотип клеток трофобласта: в присутствии КС ворсин хориона I триместра беременности повышалась интенсивность экспрессии клетками трофобласта интегрин  $\beta$ 6, VE-кадгерина, CD29, CD106, CD49a, CD95, CD31, CD51/61, CD49e, но снижалась интенсивность экспрессии E-кадгерина. В присутствии КС ворсин хориона III триместра отмечена повышенная интенсивность экспрессии клетками трофобласта интегрин  $\beta$ 6, CD106, CD49a, CD95, CD31, CD51/61, CD49e. Напротив, интенсивность экспрессии E-кадгерина и CD104 в этом случае была снижена. Установлено также, что КС ворсин хориона также изменяли экспрессию поверхностных рецепторов NK-клетками, обеспечивая повышение и поддержание экспрессии рецепторов, обеспечивающих адгезию. В присутствии КС ворсин хориона I триместра повышена экспрессия NK-клетками CD11a, CD29, CD49d, CD58, KIR2DL3, CD119 и снижена экспрессия CD184. В присутствии КС ворсин хориона III триместра беременности увеличена экспрессия NK-клетками KIR2DL3, CD119, CD49d, CD11a, CD29, CD58 и снижена экспрессия CD47, CD184, CD54 по сравнению со спонтанным уровнем. Продемонстрировано, что в присутствии КС ворсин хориона I и III триместров снижена функция адгезии NK-клеток, однако в присутствии КС ворсин хориона I триместра по сравнению КС ворсин хориона III триместра беременности функция трансмиграции через клетки трофобласта повышена. Таким образом, изменения фенотипа как клеток трофобласта, так и NK-клеток в присутствии КС ворсин хориона обеспечивают трансмиграцию NK-клеток.

## ГЛАВА 4. ИЗМЕНЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ НК-КЛЕТОК В ПРИСУТСТВИИ КЛЕТОК ТРОФОБЛАСТА

Для анализа рецепторного профиля клеток линии NK-92 и pNK-клеток, а также содержания транскрипционных факторов в клетках линии NK-92, естественные киллеры культивировали в присутствии клеток линии JEG-3 в течение 96 часов, как описано выше (п. 2.3.1, п.2.3.2, п.2.3.5, п.2.3.6). Анализ содержания мРНК в клетках линии NK-92 проводили после инкубации в присутствии цитокинов в течение 96 часов как описано выше (п.2.3.3). Для определения активации внутриклеточной передачи сигнала с участием белков SMAD НК-клетки культивировали с клетками трофобласта в течение 24 часов (п.2.3.4).

### 4.1 Рецепторный профиль клеток линии NK-92 после совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3

Профиль экспрессии поверхностных рецепторов клетками линии NK-92 изменялся в случае совместного культивирования (сокультура) с клетками трофобласта линии JEG-3, как без IL-2, так и в присутствии IL-2, по сравнению с профилем экспрессии НК-клеток при культивировании без клеток трофобласта (монокультура) (Рисунок 4.1 а,б). Интенсивность экспрессии рецепторов НК-клетками была сходной при условии культивирования клеток NK-92 без индукторов и в присутствии IL-2, в моно- и сокультуре (Рисунок 4.1а). Рецепторы НК-клеток разделялись на три кластера (Рисунок 4.1в).

В сокультуре по сравнению с монокulturой количество клеток линии NK-92 с фенотипом CD127+, CD215+, NKp44+, NKG2D+, NKG2C+, KIR2DL4+, KIR2DL3+, KIR3DL1+, KIR2DS4+, KIR2DL1+ (Рисунок 4.2 б, в, д-м), CD117+, CD161+, CD62L+, CD94/NKG2A, CD122+, CD57 (Рисунок 4.3 а-е) было повышено, а с фенотипом NKp30+ снижено (Рисунок 4.2 г). Аналогичные изменения количества НК-клеток наблюдали в случае монокультуры НК-клеток в присутствии IL-2 по сравнению с НК-клетками в сокультуре, прокультивированными в присутствии IL-2, кроме количества NKG2D+ НК-клеток (Рисунок 4.2, Рисунок 4.3). Доля NKG2D+ НК-клеток в этих условиях статистически значимо не различалась (Рисунок 4.2 е).

Интенсивность экспрессии НК-клетками CD56, NKp44, NKG2C, KIR3DL1, KIR2DS4, KIR2DL1 (Рисунок 4.4 а,д,ж, к-м), CD117, CD161, CD94/NKG2A, CD122, CD57 (Рисунок 4.5 а,б,г,д,е) была повышена в сокультуре по сравнению с уровнем экспрессии после культивирования без клеток линии JEG-3. Аналогичные изменения установлены для указанных рецепторов в случае культивирования НК-клеток в сокультуре в присутствии IL-2 по сравнению

с монокультурой НК-клеток, прокультивированных в присутствии IL-2 (Рисунок 4.4 и Рисунок 4.5), кроме рецептора CD117 (Рисунок 4.5 а).

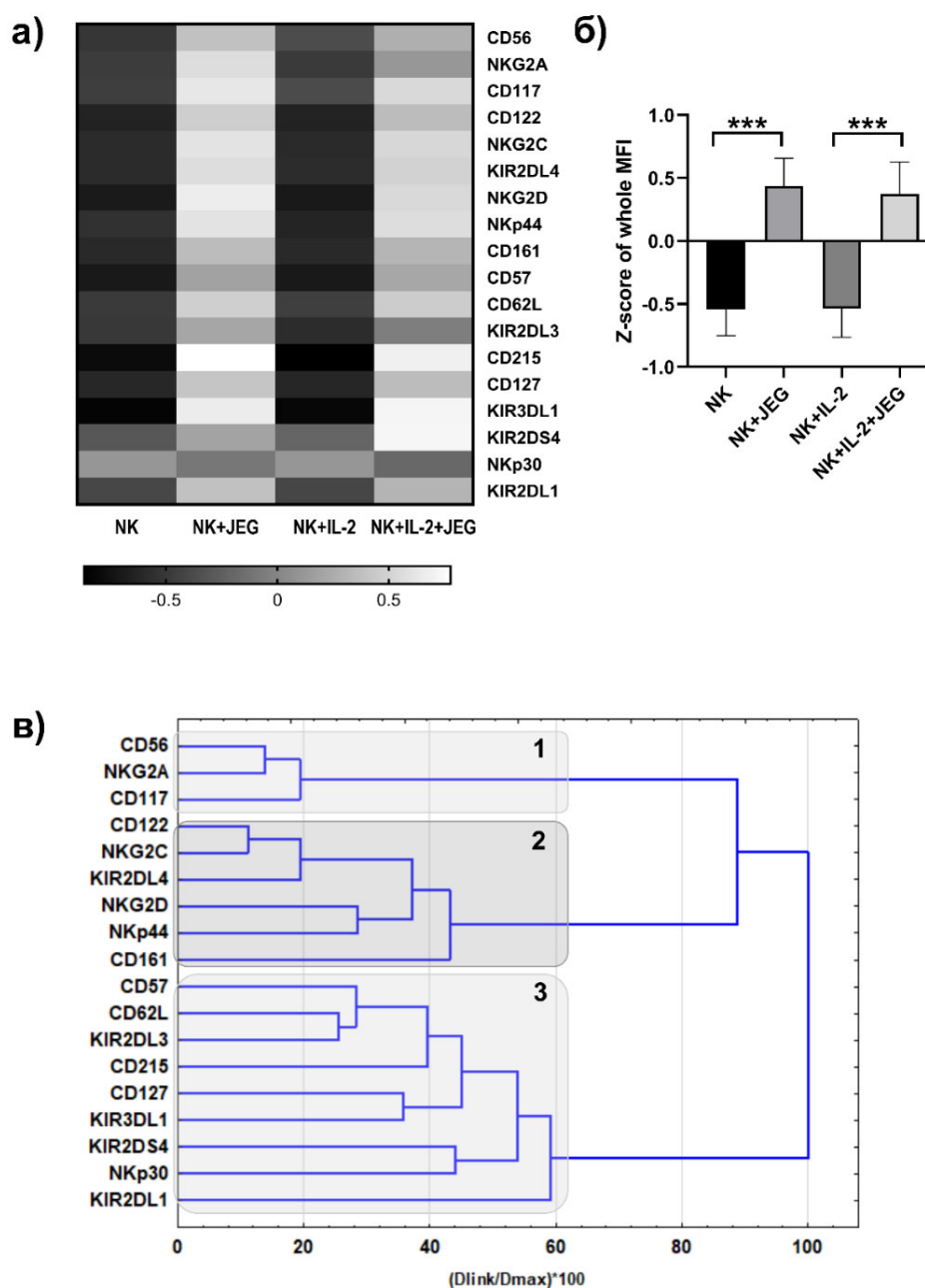


Рисунок 4.1 - Профиль экспрессии рецепторов НК-клетками в различных условиях культивирования: после культивирования без клеток линии JEG-3 и IL-2 (NK), с IL-2 (NK+IL-2), с клетками линии JEG-3 (NK+JEG), с IL-2 и клетками линии JEG-3 (NK+IL-2+JEG. а) Тепловая карта медиан стандартизированных значений интенсивности флюоресценции; б) Стандартизированные значения интенсивности экспрессии рецепторов НК-клетками в разных условиях культивирования (статистическая значимость различий \*\*\* -  $p < 0,001$ ); в) Кластеризация рецепторов НК-клеток по интенсивности экспрессии (дендрограмма). Мера расстояния между кластерами соответствует отношению расстояния связи признаков (distance linkage (Dlink)) к максимальному расстоянию связи (maximum distance (Dmax)), умноженному на 100%

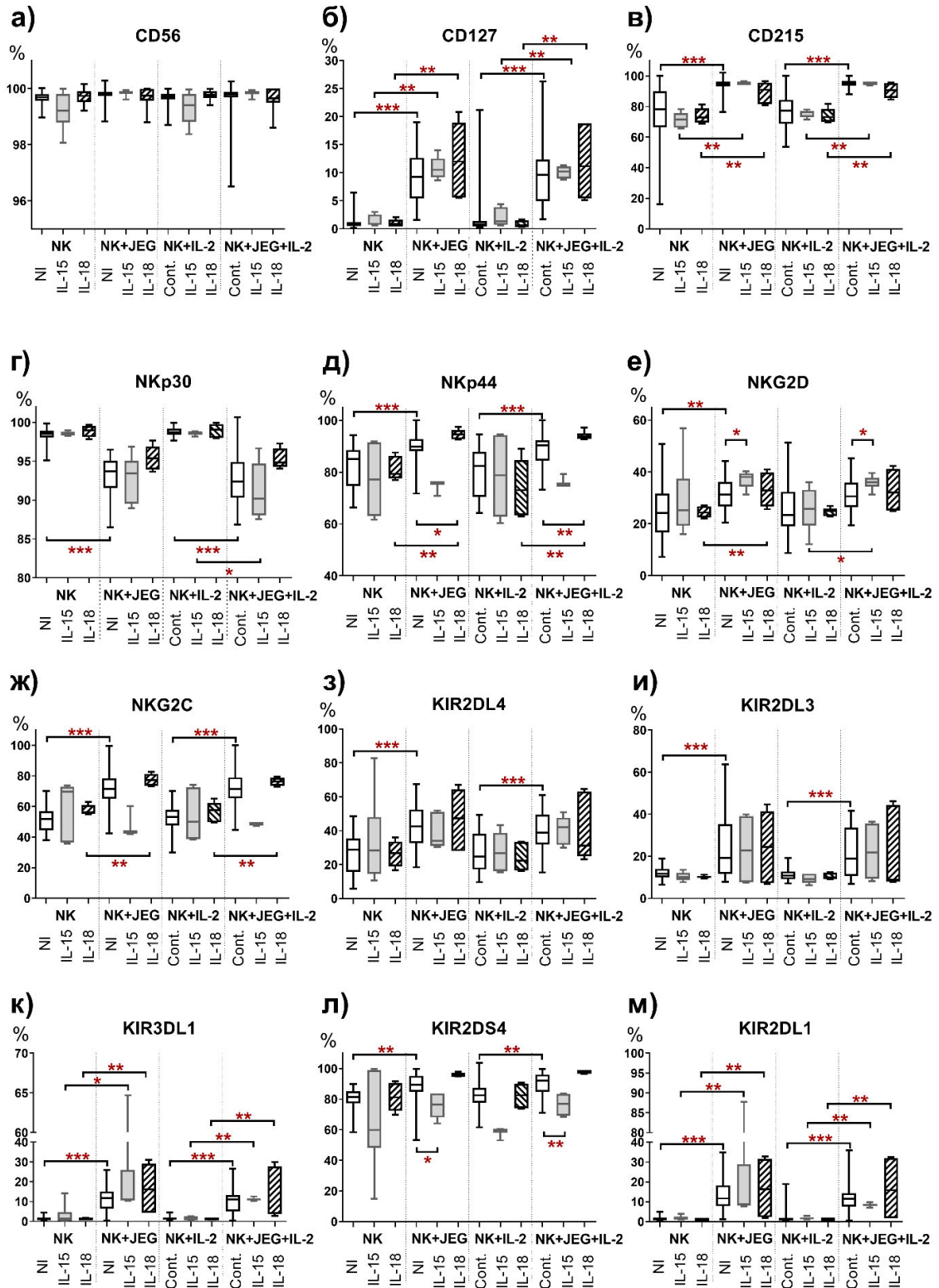


Рисунок 4.2 - Относительное количество (%) клеток линии NK-92 с фенотипом а) CD56+, б) CD127+, в) CD215+, г) NKp30, д) NKp44+, е) NKG2D+, ж) NKG2C+, з) KIR2DL4+, и) KIR2DL3+, к) KIR3DL1+, л) KIR2DS4+, м) KIR2DL1+ среди всего пула клеток линии NK-92, после культивирования без клеток линии JEG-3 и IL-2, с IL-2, с клетками линии JEG-3, с IL-2 и клетками линии JEG-3, в присутствии цитокинов IL-15 и IL-18. NI - культивирование без индукторов, Cont - (control) культивирование в присутствии IL-2. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$



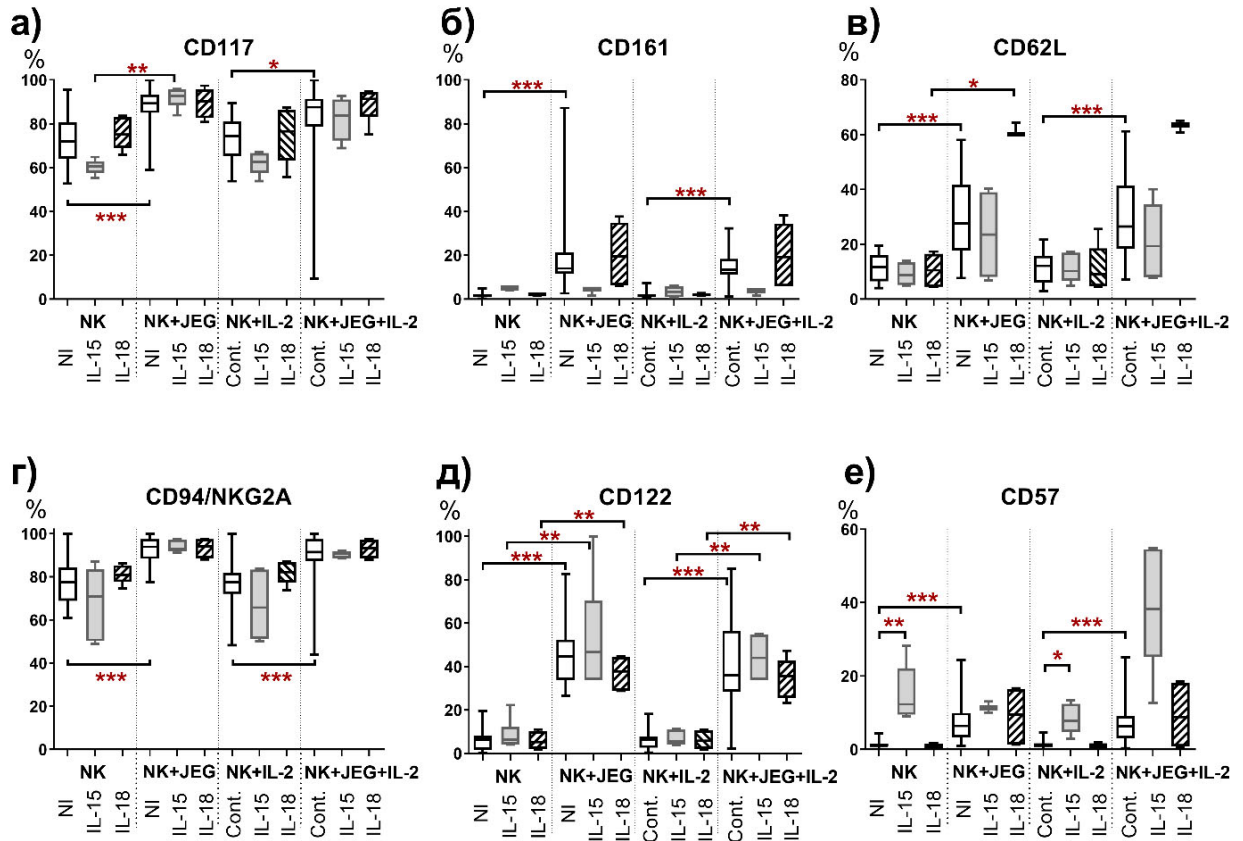


Рисунок 4.3 - Относительное количество (%) клеток линии НК-92 с фенотипом а) CD117+, б) CD161+, в) CD62L+, г) CD94/NKG2A+, д) CD122+, е) CD57+ среди всего пула клеток линии НК-92, после культивирования без клеток линии JEG-3 и IL-2, с IL-2, с клетками линии JEG-3, с IL-2 и клетками линии JEG-3, в присутствии цитокинов IL-15 и IL-18. NI - культивирование без индукторов. Cont - (control) культивирование в присутствии IL-2. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$

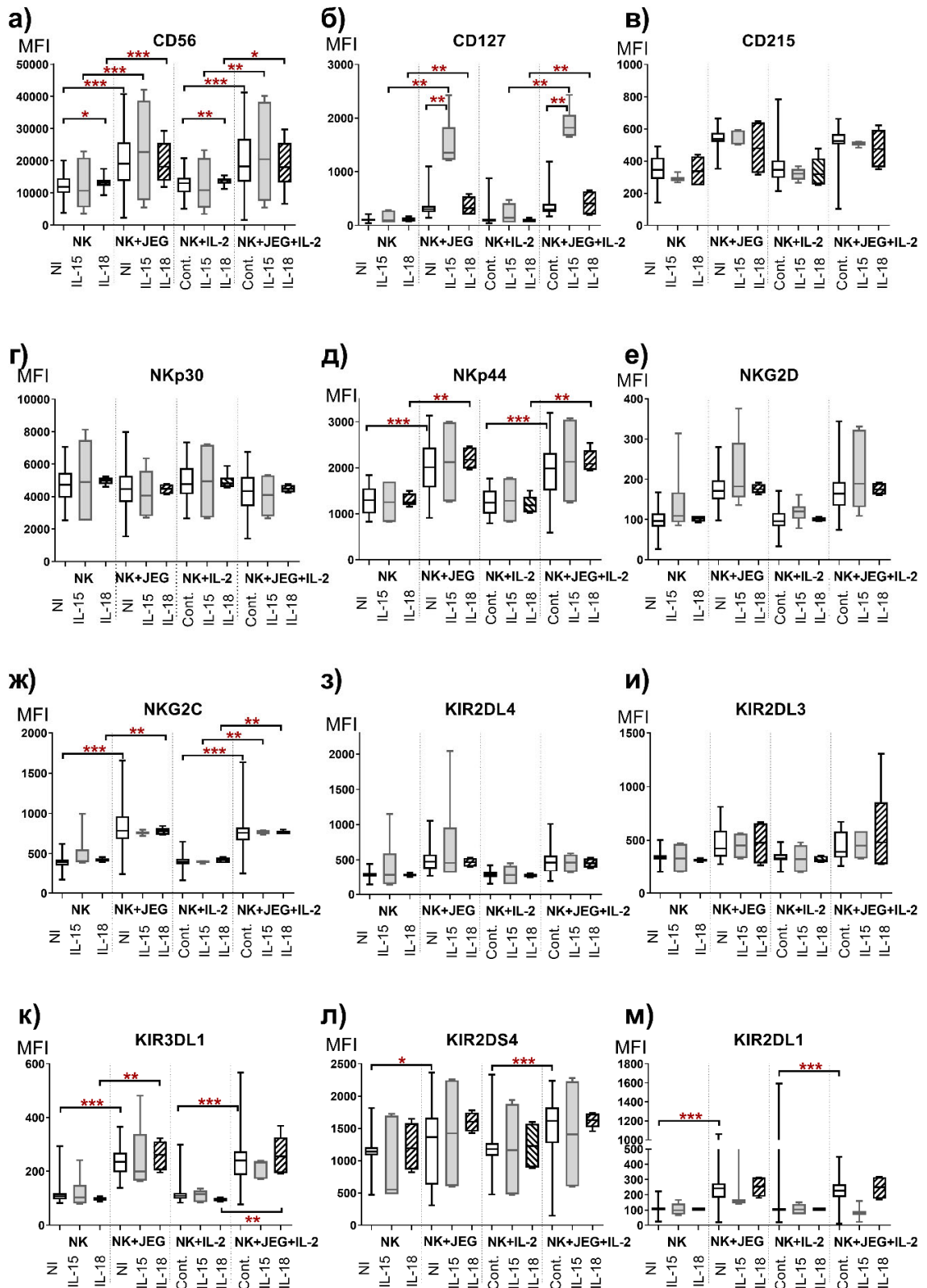


Рисунок 4.4 - Интенсивность экспрессии (MFI) клетками линии NK-92 рецепторов а) CD56, б) CD127, в) CD215, г) NKp30, д) NKp44, е) NKG2D, ж) NKG2C, з) KIR2DL4, и) KIR2DL3, к) KIR3DL1, л) KIR2DS4, м) KIR2DL1 после культивирования без клеток линии JEG-3 и IL-2, с IL-2, с клетками линии JEG-3, с IL-2 и клетками линии JEG-3, в присутствии цитокинов IL-15 и IL-18. NI - культивирование без индукторов. Cont - (control) культивирование в присутствии IL-2. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$

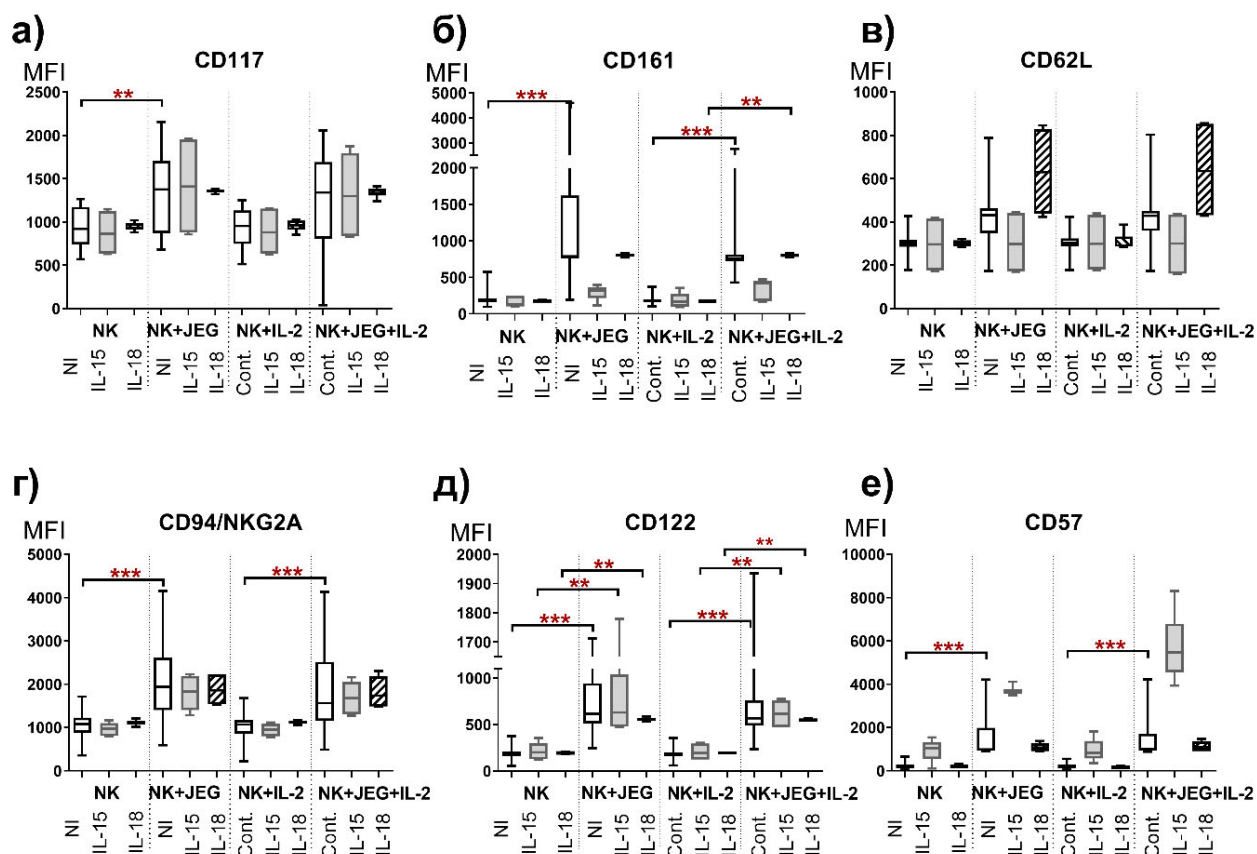


Рисунок 4.5 - Интенсивность экспрессии (MFI) клетками линии NK-92 рецепторов а) CD117, б) CD161, в) CD62L, г) CD94/NKG2A, д) CD122, е) CD57 после культивирования без клеток линии JEG-3 и IL-2, с IL-2, с клетками линии JEG-3, с IL-2 и клетками линии JEG-3, в присутствии цитокинов IL-15 и IL-18. NI - культивирование без индукторов. Cont - (control) культивирование в присутствии IL-2. Статистическая значимость различий: \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$

Корреляционный анализ экспрессии интактными NK-клетками (монокультура, без IL-2) рецепторов показал положительную связь относительного количества NK-клеток, экспрессирующих KIR3DL1 и CD57, и отрицательную связь количества KIR2DL3+ NK-клеток с количеством NK-клеток с фенотипом CD57+ и KIR2DL1+ NK-клеток (Таблица 4.1). У интактных NK-клеток выявлена положительная корреляция интенсивности экспрессии CD161 и CD56, CD56 и KIR2DL1, KIR2DL1 и CD117, CD161 и NKG2A, CD161 и CD117, NKG2D и NKG2C (Таблица 4.2).

Таблица 4.1 - Коэффициенты корреляции относительного количества НК-клеток в разных условиях культивирования (а - монокультивирование NK-92, b –NK-92 + JEG-3, c - NK-92+IL-2, d - NK-92+JEG-3+IL-2)

		Относительное количество НК-клеток (%)																		
Относительное количество НК-клеток (%)		CD56	CD57	CD62L	NKG2A	CD117	CD122	CD127	CD161	CD215	KIR 2DL1	KIR 2DL3	KIR 2SD4	KIR 2DL4	KIR 3DL1	NKG2C	NKG2D	NKp44	NKp30	
		CD56	-	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75
		CD57	< 0.75	-	< 0.75	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>c</sup>=0.83</b> <b>R<sup>d</sup>=0.82</b>	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>b</sup>=0.95</b> <b>R<sup>d</sup>=0.96</b>	<b>R<sup>a</sup>= -0.75</b>	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>a</sup>=0.88</b>	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75
		CD62L	< 0.75	< 0.75	-	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>b</sup>=0.82</b>	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75
		NKG2A	< 0.75	< 0.75	< 0.75	-	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75
		CD117	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	-	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75
		CD122	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	-	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>d</sup>=0.82</b>	< 0.75	< 0.75	< 0.75
		CD127	< 0.75	<b>R<sup>c</sup>=0.83</b> <b>R<sup>d</sup>=0.82</b>	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	-	< 0.75	<b>R<sup>d</sup>=0.79</b>	< 0.75	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>d</sup>=0.75</b>	<b>R<sup>c</sup>=0.82</b>	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75
		CD161	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	-	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75
		CD215	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	-	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75
		KIR 2DL1	< 0.75	<b>R<sup>b</sup>=0.95</b> <b>R<sup>d</sup>=0.96</b>	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>d</sup>=0.79</b>	< 0.75	-	<b>R<sup>a</sup>= -0.77</b>	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75
		KIR 2DL3	< 0.75	<b>R<sup>a</sup>= -0.75</b>	<b>R<sup>b</sup>=0.82</b>	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>a</sup>= -0.77</b>	-	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75
		KIR 2SD4	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	-	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>c</sup>=0.81</b> <b>R<sup>d</sup>=0.76</b>	< 0.75
		KIR 2DL4	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>d</sup>=0.75</b>	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	-	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75
		KIR 3DL1	< 0.75	<b>R<sup>a</sup>=0.88</b>	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	-	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75
		NKG2C	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>d</sup>=0.82</b>	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	-	0,76	< 0.75	< 0.75
		NKG2D	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	-	< 0.75	< 0.75
		NKp44	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>c</sup>=0.81</b> <b>R<sup>d</sup>=0.76</b>	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	-	< 0.75
		NKp30	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	-

Таблица 4.2 - Коэффициенты корреляции интенсивности экспрессии NK-клетками поверхностных рецепторов в разных условиях культивирования (a - монокультивирование NK-92, b –NK-92 + JEG-3, c - NK-92+IL-2, d - NK-92+JEG-3+IL-2)

		Интенсивность экспрессии рецепторов (MFI)																		
		CD56	CD57	CD62L	NKG2A	CD117	CD122	CD127	CD161	CD215	KIR 2DL1	KIR 2DL3	KIR 2SD4	KIR 2DL4	KIR 3DL1	NKG2C	NKG2D	NKp44	NKp30	
Интенсивность экспрессии рецепторов (MFI)	CD56	-	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>a</sup>=0.88</b> <b>R<sup>b</sup>=0.81</b> <b>R<sup>c</sup>=0.83</b> <b>R<sup>d</sup>=0.89</b>	<b>R<sup>a</sup>=0.92</b> <b>R<sup>b</sup>=0.82</b> <b>R<sup>c</sup>=0.91</b> <b>R<sup>d</sup>=0.8</b>	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>a</sup>=0.83</b> <b>R<sup>c</sup>=0.81</b>	< 0.75	<b>R<sup>a</sup>=0.86</b> <b>R<sup>c</sup>=0.81</b>	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>b</sup>=0.87</b> <b>R<sup>d</sup>=0.86</b>	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>b</sup>=0.77</b>	
	CD57	< 0.75	-	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>c</sup>=0.88</b>	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75
	CD62L	< 0.75	< 0.75	-	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75
	NKG2A	<b>R<sup>a</sup>=0.88</b> <b>R<sup>b</sup>=0.81</b> <b>R<sup>c</sup>=0.83</b> <b>R<sup>d</sup>=0.89</b>	< 0.75	< 0.75	-	<b>R<sup>a</sup>=0.80</b> <b>R<sup>b</sup>=0.85</b> <b>R<sup>c</sup>=0.77</b> <b>R<sup>d</sup>=0.87</b>	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>a</sup>=0.77</b>	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>b</sup>=0.79</b>
	CD117	<b>R<sup>a</sup>=0.92</b> <b>R<sup>b</sup>=0.82</b> <b>R<sup>c</sup>=0.91</b> <b>R<sup>d</sup>=0.87</b>	< 0.75	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>a</sup>=0.80</b> <b>R<sup>b</sup>=0.85</b> <b>R<sup>c</sup>=0.77</b> <b>R<sup>d</sup>=0.87</b>	-	< 0.75	<b>R<sup>a</sup>=0.77</b>	< 0.75	<b>R<sup>a</sup>=0.84</b> <b>R<sup>c</sup>=0.75</b>	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>b</sup>=0.87</b>
	CD122	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	-	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>b</sup>=0.82</b> <b>R<sup>d</sup>=0.87</b>	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>d</sup>=0.76</b>	< 0.75	< 0.75	
	CD127	< 0.75	<b>R<sup>c</sup>=0.88</b>	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	-	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>c</sup>=0.80</b>	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>d</sup>=0.80</b>
	CD161	<b>R<sup>a</sup>=0.83</b> <b>R<sup>c</sup>=0.81</b>	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>a</sup>=0.77</b>	<b>R<sup>a</sup>=0.77</b>	< 0.75	< 0.75	-	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75
	CD215	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	-	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75
	KIR 2DL1	<b>R<sup>a</sup>=0.86</b> <b>R<sup>c</sup>=0.81</b>	< 0.75	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>a</sup>=0.84</b> <b>R<sup>c</sup>=0.75</b>	< 0.75	<b>R<sup>c</sup>=0.80</b>	< 0.75	< 0.75	-	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75
	KIR 2DL3	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	-	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75
	KIR 2SD4	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	-	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75

Продолжение таблицы 4.2																			
Интенсивность экспрессии рецепторов (MFI)	CD56	CD57	CD62L	NKG2A	CD117	CD122	CD127	CD161	CD215	KIR 2DL1	KIR 2DL3	KIR 2SD4	KIR 2DL4	KIR 3DL1	NKG2C	NKG2D	NKp44	NKp30	
	KIR 2DL4	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>b</sup>=0.82</b> <b>R<sup>d</sup>=0.87</b>	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	-	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>b</sup>= 0.76</b> <b>R<sup>d</sup>=0.79</b>	< 0.75	< 0.75
	KIR 3DL1	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	-	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75
	NKG 2C	<b>R<sup>b</sup>=0.87</b> <b>R<sup>d</sup>=0.86</b>	< 0.75		< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	-	<b>R<sup>a</sup>= 0.76</b> <b>R<sup>c</sup>= 0.83</b>	< 0.75	< 0.75
	NKG 2D	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>d</sup>=0.76</b>	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>b</sup>=0.76</b> <b>R<sup>d</sup>=0.79</b>	< 0.75	<b>R<sup>a</sup>=0.76</b> <b>R<sup>c</sup>=0.83</b>	-	< 0.75	< 0.75
	NKp44	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	-	< 0.75
	NKp30	<b>R<sup>b</sup>=0.77</b>	< 0.75	< 0.75	<b>R<sup>b</sup>=0.79</b>	<b>R<sup>b</sup>=0.87</b>	< 0.75	<b>R<sup>d</sup>=0.80</b>	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75	< 0.75

В сокультуре НК-клеток и клеток линии JEG-3 установлена положительная корреляционная связь относительного количества НК-клеток с фенотипом KIR2DL1+ и CD57+ НК-клеток, и с фенотипом KIR2DL3+ и CD62L+ (Таблица 4.1). Также в сокультуре выявлена положительная корреляция интенсивности экспрессии НК-клетками CD56 и NKG2C, CD56 и NKp30, NKG2A и NKp30, NKp30 и CD117, CD122 и KIR2DL4, KIR4DL4 и NKG2D (Таблица 4.2).

Культивирование НК-клеток в присутствии IL-2 приводило к появлению положительной корреляционной связи количества НК-клеток с фенотипом KIR3DL1+ и CD127+, NKp44+ и KIR2DS4+, а также с фенотипом CD127+ и CD57+. В присутствии IL-2 изменения интенсивности экспрессии НК-клетками рецепторов CD56 и CD161, CD56 и KIR2DL1, CD57 и CD127, CD117 и KIR2DL1, CD127 и KIR2DL1, NKG2C и NKG2D демонстрировали положительную корреляцию (Таблицы 4.1 и 4.2).

В сокультуре в присутствии IL-2 установлена положительная корреляция относительного количества НК-клеток с фенотипом CD127+ и CD57+, KIR2DL1+ и CD57+, KIR2DL1+ и CD127+, KIR2DL4+ и CD127+, NKG2C+ и CD122+, NKp44+ и KIR2DS4+ (Таблица 4.1). В этих же условиях выявлена положительная корреляция изменений интенсивности экспрессии НК-клетками CD56 и NKG2C, NKG2D и CD122, NKp30 и CD127, CD122 и KIR2DL4, KIR2DL4 и NKG2D (Таблица 4.1).

При всех условиях культивирования выявлена положительная корреляционная связь интенсивности экспрессии НК-клетками CD56 и NKG2A, CD56 и CD117, CD117 и NKG2A (Таблица 4.2).

#### **4.2 Влияние IL-15 на фенотип клеток линии НК-92 после совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3**

После культивирования монокультуры НК-клеток в присутствии IL-15 количество CD57+ НК-клеток (Рисунок 4.3е) было выше по сравнению с этим параметром после культивирования без индукторов. Сходное изменение CD57 установлено при сравнении монокультуры, прокультивированной с IL-2 и IL-15 по сравнению с культивированием только в присутствии IL-2 (Рисунок 4.3 е).

Внесение IL-15 в сокультуру привело к повышению количества НК-клеток с фенотипом NKG2D+ (Рисунок 4.2е) и снижению количества НК-клеток с фенотипом KIR2DS4+ (Рисунок 4.2л). Сходные изменения количества НК-клеток с фенотипом NKG2D+, KIR2DS4+ (Рисунок 4.2 е, л) выявлены после внесения в сокультуру IL-2 и IL-15 по сравнению с сокультурой в присутствии только IL-2.

Отмечено повышение количества НК-клеток с фенотипом CD127+, CD215+, KIR3DL1+, KIR2DL1+ (Рисунок 4.2 б,в,к,м), CD117+, CD122+ (Рисунок 4.3 а, д) в сокультуре в присутствии IL-15 по сравнению с монокультурой, прокультивированной в присутствии IL-15. В сокультуре в присутствии IL-2 и IL-15 количество НК-клеток фенотипом CD127+, CD215+, NKG2D+, KIR3DL1+, KIR2DL1+ (Рисунок 4.2 б,в,е,к,м), а также с фенотипом CD122+ (Рисунок 4.3д) было выше, а количество NKp30 (Рисунок 4.2г) ниже по сравнению с количеством этих клеток после культивирования монокультуры в присутствии IL-2 и IL-15.

Интенсивность экспрессии CD127 НК-клетками в присутствии IL-15 была повышена в сокультуре по сравнению с сокультурой без IL-15. Сходное изменение установлено в сокультуре в IL-2 и IL-15 по сравнению с сокультурой без IL-15 (Рисунок 4.4 б). Интенсивность экспрессии НК-клетками CD56, CD127 (Рисунок 4.4 а,б) и CD122 (Рисунок 4.5д) была выше после их культивирования в сокультуре в присутствии IL-15 по сравнению с культивированием в монокультуре в присутствии IL-15. В сокультуре в присутствии IL-2 и IL-15 интенсивность экспрессии НК-клетками CD56, CD127, NKG2C (Рисунок 4.4 а,б,ж) и CD122 (Рисунок 4.5д) была выше по сравнению с интенсивностью экспрессии этих рецепторов в монокультуре в присутствии только IL-2 и IL-15.

#### **4.3 Влияние IL-18 на фенотип клеток линии НК-92 после совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3**

Культивирование НК-клеток в присутствии IL-18 в сокультуре приводило к увеличению количества НК-клеток с фенотипом NKp44+ (Рисунок 4.4 д) по сравнению с сокультурой без IL-18. Сходные изменения количества NKp44+ НК-клеток выявлены в сокультуре в присутствии IL-2 и IL-18 по сравнению с сокультурой в присутствии только IL-2 (Рисунок 4.4д). В сокультуре в присутствии IL-18 по сравнению с монокультурой в присутствии IL-18 наблюдали повышение количества НК-клеток с фенотипом CD127+, CD215+, NKp44+, NKG2D+, NKG2C+, KIR3DL1+, KIR2DL1+ (Рисунок 4.2 б,в,д,е,к,м), CD62L+ и CD122+ (Рисунок 4.3 в,д). Сходные изменения в количестве НК-клеток с фенотипом CD127+, CD215+, CD122+, NKp44+, NKG2C+, KIR3DL1+, KIR2DL1+ выявлены в сокультуре в присутствии IL-2 и IL-18 по сравнению с монокультивированием в присутствии IL-18 и IL-2 (Рисунок 4.2, Рисунок 4.3).

Внесение IL-18 к монокультуре приводило к увеличению интенсивности экспрессии НК-клетками CD56 по сравнению с культивированием без индукторов (Рисунок 4.4 а). При сравнении экспрессии CD56 НК-клетками в монокультуре в присутствии IL-2 и IL-18 по сравнению с культивированием только с IL-2 интенсивность CD56 также была повышена (Рисунок 4.4 а).



Интенсивность экспрессии CD56, CD127, NKp44, NKG2C, KIR3DL1 (Рисунок 4.4 а,б,д,ж,к) и CD122 (Рисунок 4.5д) NK-клетками в сокультуре была выше в присутствии IL-18 по сравнению с монокультурой в присутствии IL-18. Сходное повышение интенсивности экспрессии рецепторов CD56, CD127, NKp44, NKG2C, KIR3DL1 (Рисунок 4.4 а,б,д,ж,к), и для CD161, CD122 (Рисунок 4.5 б,д) NK-клетками наблюдали в сокультуре в присутствии IL-2 и IL-18 по сравнению с монокультурой в присутствии только IL-2 и IL-18.

#### **4.4 Влияние TNF $\alpha$ на фенотип клеток линии NK-92 после совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3**

В сокультуре по сравнению с монокультурой количество клеток линии NK-92 с фенотипом CD57+, KIR2DL1+, KIR3DL1+, CD127+ повышено на фоне присутствия TNF $\alpha$  в культуральной среде без IL-2 (Рисунок 4.6 д,е,з, Рисунок 4.7з). В случае культивирования в среде с IL-2 и TNF $\alpha$  количество NKG2A+ CD57+ KIR3DL1+ и CD127+ клеток линии NK-92 повышено в сокультуре по сравнению с монокультурой (Рисунок 4.6 а,д,з, Рисунок 4.7з).

В монокультуре добавление TNF $\alpha$  приводило к снижению интенсивности экспрессии клетками линии NK-92 рецептора CD56 по сравнению с культивированием без TNF $\alpha$  как в среде с IL-2, так и без IL-2 (Рисунок 4.6 а).

В случае сокультуры добавление TNF $\alpha$  приводило к повышению интенсивности экспрессии рецепторов NKG2A, NKG2C по сравнению с сокультурой клеток без TNF $\alpha$ . Эти изменения выявлены как при культивировании в среде без IL-2, так и с IL-2 (Рисунок 4.8 б,в). В присутствии TNF $\alpha$  интенсивность экспрессии клетками линии NK-92 рецепторов CD56, NKG2A, NKG2C, CD57, CD122 повышена в сокультуре по сравнению с монокультурой как при использовании среды без IL-2, так и с IL-2 (Рисунок 4.8 а,б,в,д, Рисунок 4.9ж).

#### **4.5 Влияние IL-10 на фенотип клеток линии NK-92 после совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3**

Установлено, что в присутствии IL-10 количество KIR2DL3+ и CD161+ клеток линии NK-92 повышено в сокультуре по сравнению с монокультурой в случае культивирования в среде без IL-2 (Рисунок 4.8 в,е). При культивировании в среде с IL-2 и IL-10 количество KIR2DL3+ клеток линии NK-92 также повышено в сокультуре по сравнению с монокультурой (Рисунок 4.8 в). В присутствии IL-10 повышена интенсивность экспрессии клетками линии NK-92 рецепторов CD56, CD57 в сокультуре по сравнению с монокультурой как при использовании среды без IL-2, так и с IL-2 (Рисунок 4.8 а,д).

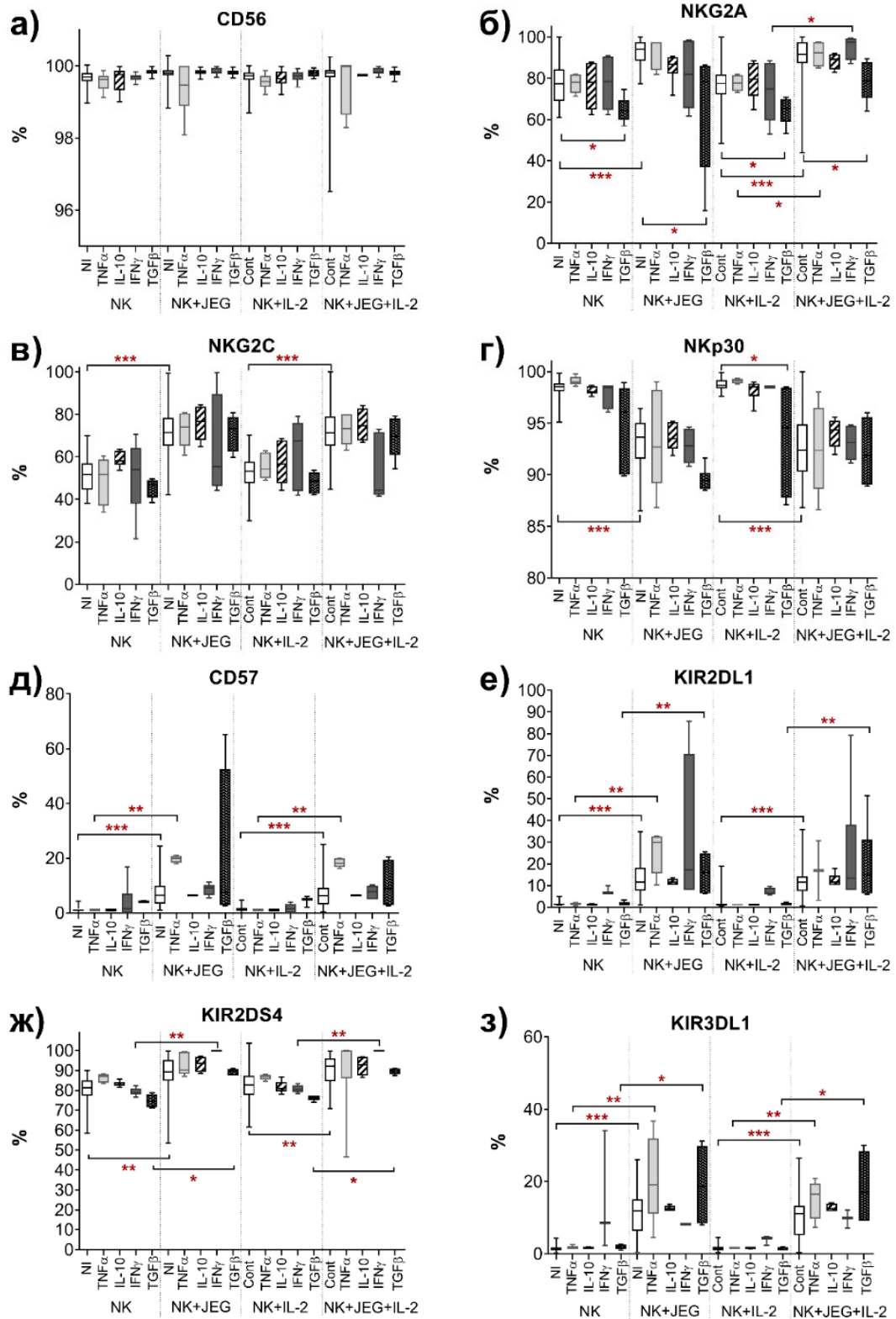


Рисунок 4.6 - Относительное количество (%) клеток линии NK-92 с фенотипом а) CD56+, б) NKG2A+, в) NKG2C+, г) NKp30+, д) CD57+, е) KIR2DL1+, ж) KIR2DS4, з) KIR3DL1 среди всего пула клеток линии NK-92, после культивирования без клеток линии JEG-3 и IL-2, с IL-2, с клетками линии JEG-3, с IL-2 и клетками линии JEG-3, в присутствии цитокинов TNF $\alpha$ , IL-10, IFN $\gamma$  и TGF $\beta$ . NI - культивирование без индукторов. Cont - (control) культивирование в присутствии IL-2. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$

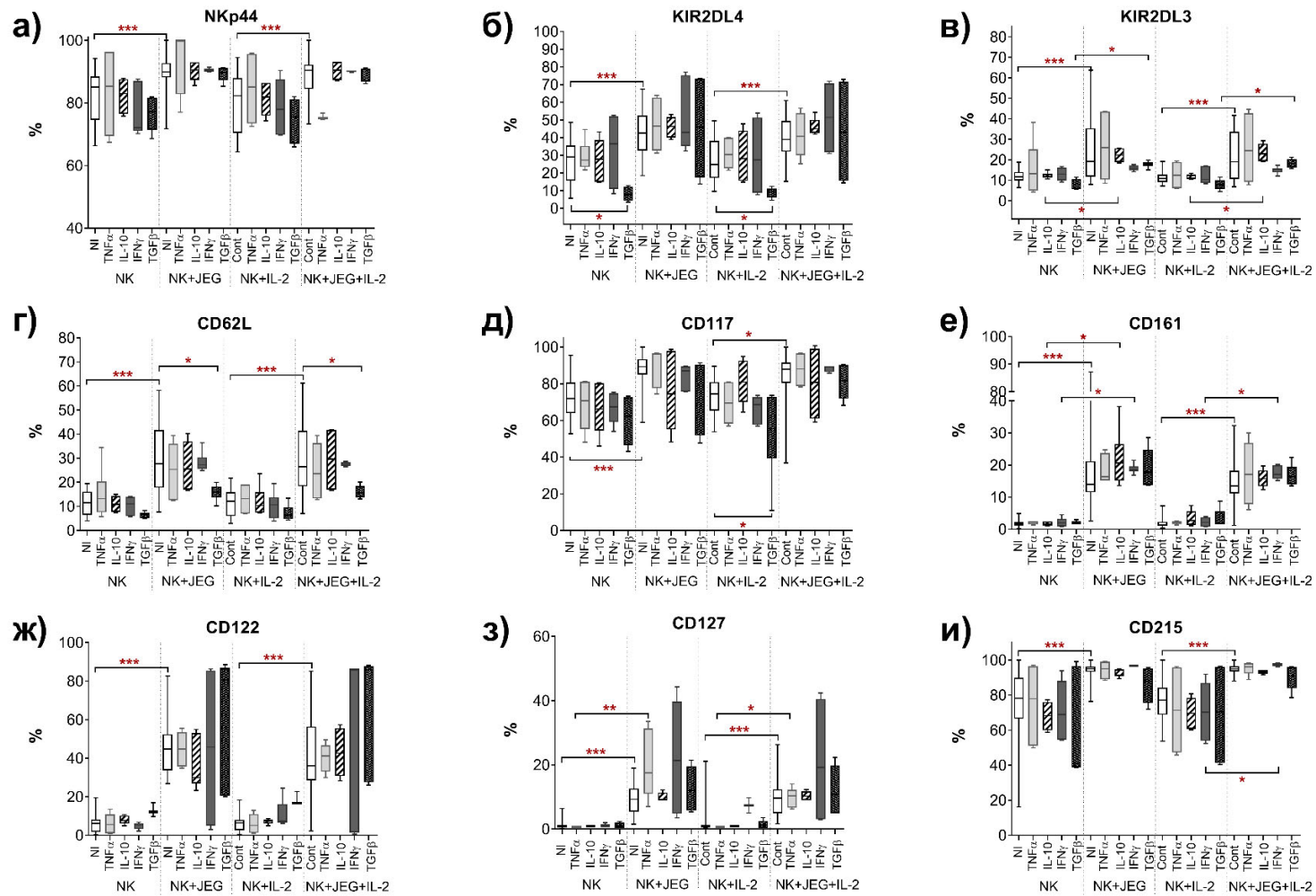


Рисунок 4.7 - Относительное количество (%) клеток линии NK-92 с фенотипом а) NKp44+, б) KIR2DL4+, в) KIR2DL3+, г) CD62L+, д) CD117+, е) CD161+, ж) CD122+, з) CD127+, и) CD215+ после культивирования без клеток линии JEG-3 и IL-2, с IL-2, с клетками линии JEG-3, с IL-2 и клетками линии JEG-3, в присутствии цитокинов TNF $\alpha$ , IL-10, IFN $\gamma$  и TGF $\beta$ . NI - культивирование без индукторов. Cont - (control) культивирование в присутствии IL-2. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$

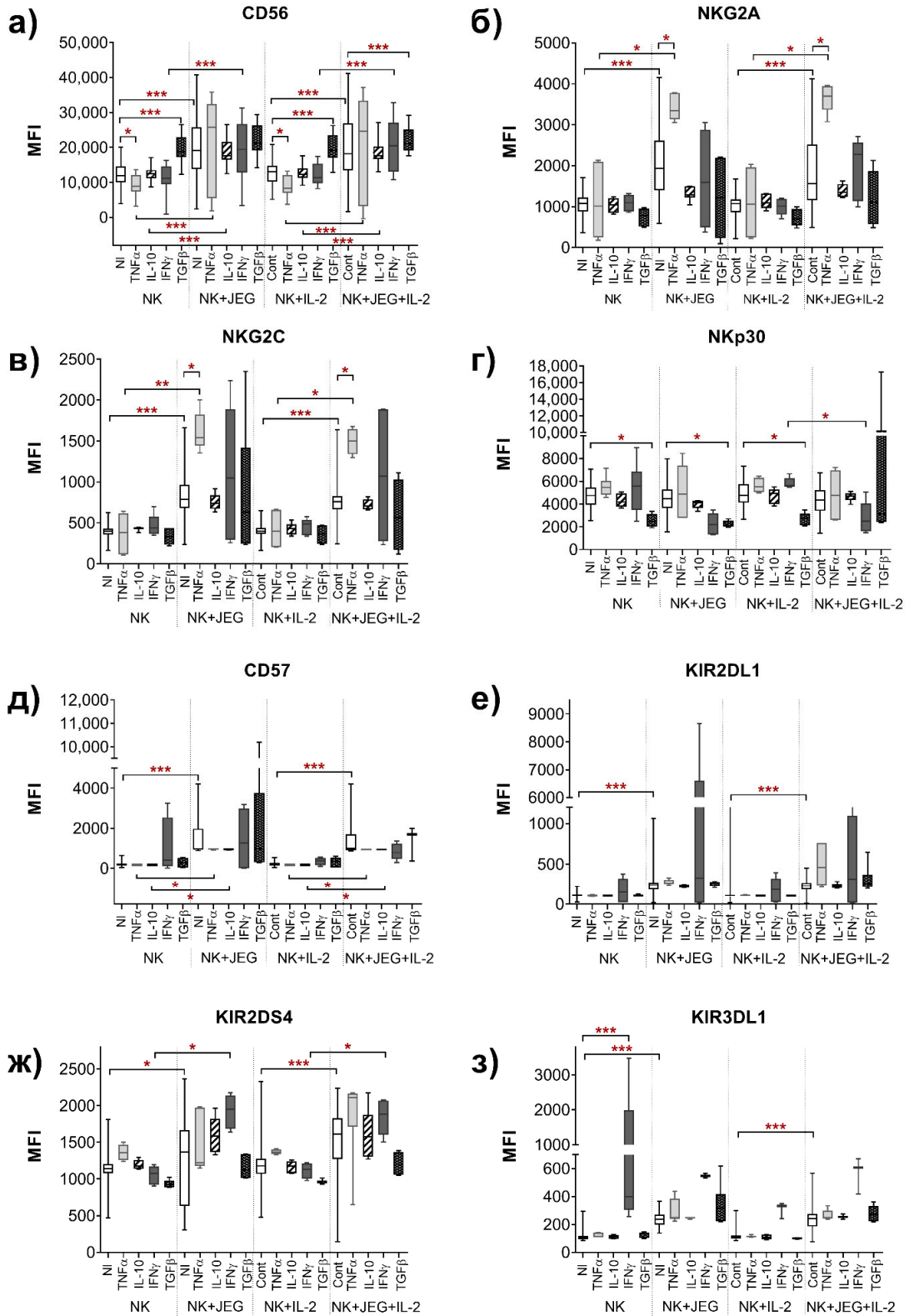


Рисунок 4.8 - Интенсивность экспрессии (MFI) клетками линии NK-92 рецепторов а) CD56, б) NKG2A, в) NKG2C, г) NKp30, д) CD57, е) KIR2DL1, ж) KIR2DS4, з) KIR3DL1 после культивирования без клеток линии JEG-3 и IL-2, с IL-2, с клетками линии JEG-3, с IL-2 и клетками линии JEG-3, в присутствии цитокинов TNF $\alpha$ , IL-10, IFN $\gamma$  и TGF $\beta$ . NI - культивирование без индукторов. Cont - (control) культивирование в присутствии IL-2. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$

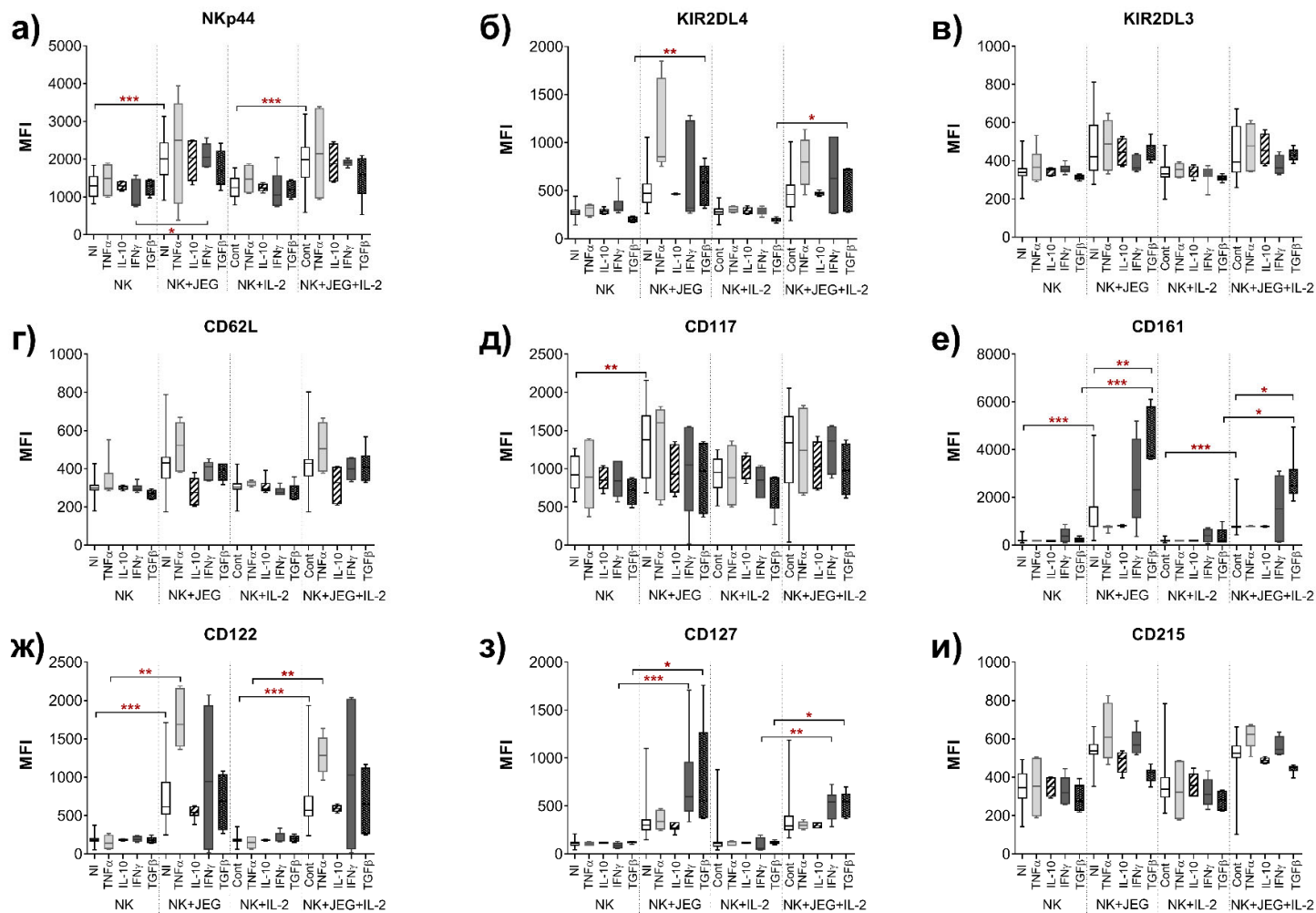


Рисунок 4.9 - Интенсивность экспрессии (MFI) клетками линии NK-92 рецепторов а) NKp44, б) KIR2DL4, в) KIR2DL3, г) CD62L, д) CD117, е) CD161, ж) CD122, з) CD127, и) CD215 после культивирования без клеток линии JEG-3 и IL-2, с IL-2, с клетками линии JEG-3, с IL-2 и клетками линии JEG-3, в присутствии цитокинов TNF $\alpha$ , IL-10, IFN $\gamma$  и TGF $\beta$ . NI - культивирование без индукторов. Cont - (control) культивирование в присутствии IL-2. Статистическая значимость различий: \* - p<0,05; \*\* - p<0,01; \*\*\* - p<0,001

#### **4.6 Влияние IFN $\gamma$ на фенотип клеток линии NK-92 после совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3**

В присутствии IFN $\gamma$  в среде без IL-2, так и с IL-2 количество клеток линии NK-92 с фенотипом KIR2DS4<sup>+</sup> и CD161<sup>+</sup> повышено в сокультуре по сравнению с монокультурой (Рисунок 4.6ж, Рисунок 4.7е). В среде с IL-2 и IFN $\gamma$  количество клеток линии NK-92 с фенотипом NKG2A<sup>+</sup> и CD215<sup>+</sup> повышено в случае сокультуры по сравнению с монокультурой (Рисунок 4.6б, Рисунок 4.7и).

Цитокин IFN $\gamma$  вызывал повышение интенсивности экспрессии NK-клетками KIR3DL1 только в случае монокультуры клеток линии NK-92 в среде без IL-2 (Рисунок 4.8з). В среде без IL-2, но с IFN $\gamma$  интенсивность экспрессии клетками линии NK-92 рецептора NKp44 повышена в случае сокультуры по сравнению с монокультурой (Рисунок 4.9а). В присутствии IFN $\gamma$  интенсивность экспрессии NK-клетками CD56, KIR2DS4 и CD127 повышена в сокультуре по сравнению с монокультурой как при использовании среды без IL-2, так и с IL-2 (Рисунок 4.8 а,ж, Рисунок 4.9з). В среде с IL-2 и IFN $\gamma$  интенсивность экспрессии клетками линии NK-92 рецептора NKp30 снижена в случае сокультуры по сравнению с монокультурой (Рисунок 4.8г).

#### **4.7 Влияние TGF $\beta$ на фенотип клеток линии NK-92 после совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3**

В монокультуре TGF $\beta$  снижал относительное количество клеток линии NK-92 с фенотипом NKG2A<sup>+</sup> KIR2DL4<sup>+</sup> по сравнению с культивированием без него как в случае культивирования NK-клеток в среде без IL-2, так и с IL-2 (Рисунок 4.6 б, Рисунок 4.7б). В монокультуре TGF $\beta$  в сочетании с IL-2 приводил к снижению количества клеток линии NK-92 с фенотипом NKp30<sup>+</sup> и CD117<sup>+</sup> по сравнению показателями монокультуры, прокультивированной только с IL-2 (Рисунок 4.6г, Рисунок 4.7д).

Добавление TGF $\beta$  в сокультуру приводило к снижению количества клеток линии NK-92, экспрессирующих NKG2A и CD62L, по сравнению с сокультурой, но без TGF $\beta$  (Рисунок 4.6б, Рисунок 4.г). Эти изменения установлены как в случае использования среды без IL-2, так и с IL-2. В сокультуре по сравнению с монокультурой в среде с добавлением TGF $\beta$  количество клеток линии NK-92 с фенотипом KIR2DL1<sup>+</sup> KIR2DS4<sup>+</sup> KIR3DL1<sup>+</sup> KIR2DL3<sup>+</sup> повышено (Рисунок 4.6 е-з, Рисунок 4.7в). Эти изменения установлены как в случае использования среды без IL-2, так и с IL-2.

Цитокин TGF $\beta$  в монокультуре повышал интенсивность экспрессии CD56 клетками линии NK-92 и снижал интенсивность экспрессии NKp30 как в среде как без IL-2, так и с IL-2

(Рисунок 4.8 а,г). Интенсивность экспрессии клетками линии NK-92 рецепторов KIR2DL4, CD161, CD127 повышена в сокультуре по сравнению с монокультурой на фоне присутствия TGF $\beta$  в культуральной среде без IL-2, и с IL-2 (Рисунок 4.9 б,е,з).

В сокультуре в среде без IL-2 TGF $\beta$  снижал интенсивность экспрессии NKp30 клетками линии NK-92 после по сравнению с сокультурой без TGF $\beta$  (Рисунок 4.8г). В среде с IL-2 TGF $\beta$  повышал интенсивность экспрессии клетками линии NK-92 рецептора CD56 в сокультуре по сравнению с сокультурой без TGF $\beta$  (Рисунок 4.8а). Интенсивность экспрессии NK-клетками рецептора CD161 повышена в сокультуре после добавления TGF $\beta$  по сравнению с сокультурой без TGF $\beta$  как в случае культивирования в среде без IL-2, так и с IL-2 (Рисунок 4.9е).

Результаты оценки влияния цитокинов IL-15 и IL-18, TNF $\alpha$ , IL-10, IFN $\gamma$  и TGF $\beta$  на фенотипический профиль клеток линии NK-92 в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3 и без них отражены на рисунке-схеме 4.10.

#### **4.8 Влияние кондиционированных сред ворсин хориона на фенотип клеток линии NK-92 после совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3**

Анализ экспрессии рецепторов клетками линии NK-92 не выявил различий между NK-клетками, прокультивированными без IL-2 и в присутствии IL-2 (Рисунки 4.1 а). Так как клетки линии NK-92 рекомендовано культивировать в присутствии IL-2 (ATCC, USA) для оценки влияния КС ворсин хориона на NK-клетки все варианты культивирования, представленные на рисунках, проведены в присутствии IL-2 (Рисунок 4.11, Рисунок 4.12).

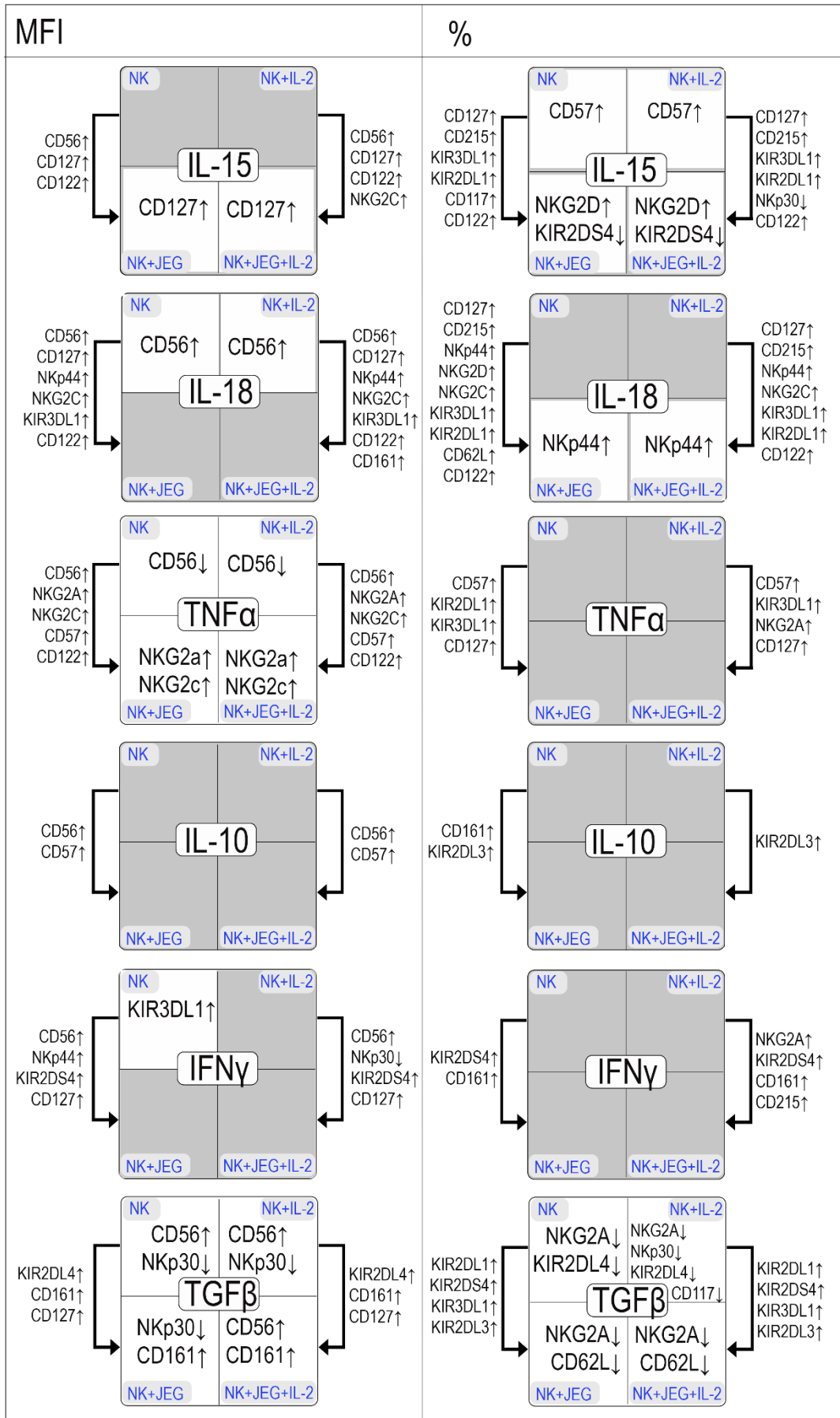


Рисунок 4.10 - Влияние цитокинов IL-15, IL-18, TNFα, IL-10, IFNγ и TGFβ на клетки линии NK-92 в разных вариантах культивирования



Подпись к рисунку 4.10:

Левая часть схемы отражает данные по интенсивности экспрессии рецепторов НК-клетками (MFI), правая часть схемы отражает данные по относительному количеству НК-клеток. В каждом прямоугольнике отражены четыре варианта культивирования: НК-клетки в монокультуре (NK), НК-клетки, прокультивированные с IL-2 (NK+IL-2), НК-клетки в сокультуре с клетками трофобласта линии Jeg-3 (NK+JEG), НК-клетки в сокультуре с клетками трофобласта линии JEG-3, прокультивированные с IL-2 (NK+JEG+IL-2). Изменения экспрессии или относительного количества НК-клеток в результате добавления цитокина в каждом варианте культивирования отражены внутри прямоугольника. Изменения экспрессии или относительного количества НК-клеток в случае культивирования клеток в сокультуре по сравнению с монокультивированием, на фоне присутствия в культуральной среде цитокина, отражены стрелками слева и справа от прямоугольников.

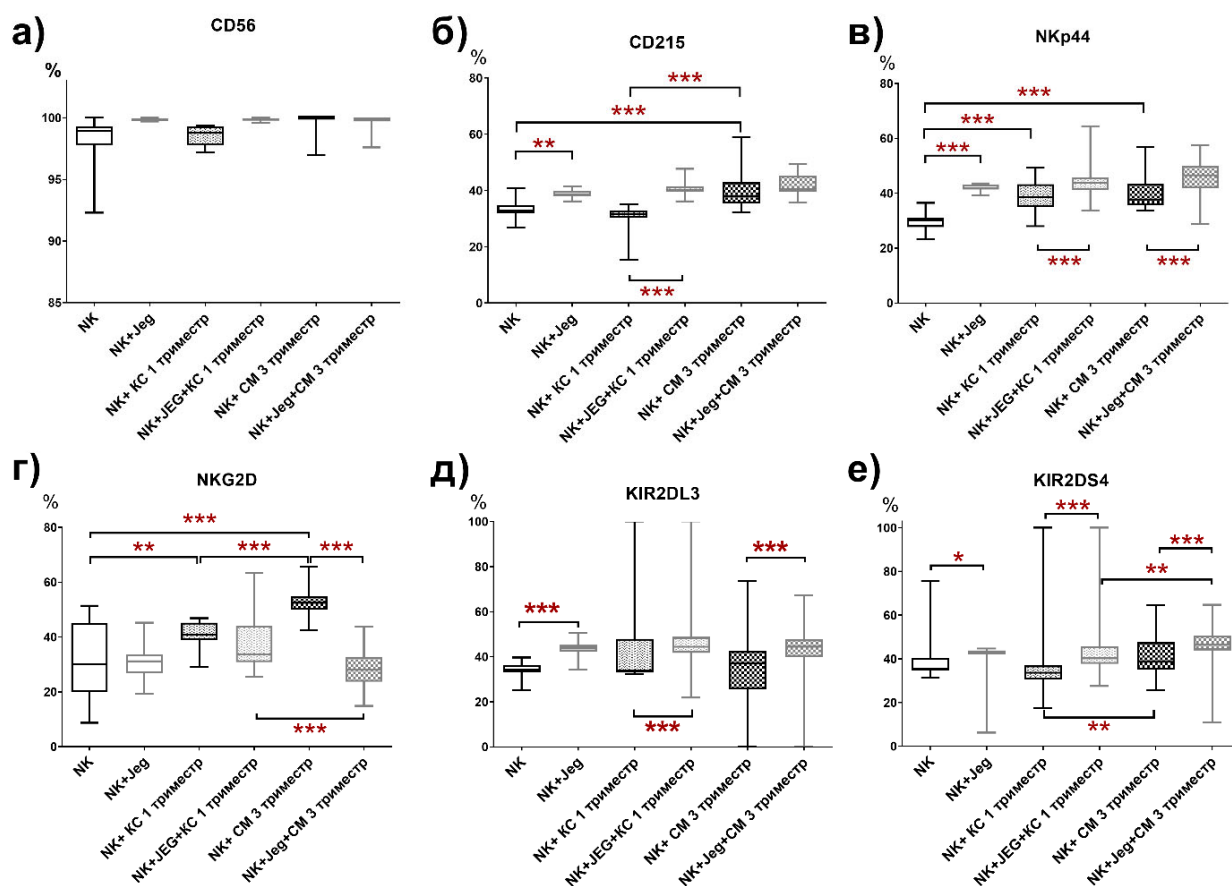


Рисунок 4.11 - Относительное количество (%) клеток линии NK-92 с фенотипом а) CD56+, б) CD215+, в) NKp44+, г) NKG2D+, д) KIR2DL3+, е) KIR2DS4+ среди всего пула клеток линии NK-92, после культивирования без и в присутствии клеток линии JEG-3, в присутствии KS ворсин хориона I и III триместров беременности. Все варианты культивирования проведены в присутствии IL-2. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ .

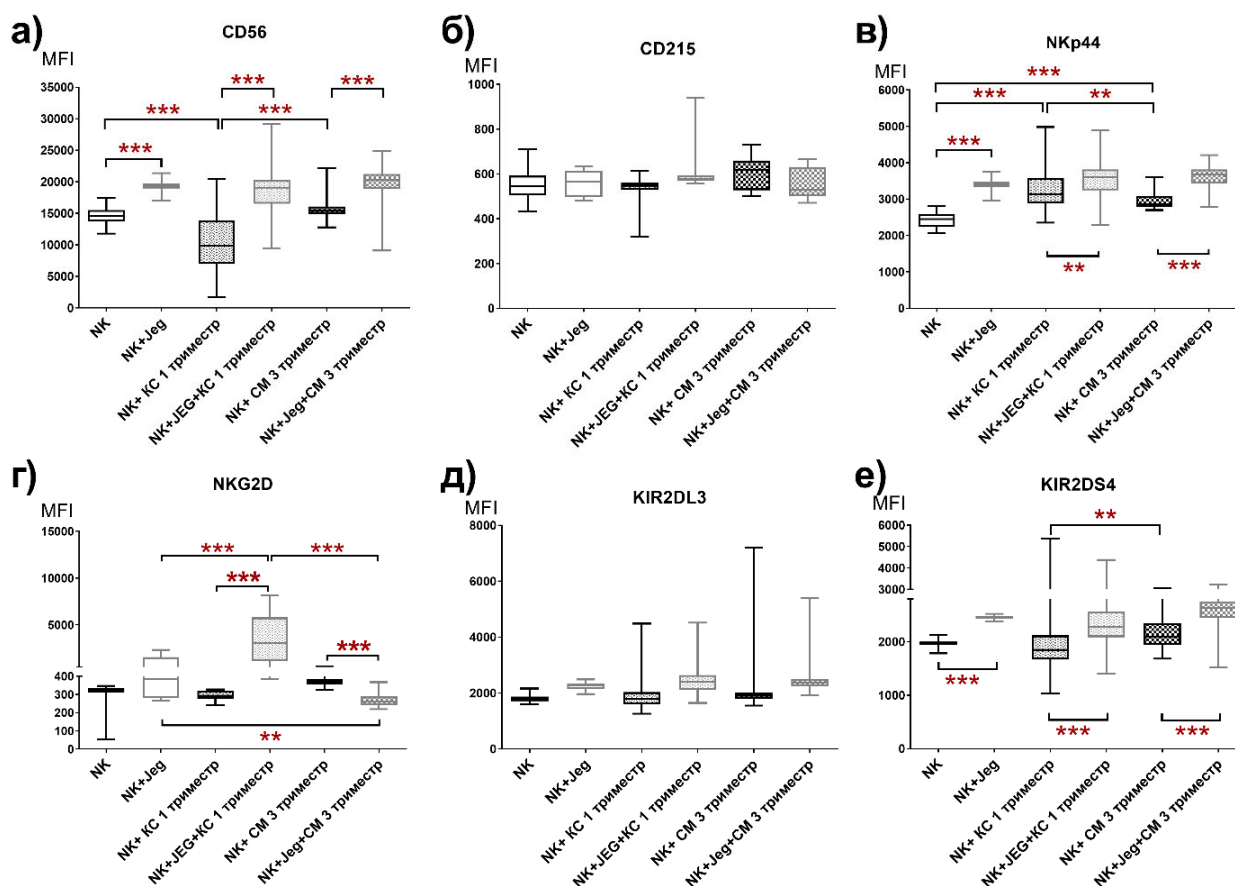


Рисунок 4.12 - Интенсивность экспрессии (MFI) клетками линии NK-92 рецепторов а) CD56, б) CD215, в) NKp44, г) NKG2D, д) KIR2DL3, е) KIR2DS4 после культивирования без и в присутствии клеток линии JEG-3, в присутствии KC ворсин хориона I и III триместров беременности. Все варианты культивирования проведены в присутствии IL-2. Статистическая значимость различий: \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$

В используемой модельной системе в сокультуре по сравнению с монокультурой экспрессия рецепторов CD56, CD215, NKp44, NKG2D, KIR2DL3, KIR2DS4 изменялась аналогично изменениям, установленным на предыдущем этапе (культивирование в присутствии цитокинов).

В монокультуре в присутствии KC ворсин хориона I триместра количество NK-клеток с фенотипом NKG2D<sup>+</sup> и NKp44<sup>+</sup> и интенсивность экспрессии NKp44 NK-клетками были выше (Рисунок 4.11 в,г, Рисунок 4.12в), в то время как интенсивность экспрессии NK-клетками CD56 была ниже (Рисунок 4.11 а) по сравнению монокультурой без KC ворсин хориона. В монокультуре в присутствии KC III триместра беременности количество NK-клеток с фенотипом CD215<sup>+</sup>, NKp44<sup>+</sup>, NKG2D<sup>+</sup> (Рисунок 4.11 б,в,г), а также интенсивность экспрессии

НК-клетками НКp44 (Рисунок 4.12 в) были выше по сравнению с монокультурой без КС ворсин хориона.

Количество НК-клеток с фенотипом CD215+, NKG2D+, KIR2DS4+ (Рисунок 4.11 б,г,е) и интенсивность экспрессии НК-клетками CD56 и KIR2DS4 (Рисунок 4.12 а,е) были выше, а интенсивность НКp44 (Рисунок 4.12 в) - ниже в монокультуре после культивирования с КС ворсин хориона III триместра беременности по сравнению с этими параметрами после культивирования с КС ворсин хориона I триместра беременности.

В присутствии КС ворсин хориона I триместра в сокультуре по сравнению с монокультурой количество НК-клеток с фенотипом CD215+, НКp44+, KIR2DL3+, KIR2DS4+ (Рисунок 4.11 б,в,д,е) и интенсивность экспрессии ими CD56, НКp44, NKG2D, KIR2DS4 (Рисунок 4.12 а,в,г,е) повышены. В присутствии КС ворсин хориона III триместра в сокультуре по сравнению с монокультурой повышено количество НК-клеток с фенотипом НКp44+, KIR2DL3+, KIR2DS4+ ((Рисунок 4.11 в,д,е) и интенсивность экспрессии ими CD56, НКp44, KIR2DS4 ((Рисунок 4.12 а,в,е), но снижено количество и интенсивность экспрессии NKG2D (Рисунок 4.11 г, Рисунок 4.12 г).

В сокультуре в присутствии КС ворсин хориона I триместра по сравнению с сокультурой без КС повышена интенсивности экспрессии НК-клетками NKG2D (Рисунок 4.12 г). В сокультуре в присутствии КС ворсин хориона III триместра снижена интенсивность экспрессии НК-клетками NKG2D (Рисунок 4.12 г) по сравнению с сокультурой без КС.

Количество НК-клеток с фенотипом KIR2DS4+ было выше (Рисунок 4.11 е), а количество NKG2D+ НК-клеток (Рисунок 4.11 г) и интенсивность экспрессии NKG2D (Рисунок 4.12 г) ниже в сокультуре в присутствии КС ворсин хориона III триместра по сравнению с сокультурой в присутствии КС ворсин хориона I триместра. Для рецепторов CD127, CD122, NKG2C, KIR2DL4, KIR3DL1, KIR2DL1 не выявлено изменений количества НК-клеток или интенсивности экспрессии в результате культивирования с КС ворсин хориона I и III триместров беременности, без и в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3.

#### **4.9 Содержание мРНК гена *NCAM1*, кодирующего CD56, в клетках линии НК-92 в присутствии цитокинов**

Проанализировано влияние цитокинов IL-15, IL-18, TNF $\alpha$ , IL-10, IFN $\gamma$ , TGF $\beta$  на содержание мРНК гена *NCAM1*, кодирующего CD56, в клетках линии НК-92 после инкубации в течение 96 часов, по схеме, предложенной для культивирования НК-клеток совместно с клетками трофобласта (Рисунок 4.13). Установлено, что культивирование клеток линии НК-92

в присутствии  $TNF\alpha$  приводило к снижению содержания мРНК гена *NCAM1*, кодирующего CD56, в клетках, в то время как культивирование в присутствии  $TGF\beta$  способствовало повышению содержания мРНК, кодирующей CD56 (Рисунок 4.13).

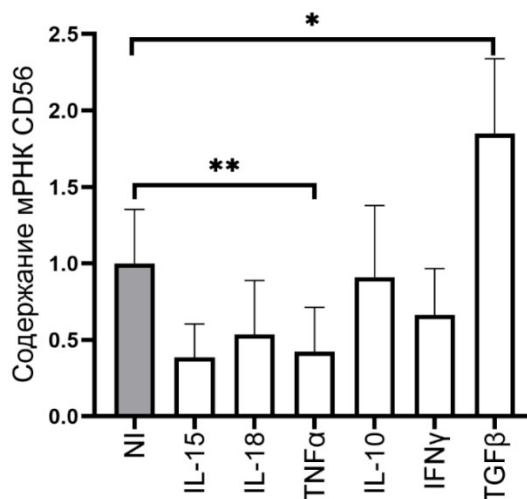


Рисунок 4.13 - Содержание мРНК гена *NCAM1*, кодирующего CD56, в клетках линии NK-92 после культивирования в течение 96 часов в присутствии цитокинов IL-15, IL-18,  $TNF\alpha$ , IL-10, IFN $\gamma$ ,  $TGF\beta$ . NI - культивирование без индукторов. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

#### 4.10 Активация сигнального пути $TGF\beta$ в клетках линии NK-92 под влиянием клеток трофобласта линии JEG-3

Так как в работе установлено, что клетки трофобласта линии JEG-3 секретируют  $TGF\beta$  (глава 3, метод СВА), а в присутствии цитокинов повышают секрецию, следующим этапом работы был анализ содержания  $TGF\beta$  в клетках трофобласта в условиях сокультуры с NK-клетками. Методом Western Blot подтверждено наличие  $TGF\beta$  в клетках линии JEG-3. Установлено сниженное содержание  $TGF\beta$  в клетках линии JEG-3 после их совместно культивирования с клетками линии NK-92, по сравнению с интактными клетками линии JEG-3 (Рисунок 4.14).

Репрезентативный иммуноблот SMAD2/3 и фосфорилированной формы (pSMAD2/3) продемонстрирован на рисунке 4.15 (а). Совместное культивирование с клетками трофобласта приводило к увеличению содержания SMAD2/3 и pSMAD2/3 в клетках линии NK-92 по сравнению с интактными клетками линии NK-92 (Рисунок 4.15 б,в). В то же время, различий в

соотношении фосфорилированной формы к общему содержанию SMAD2/3 в клетках NK-92 после совместного культивирования не выявлено (Рисунок 4.15 г).

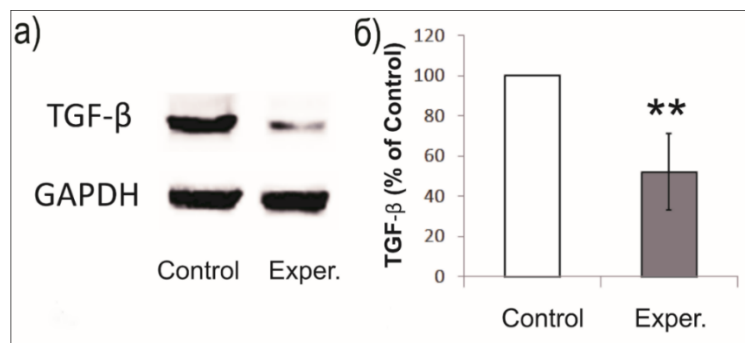


Рисунок 4.14 - Содержание TGFβ в клетках линии JEG-3 после контактного сокультивирования с клетками линии NK-92. а) Иммуноблот, демонстрирующий содержание TGFβ в интактных клетках линии JEG-3 (Control) и после их контактного (Exper.) взаимодействия с клетками NK-92; (б) Содержание TGFβ, нормализованное относительно GAPDH, в клетках линии JEG-3 после контактного сокультивирования с клетками линии NK-92. Статистическая значимость отличия от интактных клеток линии JEG-3 \*\* -  $p < 0,01$

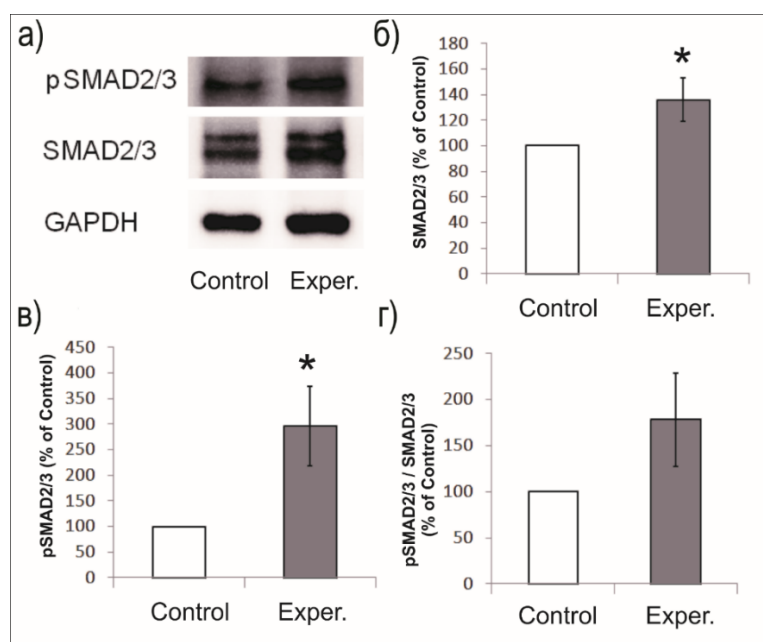


Рисунок 4.15 - Содержание общего SMAD2/3 и фосфорилированного SMAD2/3 (pSMAD2/3) в клетках линии NK-92. а) Иммуноблот, демонстрирующий содержание общего SMAD2/3 и pSMAD2/3 в интактных клетках линии NK-92 (Control) и клетках линии NK-92 после их совместного культивирования с клетками линии JEG-3 (Exper.); Содержание SMAD2/3 (б) и pSMAD2/3 (в), нормализованное относительно GAPDH, в клетках линии NK-92 после их совместного культивирования с клетками линии JEG-3; г) Содержание pSMAD2/3 относительно общего количества SMAD2/3 в клетках линии NK-92 после их сокультивирования с клетками линии JEG-3. Статистическая значимость отличия от интактных клеток линии JEG-3 \* -  $p < 0,05$

#### 4.11 Влияние цитокинов и клеток трофобласта линии JEG-3 на фенотип рNK-клеток здоровых небеременных женщин

Для оценки влияния цитокинов на рNK-клетки использовали мононуклеары, полученные от здоровых небеременных женщин в секреторной фазе менструального цикла. Группа I-b была подразделена на подгруппы в зависимости от акушерского анамнеза: здоровые небеременные женщины (подгруппа 1, n=8) и здоровые фертильные небеременные женщины, в анамнезе у которых были одна и более беременности, закончившиеся родами в срок (подгруппа 2, n=13). Анализ фенотипа рNK-клеток до культивирования не выявил различий между 1 и 2 подгруппами здоровых небеременных женщин. В связи с этим все обследованные женщины были объединены в одну группу. Для оценки влияния цитокинов на рNK-клетки на основании результатов предыдущих этапов работы был выбран TGF $\beta$ , а также IL-15 и IL-18.

На рисунке 4.16 представлены репрезентативные графики экспрессии CD56 клетками линии NK-92 и рNK-клетками. Установлено, что количество CD56<sup>+</sup> рNK-клеток в составе фракции мононуклеаров не изменялось в зависимости от условий культивирования (Рисунок 4.17а).

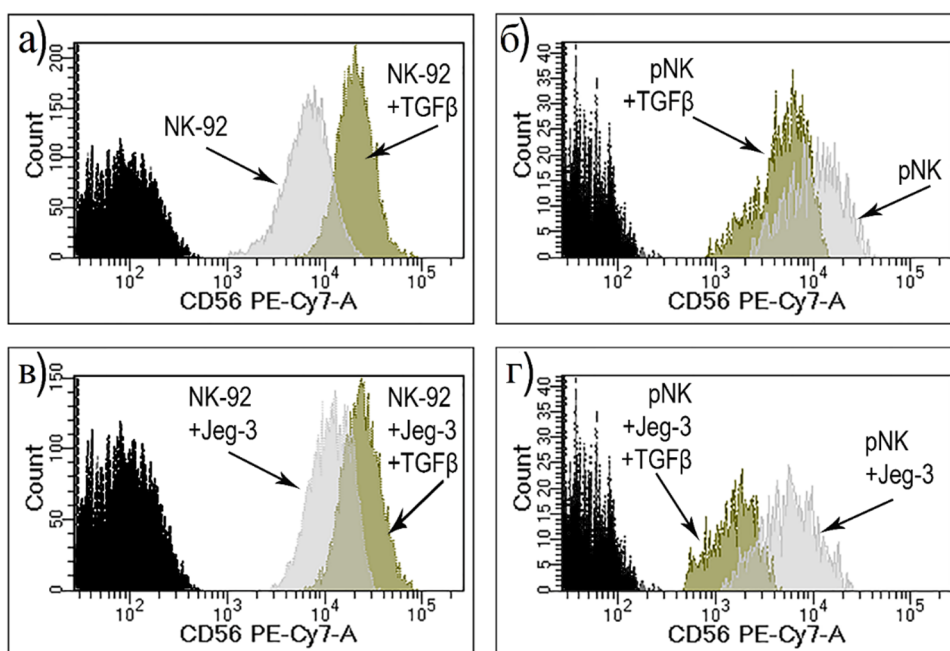


Рисунок 4.16 - Интенсивность экспрессии CD56 клетками линии NK-92 (а, в) и рNK-клетками (б, г). Клетки, прокультивированные без индукторов обозначены светло серым цветом, клетки, прокультивированные с TGF $\beta$  - темно серым. Изотипический контроль отражен черным цветом

После культивирования мононуклеаров периферической крови с TGF $\beta$  количество рНК-клеток с фенотипом NKp44<sup>+</sup> и KIR2DS4<sup>+</sup> (Рисунок 4.17 в,г), а также интенсивность экспрессии ими CD56, KIR2DS4, KIR2DL1 (Рисунок 4.18 а,г,д) были снижены по сравнению с нестимулированными рНК-клетками.

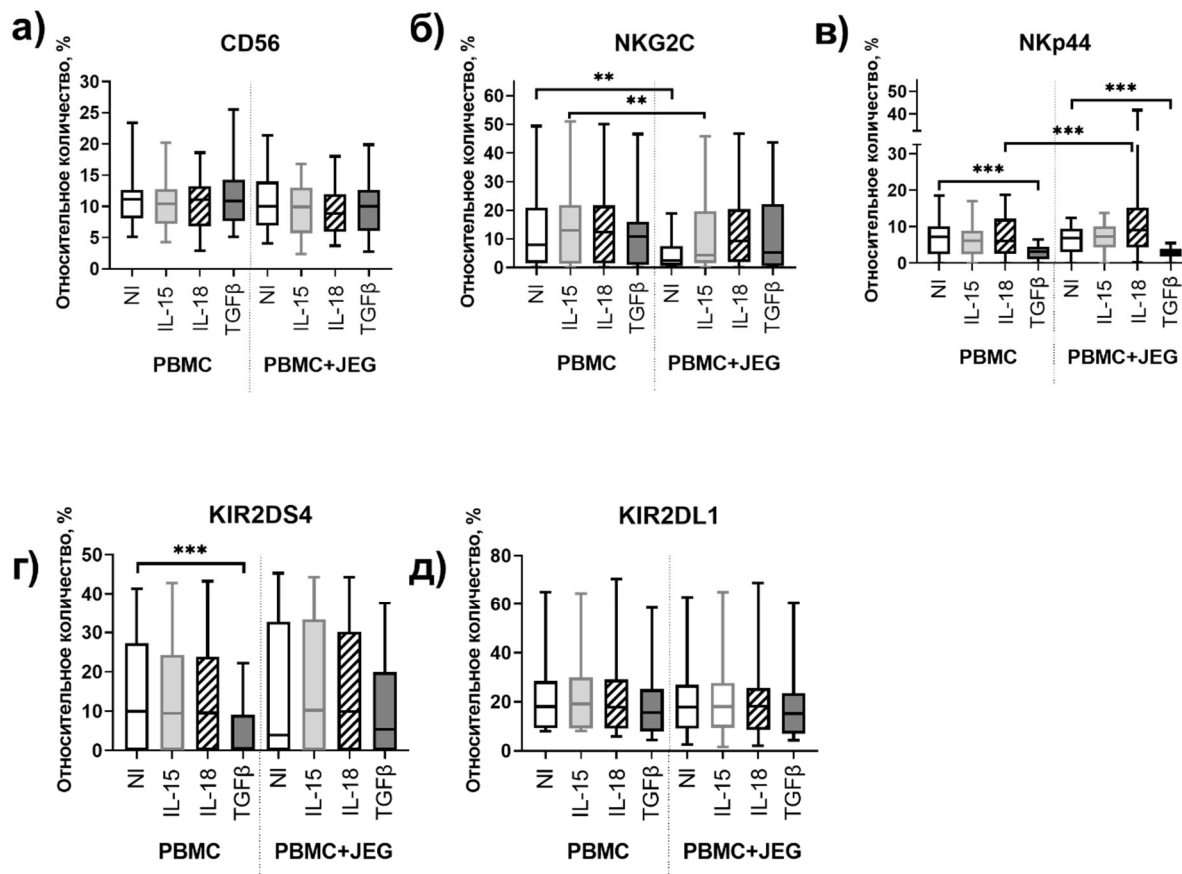


Рисунок 4.17 - Относительное количество рНК-клетками с фенотипом CD56<sup>+</sup> (а), NKG2C<sup>+</sup> (б), NKp44<sup>+</sup> (в), KIR2DS4<sup>+</sup> (г), KIR2DL1<sup>+</sup> (д) после культивирования без и в присутствии клеток линии JEG-3, в присутствии цитокинов TGF $\beta$ , IL-15 или IL-18. Все варианты культивирования проведены в присутствии IL-2. Статистическая значимость различий: \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$

В сокультуре с клетками линии JEG-3 количество рНК-клеток с фенотипом NKG2C<sup>+</sup> и интенсивность экспрессии рНК-клетками CD56 были снижены по сравнению с количеством этих клеток после культивирования без клеток трофобласта (Рисунок 4.17 б, Рисунок 4.18 а).

В сокультуре с клетками трофобласта в присутствии TGF $\beta$  снижено количество NKp44<sup>+</sup> рНК-клеток (Рисунок 4.17 в) и интенсивность экспрессии NK-клетками рецепторов CD56, NKp44, KIR2DS4, KIR2DL1 по сравнению с рНК-клетками в сокультуре с клетками трофобласта линии JEG-3 без добавления TGF $\beta$  (Рисунок 4.18 а,в,г,д).

Интенсивность экспрессии рНК-клетками CD56 была снижена после культивирования мононуклеаров в среде, содержащей TGF $\beta$ , присутствии клеток трофобласта линии JEG-3 по сравнению с монокультурой мононуклеаров в среде с TGF $\beta$  (Рисунок 4.18 а).

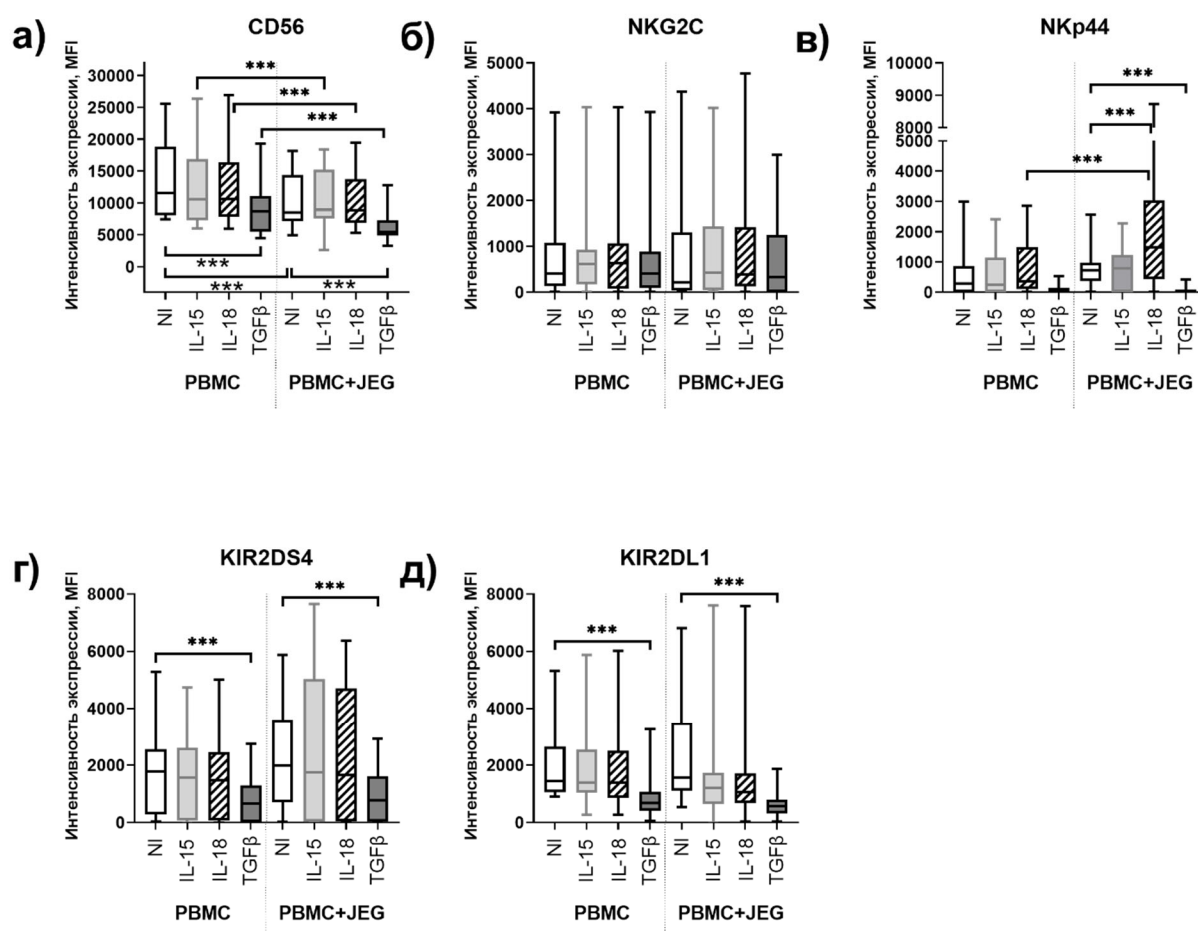


Рисунок 4.18 - Интенсивность экспрессии рНК-клетками рецепторов CD56 (а), NKG2C (б), NKp44 (в), KIR2DS4 (г), KIR2DL1 (д) после культивирования без и в присутствии клеток линии JEG-3, в присутствии цитокинов TGF $\beta$ , IL-15 или IL-18. Все варианты культивирования проведены в присутствии IL-2. Статистическая значимость различий: \*\*\* -  $p < 0,001$

Выявлено сниженное количество NKG2C<sup>+</sup> рНК-клеток в сокультуре в среде с IL-15 по сравнению с рНК-клетками в составе мононуклеарной фракции, прокультивированными с IL-15, но без клеток трофобласта (Рисунок 4.18 б). В присутствии IL-15, а также в присутствии IL-18 для рНК-клеток в сокультуре с клетками трофобласта линии JEG-3, характерна более низкая интенсивность экспрессии CD56 по сравнению с рНК-клетками, в составе мононуклеарной фракции прокультивированными с цитокинами и без клеток трофобласта (Рисунок 4.18 а). Количество NKp44<sup>+</sup> рНК-клеток и интенсивность экспрессии ими NKp44 были повышены в сокультуре в присутствии IL-18 по сравнению с мононуклеарами, прокультивированными только с IL-18 (Рисунок 4.17 в, Рисунок 4.18 в). Кроме того, в сокультуре в присутствии IL-18



повышена интенсивность экспрессии рNK-клетками NKp44 по сравнению с сокультурой без индукторов (Рисунок 4.18 в). Различий в экспрессии рецепторов KIR3DL1, KIR2DL3, KIR2DL4, CD215, CD122, CD127, NKG2D между условиями культивирования без и в присутствии клеток линии JEG-3 и цитокинов IL-15, IL-18 и TGF $\beta$  не выявлено.

#### 4.12 Влияние клеток трофобласта линии JEG-3 на содержание транскрипционных факторов в клетках линии NK-92

Оценено содержание Eomes, T-bet, GATA-3, AhR, ROR $\alpha$ , ROR $\gamma$ t в клетках линии NK-92 после культивирования с клетками трофобласта и цитокинами. Продемонстрировано содержание всех проанализированных транскрипционных факторов в NK-клетках, однако содержание GATA-3 можно расценивать, как следовое. Количество клеток линии NK-92, содержащих транскрипционные факторы AhR, Eomes, ROR $\alpha$ , T-bet, после совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3 было снижено по сравнению с количеством таких NK-клеток в монокультуре (Рисунок 4.19 а). Также установлено, что интенсивность экспрессии AhR, Eomes, ROR $\alpha$ , T-bet в NK-клетках после совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3 снижена по сравнению с интенсивностью их экспрессии NK-клетками в монокультуре (Рисунок 4.19 б).

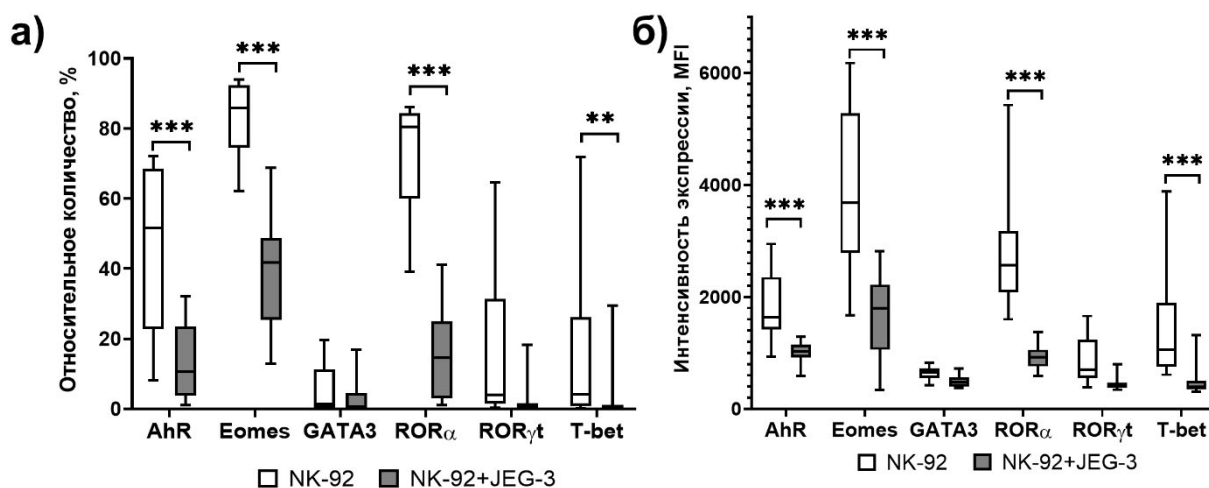


Рисунок 4.19 - Относительное количество (а) и интенсивность экспрессии (б) клетками линии NK-92 транскрипционных факторов AhR, Eomes, GATA3, ROR $\alpha$ , ROR $\gamma$ t, T-bet после культивирования без и в присутствии клеток линии JEG-3. Статистическая значимость различий: \*\* - p<0,01, \*\*\* - p<0,001

В целом, продемонстрировано, что длительное культивирование, в течение 96 часов, клеток линии NK-92 в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3 стимулирует выраженное изменение фенотипа NK-клеток. Анализ корреляционных связей позволил установить положительные корреляции относительного количества NK-клеток, экспрессирующих активационные (KIR2DS4, NKG2C, NKp44) и ингибиторные (KIR2DL1) рецепторы цитотоксичности с количеством NK-клеток, экспрессирующих такие рецепторы дифференцировки, как CD127, CD57. Также показана, положительная корреляция изменений интенсивности экспрессии NK-клетками цитотоксических рецепторов и фенотипического маркера CD56, что позволяет в дальнейшем использовать его в качестве основного при оценке степени дифференцировки NK-клеток. Установлено, что цитокины могут влиять на изменение NK-клетками фенотипа, причем в условиях монокультуры и сокультуры с клетками трофобласта эффекты цитокинов различаются. Показано, что IFN $\gamma$  приводил к повышению экспрессии активационного рецептора KIR3DL1 клетками линии NK-92 только в случае монокультивирования. В то же время TNF $\alpha$  вызывал снижение экспрессии CD56 клетками линии NK-92, а IL-10 не изменял экспрессию рецепторов клетками линии NK-92. В условиях монокультуры IL-15 и IL-18 почти не влияли на фенотип клеток линии NK-92, в то же время в присутствии клеток трофобласта IL-15 вызывал увеличение количества NKG2D<sup>+</sup> NK-клеток и интенсивности экспрессии ими CD127. Продemonстрировано, что IL-18 вызывал повышение количества NKp44<sup>+</sup> клеток линии NK-92. В случае сокультивирования с клетками трофобласта TNF $\alpha$  повышал интенсивность экспрессии клетками линии NK-92 NKG2C и NKG2A. Под влиянием TGF $\beta$  в условиях моно- и сокультуры экспрессия CD56 была повышена наряду со сниженной экспрессией NKp30, что можно расценивать как приобретение регуляторного фенотипа. Было также оценено влияние КС ворсин хориона на характер взаимодействия клеток линии NK-92 и клеток трофобласта линии JEG-3. В присутствии КС I триместра и клеток трофобласта NK-клетки демонстрировали повышение интенсивности экспрессии рецептора NKG2D. В присутствии КС III триместра и клеток трофобласта линии JEG-3 установлено снижение экспрессии NKG2D NK-клетками. Для определения, насколько полно отражает фенотип клеток степень их дифференцировки, было проанализировано содержание мРНК гена *NCAM1*, кодирующего CD56, в клетках линии NK-92 после длительной инкубации в присутствии цитокинов. Показано, что TNF $\alpha$  вызывал снижение содержания мРНК гена *NCAM1*, кодирующего CD56, в NK-клетках, в то время как TGF $\beta$  повышал ее содержание. Для оценки активации внутриклеточной передачи сигнала в NK-клетках в результате взаимодействия с клетками трофобласта проведен анализ белков SMAD в NK-клетках. Показано, что содержание фосфорилированных форм SMAD2/3 возрастает в NK-клетках после инкубации в присутствии клеток трофобласта. Анализ содержания транскрипционных факторов в NK-клетках показал

снижение экспрессии Eomes, AhR, ROR $\alpha$ , T-bet в случае сокультуры с клетками трофобласта. Таким образом, взаимодействие NK-клеток с клетками трофобласта носит не только рецептор-опосредованный характер, но и вызывает внутриклеточные изменения в NK-клетках. Для приближения модели взаимодействия к условиям *in vivo* были также использованы мононуклеарные фракции, содержащие pNK-клетки. Установлено, что интенсивность экспрессии pNK-клетками CD56 снижена в условиях сокультуры с клетками трофобласта по сравнению с культивированием мононуклеарной фракции без клеток трофобласта. Отмечено, что при добавлении IL-15 снижено содержание NKG2C<sup>+</sup> pNK-клеток в присутствии клеток трофобласта по сравнению с их количеством в случае только мононуклеарной фракции. На фоне присутствия в культуральной среде IL-18 интенсивность экспрессии pNK-клетками активационного рецептора NKp44 в присутствии клеток трофобласта повышена. Однако, интенсивность экспрессии CD56 pNK-клетками в присутствии клеток трофобласта была снижена по сравнению с экспрессией без клеток трофобласта как на фоне IL-18 в культуральной среде, так и в случае добавления IL-15. В случае добавления TGF $\beta$  к монокультуре мононуклеаров, а также к сокультуре мононуклеаров и клеток линии JEG-3 выявлена сниженная экспрессия CD56, NKp44, KIR2DS4, KIR2DL1 pNK-клетками.

## **ГЛАВА 5. ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ НК-КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ПРИСУТСТВИИ КЛЕТОК ТРОФОБЛАСТА**

Для анализа пролиферации рНК-клеток в присутствии клеток трофобласта и изменения их популяционного состава проводили культивирование мононуклеаров периферической крови и рпНК-клеток в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3 в течение 144 часов как описано выше (п. 2.4.1 - 2.4.4).

### **5.1 Проллиферативная активность рНК-клеток в составе мононуклеаров в присутствии клеток трофобласта, у здоровых небеременных женщин и беременных женщин в I триместре**

Установлено, что до культивирования относительное количество НК-клеток среди лейкоцитов с фенотипом CD45<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> не различалось между группами обследованных женщин (Рисунок 5.1). После культивирования в течение 6 суток без IL-2 как в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3, так и без них, количество НК-клеток было снижено во всех исследуемых группах по сравнению с их количеством до культивирования. При этих же условиях культивирования относительное количество НК-клеток у женщин на сроке 6-7 недель физиологически протекающей беременности было выше по сравнению с небеременными женщинами в пролиферативной и секреторной фазах менструального цикла (Рисунок 5.1). В присутствии клеток трофобласта линии JEG-3 без IL-2 относительное количество НК-клеток во всех исследуемых группах было выше по сравнению с таковым при культивировании в отсутствие клеток трофобласта без IL-2 (спонтанный уровень пролиферации) (Рисунок 5.1). При культивировании с IL-2 относительное количество НК-клеток было выше по сравнению с таковым до культивирования, а также по сравнению с количеством клеток после инкубации без индукторов (Рисунок 5.1). Относительное количество НК-клеток в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3 и IL-2 было снижено по сравнению с таковым при культивировании только с IL-2 во всех группах, в то же время по сравнению с количеством НК-клеток после культивирования в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3 без IL-2 этот показатель был повышен (Рисунок 5.1).

Уровень экспрессии маркера пролиферации Ki-67 НК-клетками после культивирования без индукторов (спонтанный уровень пролиферации) был выше в группе женщин с физиологическим течением беременности на сроке 6-7 недель по сравнению с группами небеременных женщин в пролиферативной и секреторной фазах цикла (Рисунок 5.2).

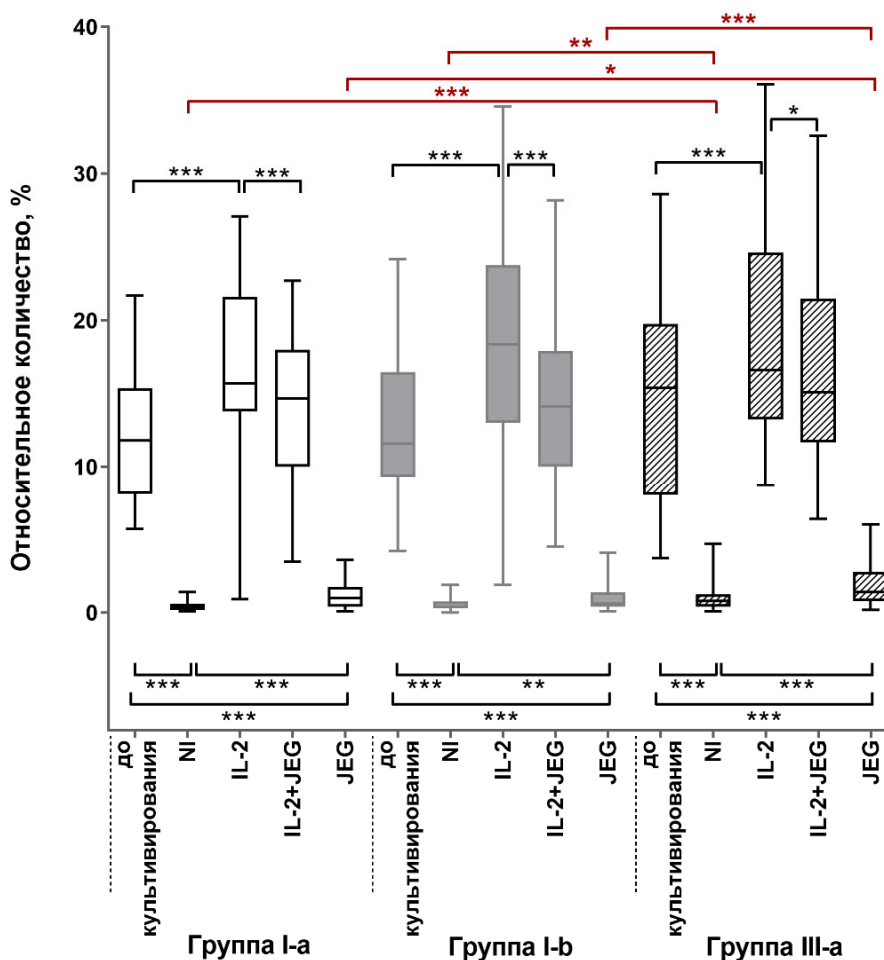


Рисунок 5.1 - Относительное количество НК-клеток в составе мононуклеаров периферической крови (% от лейкоцитов с фенотипом CD45+ CD3-) до культивирования, после культивирования в течение 6 суток: без клеток трофобласта линии JEG-3 и без IL-2 (NI), с IL-2 (IL-2), в присутствии IL-2 и клеток трофобласта линии JEG-3 (IL-2+JEG), в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3 (JEG). Группа I-a: небеременные женщины в пролиферативной фазе цикла; группа I-b: небеременные женщины в секреторной фазе цикла; группа III-a: женщины с физиологическим течением беременности в I триместре. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$

Культивирование мононуклеаров в присутствии IL-2 приводило к повышению интенсивности экспрессии НК-клетками Ki-67 во всех группах по сравнению со спонтанным уровнем экспрессии (Рисунок 5.2). Кроме того, после культивирования мононуклеаров с IL-2 экспрессия Ki-67 НК-клетками была повышена у женщин с физиологической беременностью интенсивность по сравнению показателями у небеременных женщин в обеих фазах цикла (Рисунок 5.2).

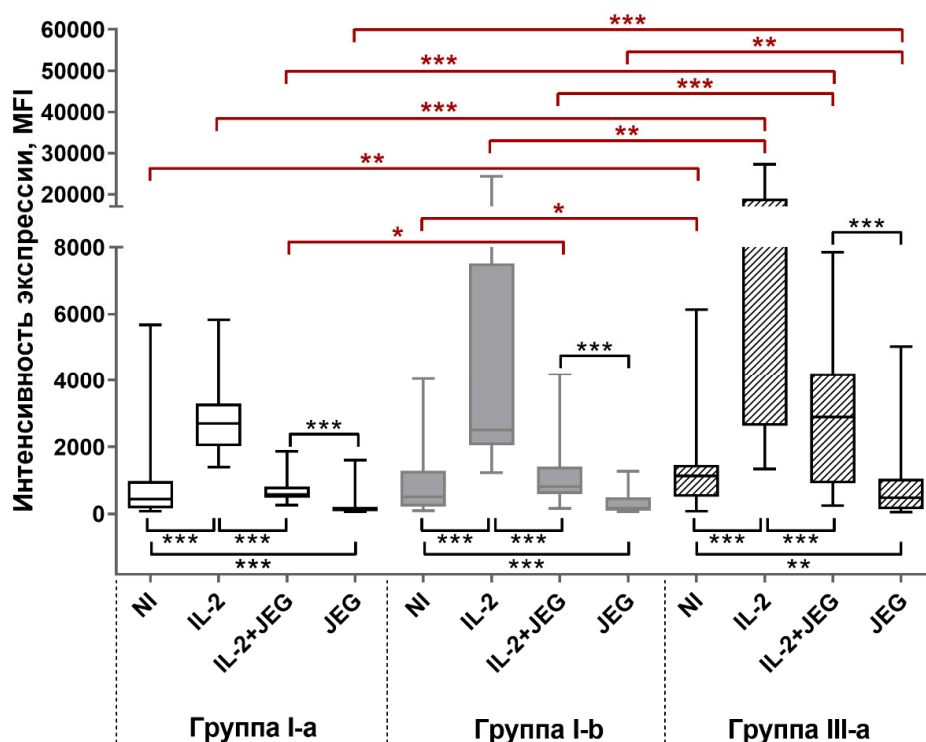


Рисунок 5.2 - Интенсивность экспрессии Ki-67 НК-клетками в составе моноклеарной фракции после культивирования в течение 6 суток в различных условиях: без клеток трофобласта линии JEG-3 и без IL-2 (NI), с IL-2 (IL-2), в присутствии IL-2 и клеток трофобласта линии JEG-3 (IL-2+JEG), в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3 (JEG). Группа I-a: небеременные женщины в пролиферативной фазе цикла; группа I-b: небеременные женщины в секреторной фазе цикла; группа III-a: женщины с физиологическим течением беременности в I триместре. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$

Культивирование в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3 приводило к подавлению интенсивности экспрессии Ki-67 НК-клетками во всех группах по сравнению со спонтанным уровнем экспрессии Ki-67 (Рисунок 5.2). Однако несмотря на ингибирующий эффект клеток трофобласта у женщин с физиологическим течением беременности интенсивность экспрессии Ki-67 НК-клетками после инкубации с клетками трофобласта была повышена по сравнению с небеременными женщинами в обеих фазах менструального цикла (Рисунок 5.2).

В присутствии IL-2 ингибирование экспрессии Ki-67 НК-клетками со стороны клеток трофобласта наблюдалось в меньшей степени по сравнению с таковым после культивирования только с клетками линии JEG-3, во всех группах обследованных женщин (Рисунок 5.2). В присутствии IL-2 ингибирование пролиферации клетками трофобласта сохранялось. У небеременных женщин в секреторной фазе цикла по сравнению с пролиферативной фазой цикла интенсивность экспрессии Ki-67 НК-клетками была повышена (Рисунок 5.2). В присутствии IL-

2 и клеток трофобласта у женщин с физиологической беременностью интенсивность экспрессии Ki-67 NK-клетками была повышена по сравнению с небеременными женщинами в обеих фазах цикла (Рисунок 5.2).

Ингибирующий экспрессию Ki-67 эффект клеток трофобласта также наблюдался при сравнении NK-клеток, простимулированных IL-2, и прокультивированных с IL-2 и клетками трофобласта, во всех исследуемых группах. При сравнении данного эффекта между группами установлено, что у женщин с физиологической беременностью ингибирующий эффект после инкубации клеток в присутствии клеток трофобласта и IL-2 менее выражен по сравнению с небеременными женщинами в обеих фазах цикла (Рисунок 5.2).

### **5.2 Пролиферативная активность рNK-клеток, изолированных из фракции мононуклеаров, в присутствии клеток трофобласта, у здоровых небеременных женщин и беременных женщин в I триместре**

Инкубация spNK-клеток с IL-2 приводила к повышению интенсивности экспрессии Ki-67 по сравнению с уровнем экспрессии после инкубации без IL-2 (спонтанный уровень) во всех группах (Рисунок 5.3).

Различий в интенсивности экспрессии Ki-67 NK-клетками в присутствии клеток линии JEG-3, но без IL-2, по сравнению со спонтанным уровнем экспрессии не выявлено. Однако после инкубации spNK-клеток только с клетками трофобласта у беременных женщин наблюдалось подавление экспрессии Ki-67 сравнению spNK-клетками небеременных женщин в обеих фазах цикла (Рисунок 5.3).

Во всех группах ингибирование клетками трофобласта экспрессии Ki-67 в spNK-клетках было более выражено, чем после инкубации с клетками трофобласта и IL-2 (Рисунок 5.3). У беременных женщин по сравнению с небеременными женщинами только в секреторной фазе цикла интенсивность экспрессии Ki-67 была снижена в случае инкубации NK-клеток в присутствии клеток трофобласта и IL-2 (Рисунок 5.3).

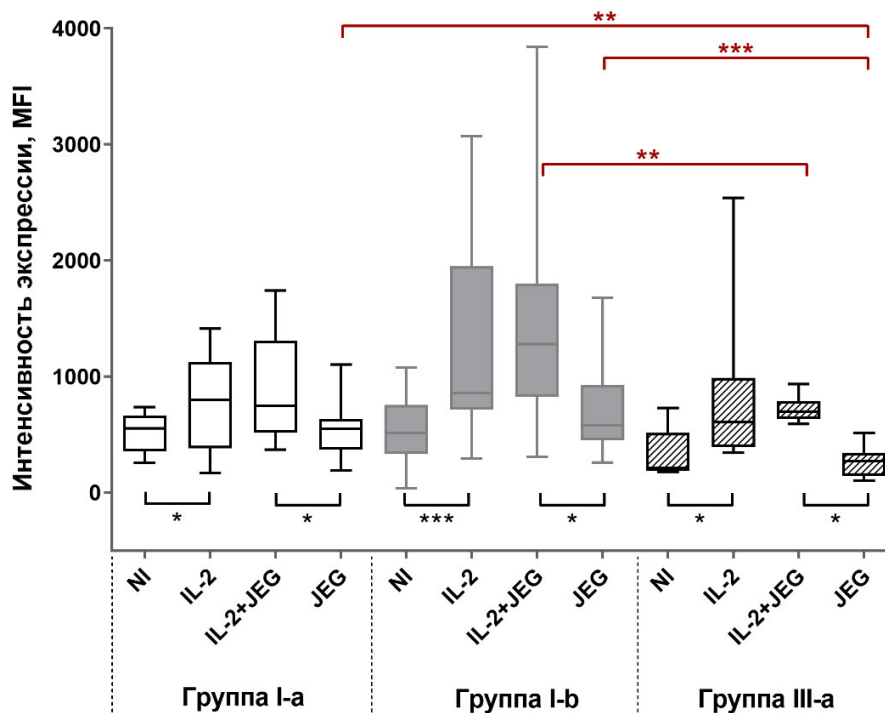


Рисунок 5.3 - Интенсивность экспрессии Ki-67 pNK-клетками после культивирования в течение 6 суток в различных условиях: без клеток трофобласта линии JEG-3 и без IL-2 (NI), с IL-2 (IL-2), в присутствии IL-2 и клеток трофобласта линии JEG-3 (IL-2+JEG), в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3 (JEG). Группа I-a: небеременные женщины в пролиферативной фазе цикла; группа I-b: небеременные женщины в секреторной фазе цикла; группа III-a: женщины с физиологическим течением беременности в I триместре. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$

### 5.3 Популяционный состав pNK-клеток, прокультивированных в присутствии клеток трофобласта, у здоровых небеременных женщин и беременных женщин в I триместре

До культивирования количество pNK-клеток с фенотипом CD16+CD57- у женщин с физиологической беременностью было снижено по сравнению с небеременными женщинами в секреторной фазе цикла. Количество NK-клеток с фенотипом CD16+CD57<sup>bright</sup> было повышено у беременных по сравнению с обеими группами небеременных женщин (Рисунок 5.4а). Во всех группах женщин количество NK-клеток с фенотипом CD16+CD56<sup>bright</sup> было повышено после культивирования с IL-2 по сравнению с количеством этих клеток после культивирования без индукторов (Рисунок 5.4б). Также во всех группах количество CD16+CD56<sup>bright</sup> NK-клеток повышено после культивирования в присутствии IL-2 и клеток трофобласта линии JEG-3 по сравнению с соответствующим количеством после культивирования только с клетками трофобласта (Рисунок 5.4г).



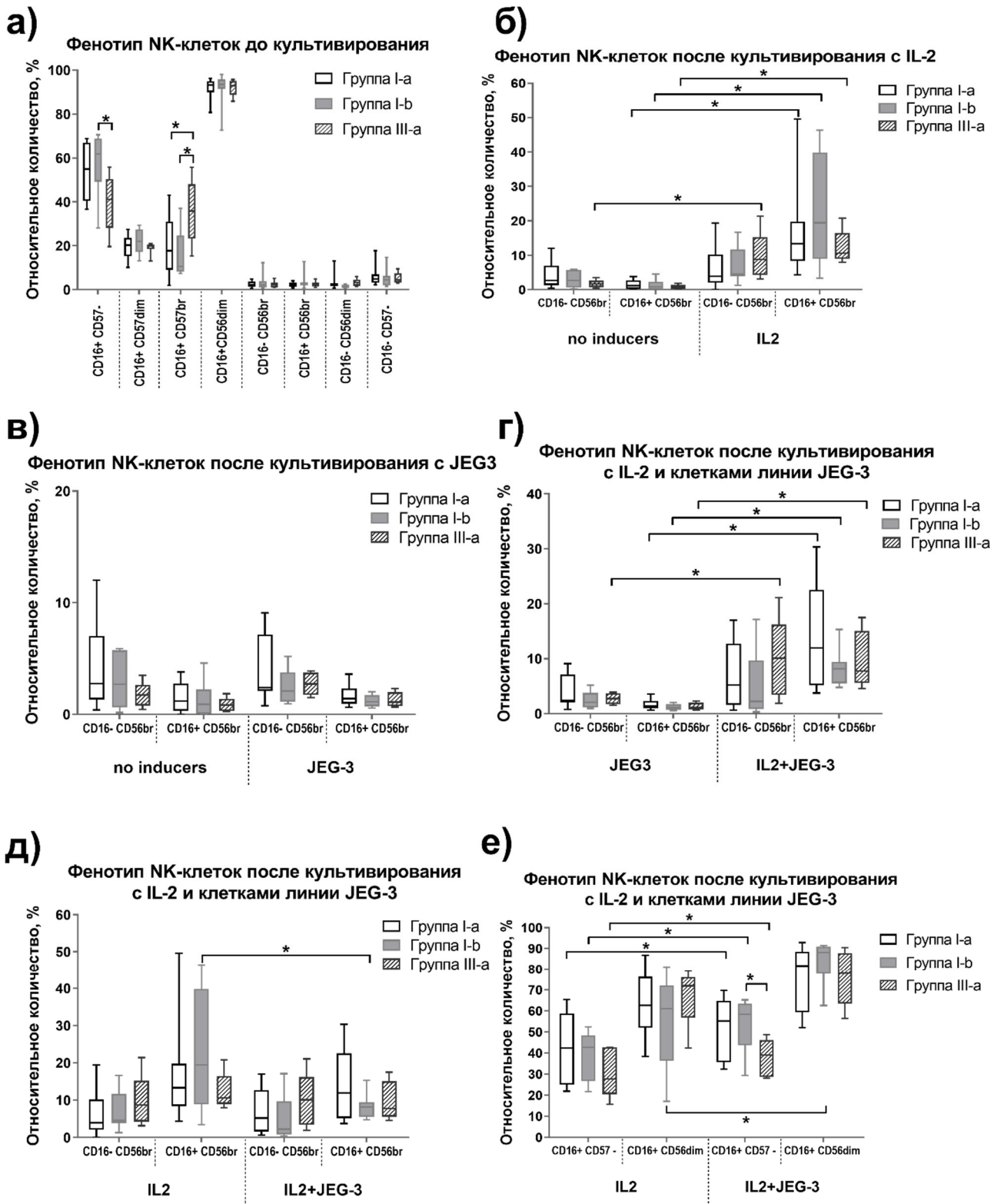


Рисунок 5.4 - Популяционный состав рНК-клеток в составе мононуклеарной фракции до и после культивирования в течение 6 суток в различных условиях: без клеток трофобласта линии JEG-3 и без IL-2 (no inducers), с IL-2 (IL-2), в присутствии IL-2 и клеток трофобласта линии JEG-3 (IL-2+JEG), в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3 (JEG). Группа I-a: небеременные женщины в пролиферативной фазе цикла; группа I-b: небеременные женщины в секреторной фазе цикла; группа III-a: женщины с физиологическим течением беременности в I триместре. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$

Количество NK-клеток с фенотипом CD16-CD56<sup>bright</sup> повышено только в группе беременных женщин после культивирования с IL-2 по сравнению с культивированием без индукторов (Рисунок 5.4б). После культивирования в присутствии IL-2 и клеток трофобласта линии JEG-3 по сравнению с условиями культивирования только с клетками трофобласта количество CD16-CD56<sup>bright</sup> NK-клеток было повышено также только в группе беременных женщин (Рисунок 5.4г).

В группе небеременных женщин в секреторной фазе цикла отмечено сниженное количество CD16+CD56<sup>bright</sup> NK-клеток (Рисунок 5.4д) и повышенное количество CD16+CD56<sup>dim</sup> NK-клеток (Рисунок 5.4е) после культивирования с IL-2 и клетками трофобласта по сравнению с условиями культивирования только с IL-2. После культивирования с IL-2 и клетками трофобласта во всех группах количество CD16+CD57- NK-клеток было повышено по сравнению с количеством после культивирования только в присутствии IL-2 (Рисунок 5.4е). После культивирования с IL-2 и клетками трофобласта линии JEG-3 в группе женщин с физиологической беременностью по сравнению с группой небеременных женщин в секреторной фазе цикла количество NK-клеток с фенотипом CD16+CD57- было снижено (Рисунок 5.4е).

#### **5.4 Проллиферативная активность рNK-клеток у женщин с привычным невынашиванием беременности**

До культивирования различий между группами по относительному количеству NK-клеток, интенсивности экспрессии ими CD56 и CD16, а также относительному количеству субпопуляций NK-клеток (CD3-CD56+CD16- и CD3-CD56+CD16+) не выявлено.

После культивирования в течение 6 суток в присутствии IL-2 количество общего пула NK-клеток во всех группах не изменилось. В то же время наблюдали различие количества общего пула NK-клеток у женщин с ПНБ в пролиферативной (1) и секреторной (2) фазах цикла: в 2 фазе их количество было снижено (Рисунок 5.5а). Во всех группах обследованных женщин, кроме группы беременных женщин с ПНБ в анамнезе, после культивирования в присутствии IL-2 установлено повышенное количество NK-клеток с фенотипом CD3-CD56+CD16- и сниженное количество CD3-CD56+CD16+ NK-клеток по сравнению с количеством этих популяций NK-клеток до культивирования (Рисунки 5.5 б,в). Установлено, что после культивирования с IL-2 относительное количество CD3-CD56+CD16- NK-клеток было снижено в группе женщин с ПНБ во 2 фазе цикла по сравнению с показателем для группы женщин в 1 фазе (Рисунок 5.5б). В то же время после культивирования клеток с IL-2 у беременных женщин с ПНБ в анамнезе количество NK-клеток с фенотипом CD3-CD56+CD16- было повышено по сравнению с количеством этих клеток у женщин с ПНБ в 2 фазе цикла (Рисунок 5.5б).

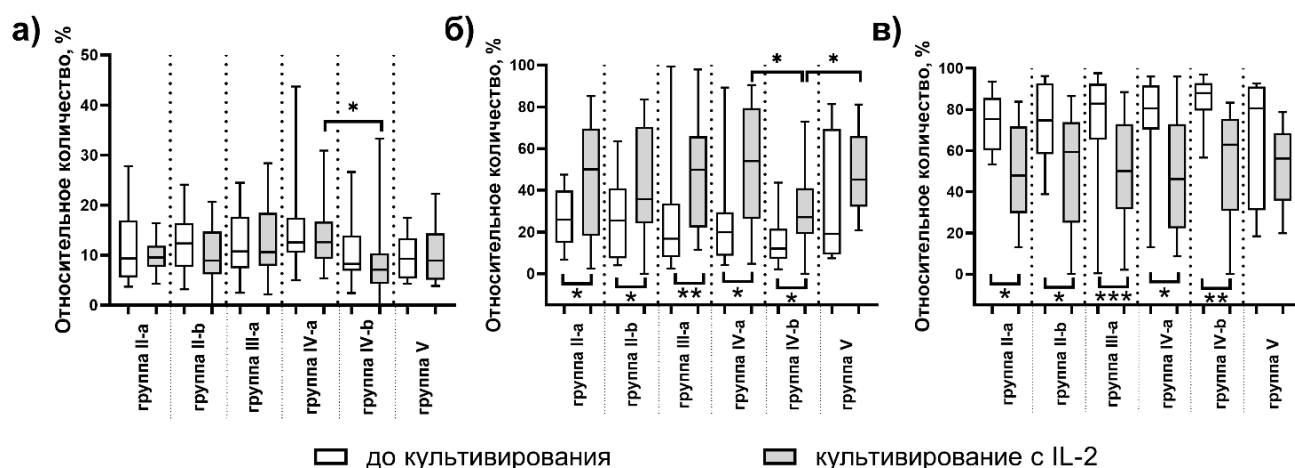


Рисунок 5.5 - Содержание pNK-клеток в составе мононуклеарной фракции до и после культивирования в течение 6 суток в присутствии IL-2: а) общее содержание NK-клеток (CD45+CD3-CD56+), б) содержание NK-клеток с фенотипом CD3-CD56+CD16-, в) содержание NK-клеток с фенотипом CD3-CD56+CD16+. Группа II-a: небеременные фертильные женщины в пролиферативной фазе цикла; группа II-b: небеременные фертильные женщины в секреторной фазе цикла; группа III-a: женщины с физиологическим течением беременности в I триместре; группа IV-a: небеременные женщины с ПНБ в пролиферативной фазе цикла; группа IV-b: небеременные женщины с ПНБ в секреторной фазе цикла; группа V: беременные женщины в I триместре с ПНБ в анамнезе. Статистическая значимость различий: \* -  $p<0,05$ ; \*\* -  $p<0,01$ ; \*\*\* -  $p<0,001$

Интенсивность экспрессии CD16 NK-клетками после культивирования в течение 6 суток в присутствии IL-2 была снижена во всех обследованных группах, кроме группы беременных женщин с ПНБ в анамнезе (Рисунок 5.6а).

Интенсивность экспрессии CD56 NK-клетками после культивирования с IL-2, напротив, была повышена во всех группах обследованных женщин по сравнению с соответствующим параметром до культивирования (Рисунок 5.6 в). После культивирования с IL-2 интенсивность экспрессии CD56 NK-клеток в группе женщин с ПНБ в 1 фазе цикла была повышена по сравнению с данным показателем у фертильных женщин в 1 фазе цикла и у беременных женщин с ПНБ в анамнезе (Рисунок 5.6 б).

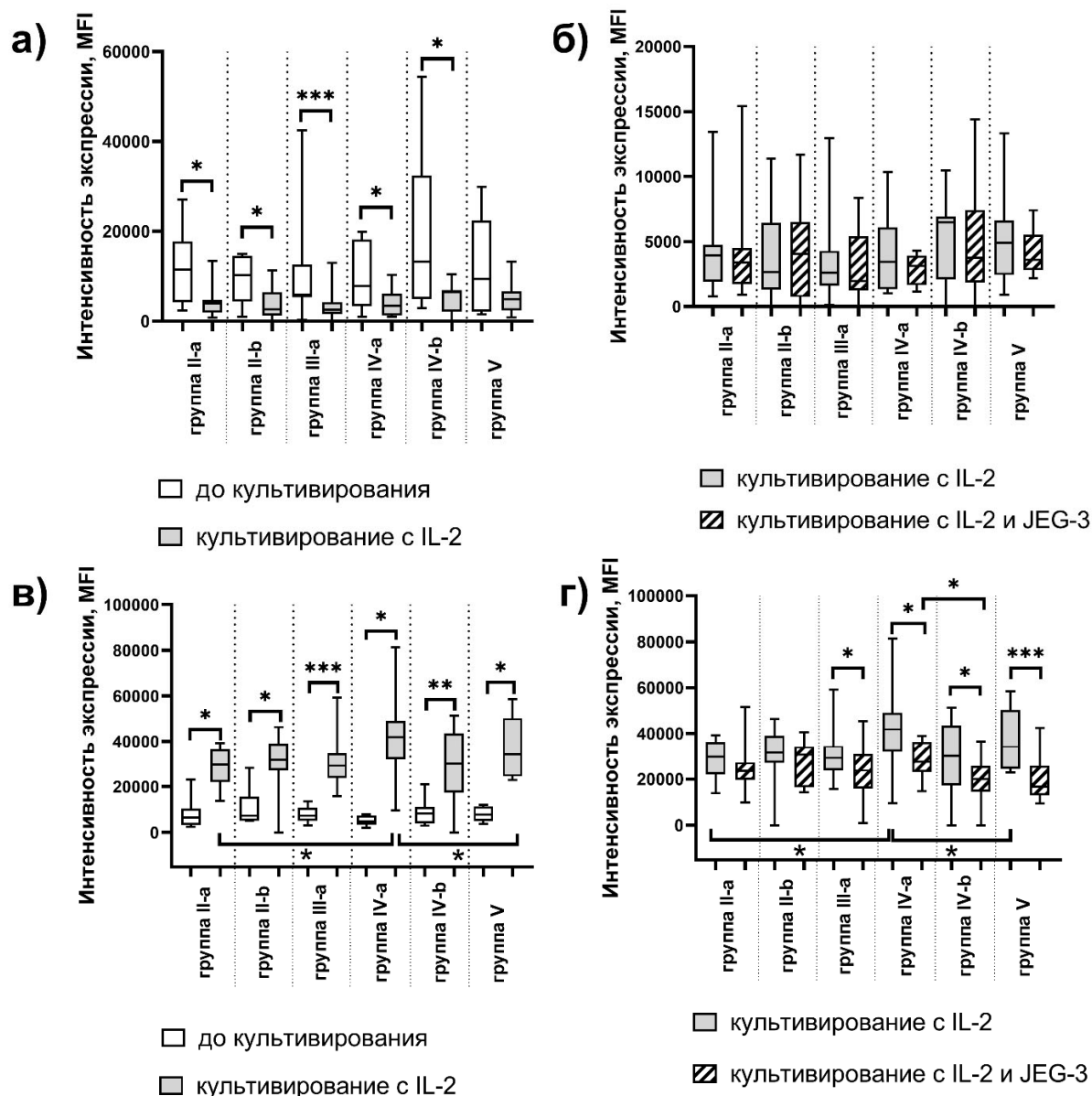


Рисунок 5.6 - Интенсивность экспрессии CD16 и CD56 pNK-клетками в составе мононуклеарной фракции до, а также после культивирования в течение 6 суток. Интенсивность экспрессии: а) CD16 NK-клетками до культивирования и в присутствии IL-2; б) CD16 NK-клетками в присутствии IL-2 или IL-2 и клеток трофобласта линии JEG-3; в) CD56 NK-клетками до культивирования и в присутствии IL-2; г) CD56 NK-клетками в присутствии IL-2 или IL-2 и клеток трофобласта линии JEG-3. Группа II-а: небеременные фертильные женщины в пролиферативной фазе цикла; группа II-б: небеременные фертильные женщины в секреторной фазе цикла; группа III-а: женщины с физиологическим течением беременности в I триместре; группа IV-а: небеременные женщины с ПНБ в пролиферативной фазе цикла; группа IV-б: небеременные женщины с ПНБ в секреторной фазе цикла; группа V: беременные женщины в I триместре с ПНБ в анамнезе. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$

Культивирование мононуклеаров в присутствии IL-2 и клеток трофобласта не приводило к изменению количества популяций NK-клеток CD3-CD56+CD16- и CD3-CD56+CD16+. Также присутствию IL-2 и клеток трофобласта не изменялась интенсивность экспрессии CD16 по сравнению с условиями культивирования с IL-2, но без клеток трофобласта (Рисунок 5.6 б). Культивирование мононуклеаров в присутствии клеток трофобласта и IL-2 приводило к снижению экспрессии CD56 NK-клетками по сравнению с культивированием с IL-2, но без клеток трофобласта только в группах женщин с ПНБ в разных фазах цикла, а также в группе беременных женщин с ПНБ в анамнезе и группе женщин с физиологическим течением беременности (Рисунок 5.6 г). Кроме того, установлено, что в присутствии клеток трофобласта и IL-2 у женщин с ПНБ во 2 фазе цикла интенсивность экспрессии CD56 была снижена по сравнению с интенсивностью экспрессии CD56 NK-клетками у женщин в 1 фазе цикла (Рисунок 5.6 г). Сходных закономерностей между группами фертильных женщин в 1 и 2 фазах цикла выявлено не было.

После культивирования в течение 6 суток в присутствии IL-2 установлена экспрессия NK-клетками маркера пролиферации Ki-67, причем после культивирования с IL-2 и клетками трофобласта данный параметр был снижен во всех обследованных группах по сравнению с культивированием с IL-2 и без клеток трофобласта (Рисунок 5.7а).

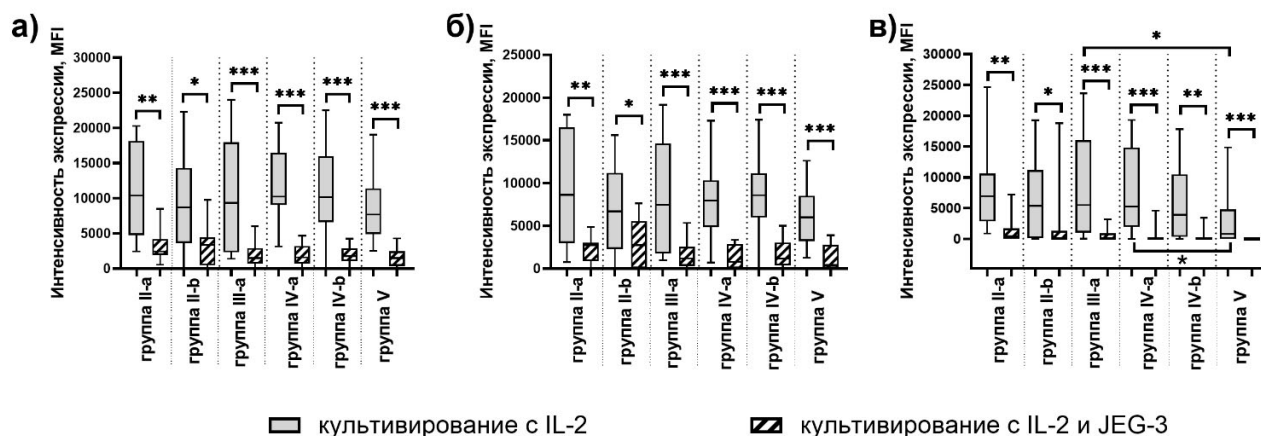


Рисунок 5.7 - Интенсивность экспрессии Ki-67 pNK-клетками в составе мононуклеарной фракции после культивирования в течение 6 суток в присутствии IL-2 или IL-2 и клеток трофобласта линии JEG-3 в общей популяции NK-клеток (CD45+CD3-CD56+) (а), в популяции NK-клеток с фенотипом CD3-CD56+CD16- (б), в популяции NK-клеток с фенотипом CD3-CD56+CD16+ (в). Группа II-а: небеременные фертильные женщины в пролиферативной фазе цикла; группа II-б: небеременные фертильные женщины в секреторной фазе цикла; группа III-а: женщины с физиологическим течением беременности в I триместре; группа IV-а: небеременные женщины с ПНБ в пролиферативной фазе цикла; группа IV-б: небеременные женщины с ПНБ в секреторной фазе цикла; группа V: беременные женщины в I триместре с ПНБ в анамнезе. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$

После культивирования в присутствии IL-2 установлена экспрессия маркера пролиферации Ki-67 для каждой из популяций НК-клеток (CD3-CD56+CD16- и CD3-CD56+CD16+) во всех группах обследованных женщин (Рисунок 5.7 б,в). В группе беременных женщин с ПНБ в анамнезе естественные киллеры с фенотипом CD3-CD56+CD16+ демонстрировали сниженную экспрессию Ki-67 в присутствии IL-2 по сравнению с данным показателем в группе женщин с ПНБ в 1 фазе цикла и группе женщин с физиологической беременностью (Рисунок 5.7в). Культивирование мононуклеаров в присутствии IL-2 и клеток трофобласта приводило к сниженной интенсивности экспрессии Ki-67 в обеих популяциях НК-клеток (CD3-CD56+CD16- и CD3-CD56+CD16+) во всех обследованных группах женщин (Рисунок 5.7 б, в). Проведен анализ корреляционных связей исследуемых параметров, значения коэффициентов корреляции представлены в таблицах 5.1 и 5.2.

Таблица 5.1 - Коэффициенты корреляции интенсивности экспрессии НК-клетками CD16 и Ki-67 после инкубации без клеток трофобласта

Интенсивность экспрессии			
CD16			Ki-67
Интенсивность экспрессии	CD16	-	<b>r=0,70</b> (женщины с физиологической беременностью, $p<0,001$ ); <b>r=0,77</b> (женщины с ПНБ в 1 фазе цикла, $p<0,001$ )
	Ki-67	<b>r=0,70</b> (женщины с физиологической беременностью, $p<0,001$ ); <b>r=0,77</b> (женщины с ПНБ в 1 фазе цикла, $p<0,001$ )	-

Таблица 5.2 - Коэффициенты корреляции интенсивности экспрессии НК-клетками CD56 и Ki-67 после инкубации в присутствии клеток трофобласта

Интенсивность экспрессии			
CD56			Ki-67
Интенсивность экспрессии	CD56	-	<b>r=0,74</b> (беременные женщины с ПНБ в анамнезе, $p<0,01$ )
	Ki-67	<b>r=0,74</b> (беременные женщины с ПНБ в анамнезе, $p<0,01$ )	-

Установлено, что после инкубации мононуклеаров без клеток трофобласта, в присутствии IL-2, в группе женщин с физиологической беременностью, а также в группе женщин с ПНБ в 1 фазе цикла наблюдалась положительная корреляция экспрессии CD16 и Ki-67 (Таблица 5.1). После инкубации клеток в присутствии клеток трофобласта и IL-2 в группе беременных женщин с ПНБ в анамнезе установлена положительная корреляция CD56 и Ki-67 (Таблица 5.2).

Таким образом, клетки трофобласта *in vitro* ингибируют как спонтанную, так и индуцированную IL-2 экспрессию рНК-клетками маркера пролиферации Ki-67. Этот эффект выявлен в отношении рНК-клеток, полученных как от небеременных женщин, так и от беременных женщин в I триместре. Ингибирование клетками трофобласта экспрессии Ki-67 рНК-клетками в составе мононуклеарной фракции выражено в различной степени в зависимости от фазы менструального цикла: у здоровых женщин в секреторной фазе цикла интенсивность экспрессии Ki-67 НК-клетками была повышена по сравнению с показателем в пролиферативной фазе цикла. У беременных женщин рНК-клетки обладают повышенной спонтанной и индуцированной экспрессией маркера пролиферации Ki-67 по сравнению с рНК-клетками небеременных женщин. В присутствии других мононуклеаров влияние клеток трофобласта на экспрессию НК-клетками Ki-67 более выражено, нежели чем в их отсутствии. Установлено, что в присутствии клеток трофобласта и IL-2 повышается количество CD16+CD57- НК-клеток, что может отражать снижение количества НК-клеток на терминальной стадии дифференцировки. При этом у женщин в I триместре беременности количество CD16+CD57-НК-клеток было снижено по сравнению с показателем для небеременных женщин во второй фазе цикла. В то же время до культивирования у беременных женщин содержание НК-клеток с терминально дифференцированным фенотипом (CD16+CD57<sup>bright</sup>) было повышено. Изменения фенотипа рНК-клеток небеременных и беременных женщин в сторону регуляторного (CD16-CD56<sup>bright</sup>) установлено в случае инкубации с клетками трофобласта и IL-2 по сравнению с условиями инкубации только в присутствии клеток линии JEG-3. Вероятно, приобретение рНК-клетками фенотипа CD16-CD56<sup>bright</sup> связано как с влиянием клеток трофобласта, так и с культивированием в присутствии других мононуклеаров и влиянием IL-2. Продемонстрировано, что у женщин с ПНБ в 1 фазе цикла по сравнению с женщинами с ПНБ во 2 фазе цикла повышено количество CD56+CD16- НК-клеток при условии культивирования с IL-2. В случае наступления беременности у женщин с ПНБ количество CD56+CD16- НК-клеток в составе мононуклеарной фракции повышено по сравнению с показателями для женщин с ПНБ во 2 фазе цикла, в случае культивирования клеток в присутствии IL-2. Кроме того, в присутствии IL-2 экспрессия CD56 НК-клетками повышена у женщин с ПНБ в 1 фазе цикла по сравнению со

здоровыми фертильными небеременными женщинами в 1 фазе цикла. При культивировании НК-клеток в присутствии IL-2 и клеток трофобласта линии JEG-3 экспрессия CD56 НК-клетками снижена у женщин с ПНБ со 2 фазе цикла по сравнению с группой женщин в 1 фазе цикла. В результате культивирования в присутствии клеток трофобласта происходит подавление экспрессии Ki-67 НК-клетками как у здоровых женщин, так и у женщин с ПНБ как в целом в популяции НК-клеток, так и в популяциях CD56+CD16- и CD56+CD16+ НК-клетках.



## ГЛАВА 6. ОБРАЗОВАНИЕ НК-КЛЕТКАМИ МИКРОВЕЗИКУЛ И ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ

Для анализа секреции цитокинов клетки линии NK-92 культивировали в присутствии индукторов в течение 96 часов, как и в описанной выше модели для оценки параметров дифференцировки НК-клеток (2.3.1, 2.3.5, 2.3.6). Оценку продукции НК-клетками МВ и определение характера их влияния на клетки трофобласта проводили после инкубации клеток в МВ в течение 24 часов, как описано выше (п. 2.5.2).

### 6.1 Секреция клетками линии NK-92 цитокинов

Оценено содержание цитокинов  $TNF\alpha$ ,  $TGF\beta$ ,  $IFN\gamma$ , IL-10 и RANTES в кондиционированных средах, полученных от культивирования клеток линии NK-92 в присутствии  $TGF\beta$ , а также  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$ , IL-10, IL-15, IL-18. Установлено, что клетки линии NK-92 не секретируют VEGF,  $TNF\alpha$  как в результате культивирования без индукторов, так и после инкубации с индукторами ( $TGF\beta$ ,  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$ , IL-10, IL-15, IL-18). Нестимулированные клетки линии NK-92 секретируют  $IFN\gamma$ , IL-10 и RANTES, а также в низких концентрациях  $TGF\beta$  (Рисунок 6.1).

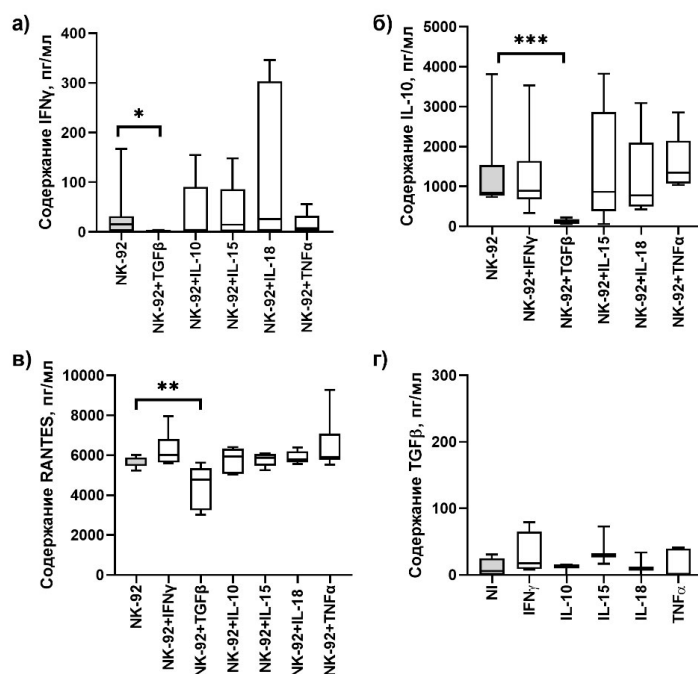


Рисунок 6.1 - Содержание цитокинов  $IFN\gamma$  (а), IL-10 (б), RANTES (в),  $TGF\beta$  (г) в КС клеток линии NK-92, полученные после культивирования в течение 96 часов без индукторов и в присутствии  $IFN\gamma$ ,  $TGF\beta$ , IL-10, IL-15, IL-18,  $TNF\alpha$ . Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$

Содержание IFN $\gamma$ , IL-10 и RANTES в КС клеток линии NK-92 было снижено после культивирования в присутствии TGF $\beta$  относительно содержания этих цитокинов в КС интактных NK-клеток (Рисунок 6.1 а,б,в).

## 6.2 Образование клетками линии NK-92 микровезикул

### 6.2.1 Гранулометрический анализ МВ клеток линии NK-92

Установлено, что размеры микровезикул, образуемых NK-клетками линии NK-92, лежат в диапазоне от 169 нм до 512 нм, а пик распределения количества микровезикул приходится на 233 нм. Анализ частиц в супернатанте, полученном после осаждения микровезикул при 19800g, показал, что их размеры лежат в диапазоне от 12 нм до 35 нм.

### 6.2.2 Атомно-силовая микроскопия МВ клеток линии NK-92

На образцах в поле зрения  $10 \times 10$  мкм были выявлены сферические объекты высотой от 39 до 588 нм, с медианой высоты 314 нм. Высота основной популяции МВ составляла от 196 до 392 нм (Рисунок 6.2).

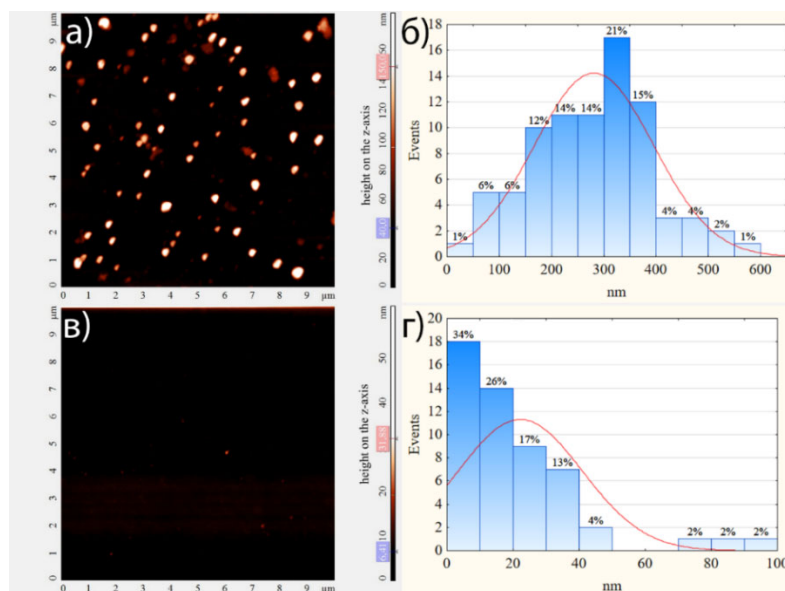


Рисунок 6.2 - Изображения образцов МВ клеток линии NK-92, полученные методом атомно-силовой микроскопии. (а) Визуализация МВ клеток линии NK-92, (б) распределение высот образца МВ (площадь сканирования  $10 \times 10$  мкм), (в) визуализация контрольного образца, содержащего раствор Хенкса без  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , (г) распределение высот в контрольном образце (площадь сканирования  $10 \times 10$  мкм)

При сканировании площади  $2 \times 2$  мкм высота МВ клеток линии НК-92 была в диапазоне от 79 до 142 нм, средняя высота 103 нм. В качестве контроля использовали образцы, содержащие только раствор Хэнкса без  $\text{CaCl}_2$ . Установлено, что средний размер частиц в образцах контрольного раствора составлял до 22 нм, с медианой 8 нм (Рисунок 6.2).

### 6.2.3 Трансмиссионная электронная микроскопия микровезикул клеток линии НК-92

С помощью трансмиссионной электронной микроскопии установлено, в контрольных образцах, содержащих раствор Хэнкса без  $\text{CaCl}_2$ , не выявлено электронно-плотных слоев, отмечены включения кристаллов солей (Рисунок 6.3а). Образцы осадка, получаемого методом дифференциального центрифугирования КС клеток линии НК-92, содержат объекты сферической формы и диаметром от 120 до 800 нм (Рисунок 6.3в). В поперечных срезах образцов осадка установлено наличие двух электронно-плотных слоев, характерных для клеточных мембран (Рисунок 6.3г). Супернатанты, получаемые после дифференциального центрифугирования, и содержащие сферические объекты размером менее 100 нм, предположительно, являются экзосомами (Рисунок 6.3б).

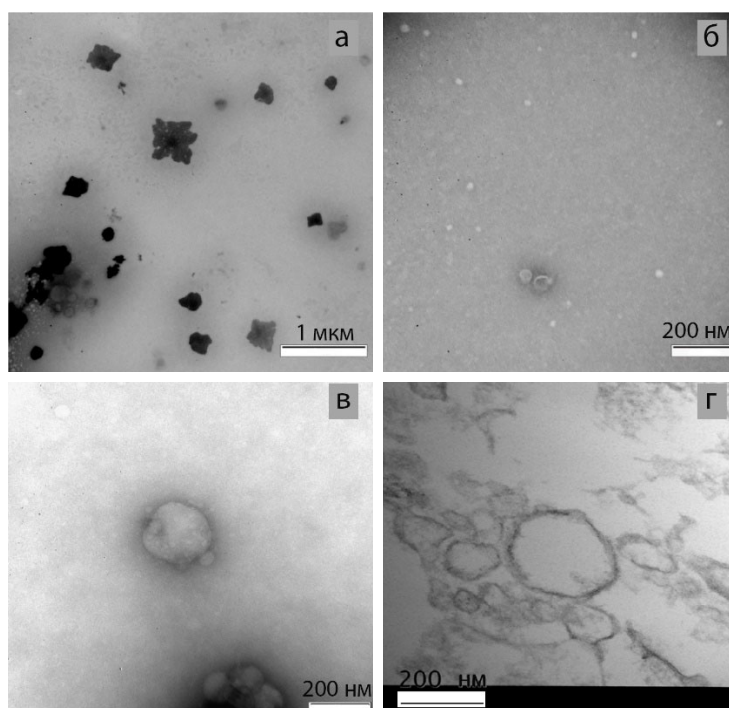


Рисунок 6.3 - Изображения образцов МВ клеток линии НК-92, полученные методом трансмиссионной электронной микроскопии. (а) Контрольный образец, содержащий раствор Хэнкса без  $\text{Ca}_2^+$  и  $\text{Mg}_2^+$ , (б) супернатант, полученный после дифференциального центрифугирования, (в) осадок, полученный после дифференциального центрифугирования, (г) срез МВ клеток линии НК-92

**6.2.4 Фенотипический анализ микровезикул клеток линии NK-92 методом проточной цитофлюориметрии**

Практически все клетки линии NK-92 (96-99%) экспрессировали на своей поверхности CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD119, CD54, CD95, CD56 (Рисунок 6.4). Активация клеток линии NK-92 цитокинами в течение 24 часов в различных концентрациях приводила к изменению экспрессии некоторых рецепторов (Рисунок 6.4). Так, внесение TNF $\alpha$  приводило к повышению экспрессии CD54 и CD95 по сравнению со спонтанным уровнем экспрессии этих рецепторов. Также отмечен дозозависимый эффект: экспрессия CD54 и CD95 NK-клетками была выше в присутствии TNF $\alpha$  в концентрации 50 Ед/мл по сравнению с экспрессией в присутствии TNF $\alpha$  10 Ед/мл (Рисунок 6.4: 1-б,в). Инкубация клеток линии NK-92 с IFN $\gamma$  в концентрации 400 Ед/мл и 1000 Ед/мл приводила к повышению экспрессии клетками линии NK-92 экспрессии CD11b (Рисунок 6.4: 2-а). Инкубация клеток линии NK-92 в присутствии IL-1 $\beta$  в концентрации 10 Ед/мл, 100Ед/мл, 1000Ед/мл приводила к повышению экспрессии CD54, в концентрации 100Ед/мл, 1000Ед/мл к повышению экспрессии CD95 по сравнению со спонтанным уровнем. Отмечен дозозависимый эффект IL-1 $\beta$  в отношении экспрессии CD54 клетками линии NK-92. Однако, в присутствии IL-1 $\beta$  в концентрации 1000 Ед/мл экспрессия CD18 клетками линии NK-92 была снижена по сравнению со спонтанным уровнем экспрессии (Рисунок 6.4: 3-б,в). Инкубация клеток линии NK-92 в присутствии PMA приводила к повышенной экспрессии CD11c, CD54, CD95 и CD119, и сниженной экспрессии CD56 (Рисунок 6.4: 4-а,б,в).

Установлено, что МВ клеток линии NK-92 содержат в составе своей мембраны рецепторы CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD119, CD54, CD95, CD56 (Таблица 6.1).

Таблица 6.1 - Относительное количество МВ (%), образованных клетками линии NK-92 и интенсивность экспрессии ими поверхностных молекул

Маркер	Относительное количество МВ (%), спонтанный уровень	Интенсивность экспрессии (MFI), спонтанный уровень
CD11a	10,0 $\pm$ 0,5	186 $\pm$ 11
CD11b	25,7 $\pm$ 1,8	782 $\pm$ 38
CD11c	13,9 $\pm$ 0,8	490 $\pm$ 18
CD18	14,6 $\pm$ 0,8	297 $\pm$ 13
CD119	33,0 $\pm$ 2,4	6732 $\pm$ 3560
CD54	24,4 $\pm$ 0,9	502 $\pm$ 43
CD95	2,2 $\pm$ 0,3	82,0 $\pm$ 8
CD56	21,6 $\pm$ 1,6	938 $\pm$ 27

Данные представлены в виде среднего значения,  $\pm$  стандартная ошибка среднего (M $\pm$ SEM).

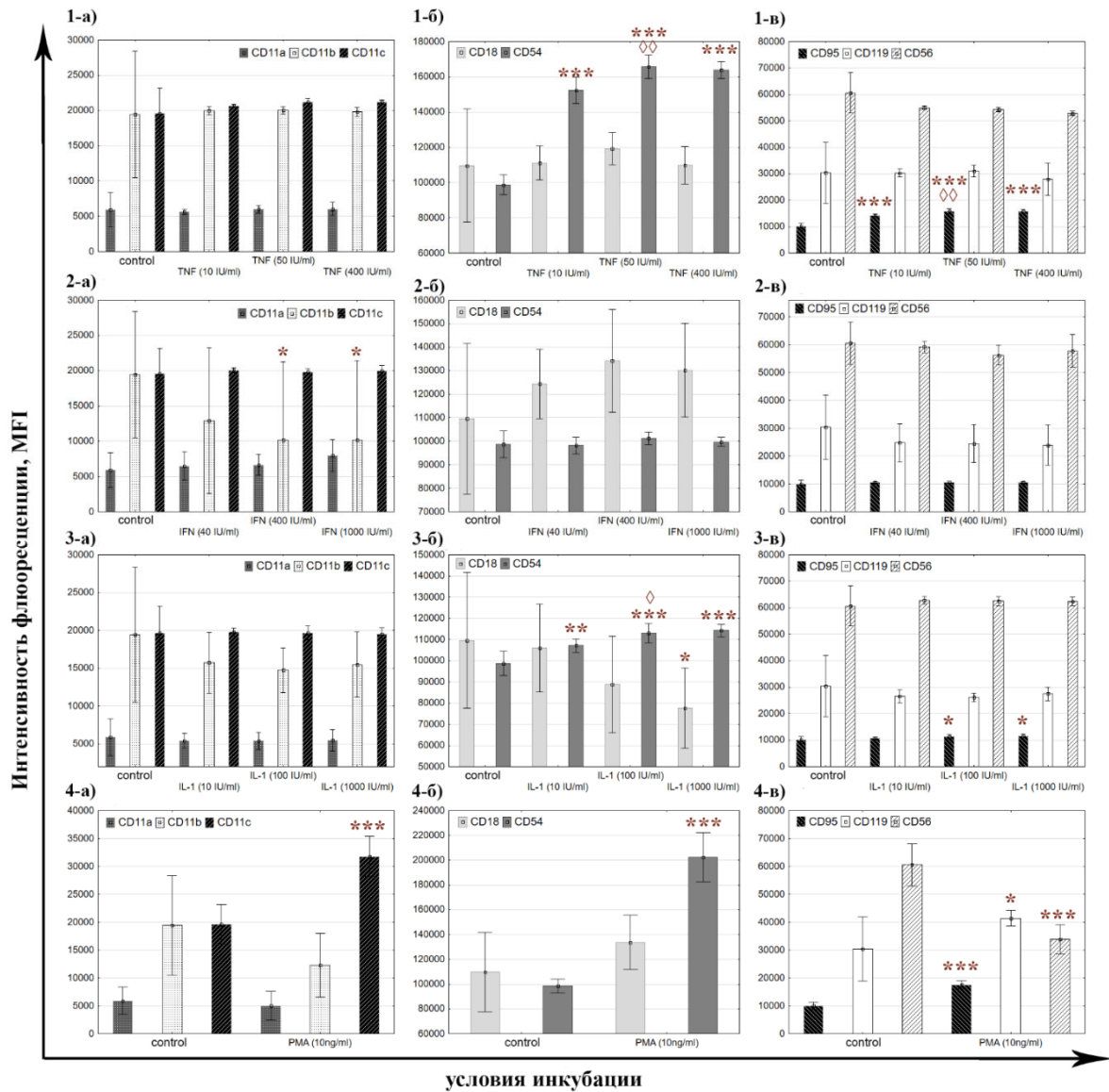


Рисунок 6.4 - Экспрессия клетками линии NK-92 рецепторов CD11a, CD11b, CD11c (а), CD18, CD54 (б), CD95, CD119, CD56 (в) под влиянием TNF $\alpha$  (1), IFN $\gamma$  (2), IL-1 $\beta$  (3), PMA (4). Статистическая значимость отличия от спонтанной экспрессии: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ . Статистическая значимость отличия от экспрессии в присутствии того же цитокина в меньшей концентрации: ◇  $p < 0,05$ ; ◇◇ -  $p < 0,01$

Установлено, что после инкубации клеток линии NK-92 с TNF $\alpha$  (10Ед/мл) их МВ характеризовались повышенным представлением CD95 на своей поверхности по сравнению с МВ нестимулированных NK-клеток (Рисунок 6.5: 1-б). После инкубации клеток линии NK-92 с IFN $\gamma$  их МВ содержали большее количество CD54 в составе своей мембраны по сравнению с МВ от нестимулированных клеток (Рисунок 6.5: 2-б). В присутствии IL-1 $\beta$  клетки линии NK-92 образовывали МВ, с повышенным представлением CD11b на своей мембране по сравнению

с МВ нестимулированных НК-клеток (Рисунок 6.5: 3-а). В присутствии РМА экспрессия рецепторов, представленных на МВ, не изменялась.

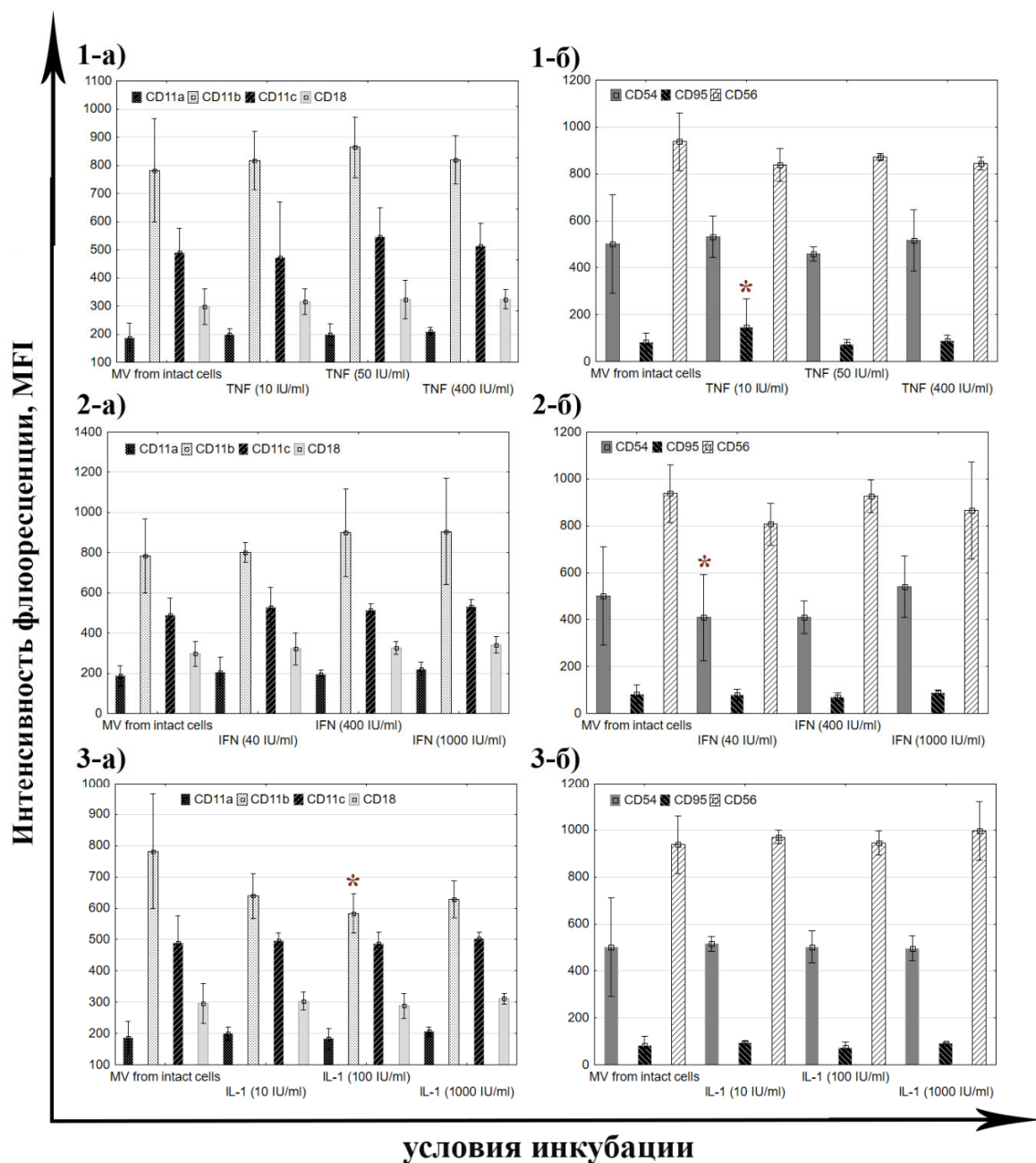


Рисунок 6.5 - Фенотипические характеристики МВ клеток линии NK-92, инкубированных в присутствии  $TNF\alpha$  (1),  $IFN\gamma$  (2),  $IL-1\beta$  (3). Оценено представительство рецепторов CD11a, CD11b, CD11c, CD18 (а), CD54, CD95, CD56 (б) на МВ. Статистическая значимость отличия от спонтанной экспрессии: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$

Сравнительный профиль спонтанной интенсивности экспрессии поверхностных молекул на клетках линии NK-92 и МВ, образованных ими, показан на Рисунке 6.6. Микровезикулы, как и клетки-источники, характеризуются сходным профилем экспрессии молекул CD56. Однако

МВ отличаются более выраженной экспрессией CD119 и CD11b и менее выраженной экспрессией CD18 по сравнению с экспрессией этих рецепторов на клетках.

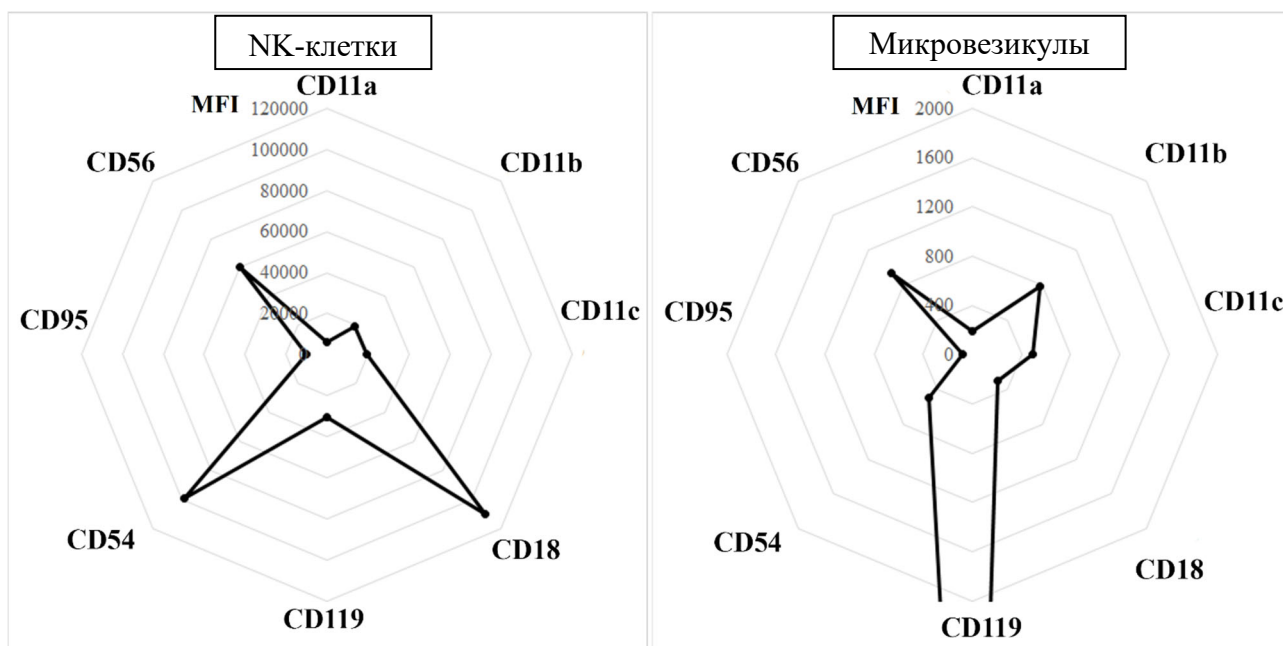


Рисунок 6.6 - Сравнительный профиль интенсивности экспрессии поверхностных рецепторов на клетках линии NK-92 и образуемых ими МВ, в отсутствие индукторов

### 6.2.5 Содержание гранзима В и перфорина в микровезикулах клеток линии NK-92

Методом WesternBlot установлено, что как клетки линии NK-92, так и их МВ содержат GrzB и перфорин (Рисунок 6.7 а,б). Установлено, что при культивировании в присутствии РМА экспрессия GrzB и перфорина повышена в клетках линии NK-92 по сравнению со спонтанным уровнем их содержания (принят за 0 на графиках). Также установлена повышенная экспрессия GrzB и сниженная экспрессия перфорина при культивировании NK-клеток в присутствии IL-1 $\beta$  по сравнению со спонтанным уровнем (Рисунок 6.7 в,д). При добавлении к клеткам линии NK-92 TNF $\alpha$  достоверных изменений экспрессии GrzB и перфорина выявлено не было.

Установлено, что при культивировании в присутствии РМА по сравнению с культивированием без индукторов повышена экспрессия перфорина в МВ, полученных от клеток линии NK-92 (Рисунок 6.7 г). При культивировании в присутствии TNF $\alpha$  по сравнению со спонтанным уровнем увеличивается содержание GrzB, но снижается содержание перфорина в МВ, полученных от клеток линии NK-92 (Рисунок 6.7 г,е). Установлены сниженное содержание GrzB и повышенное содержание перфорина в МВ от клеток линии NK-92, прокультивированных в присутствии IL-1 $\beta$  по сравнению с МВ от нестимулированных NK-клеток (Рисунок 6.7 г,е).

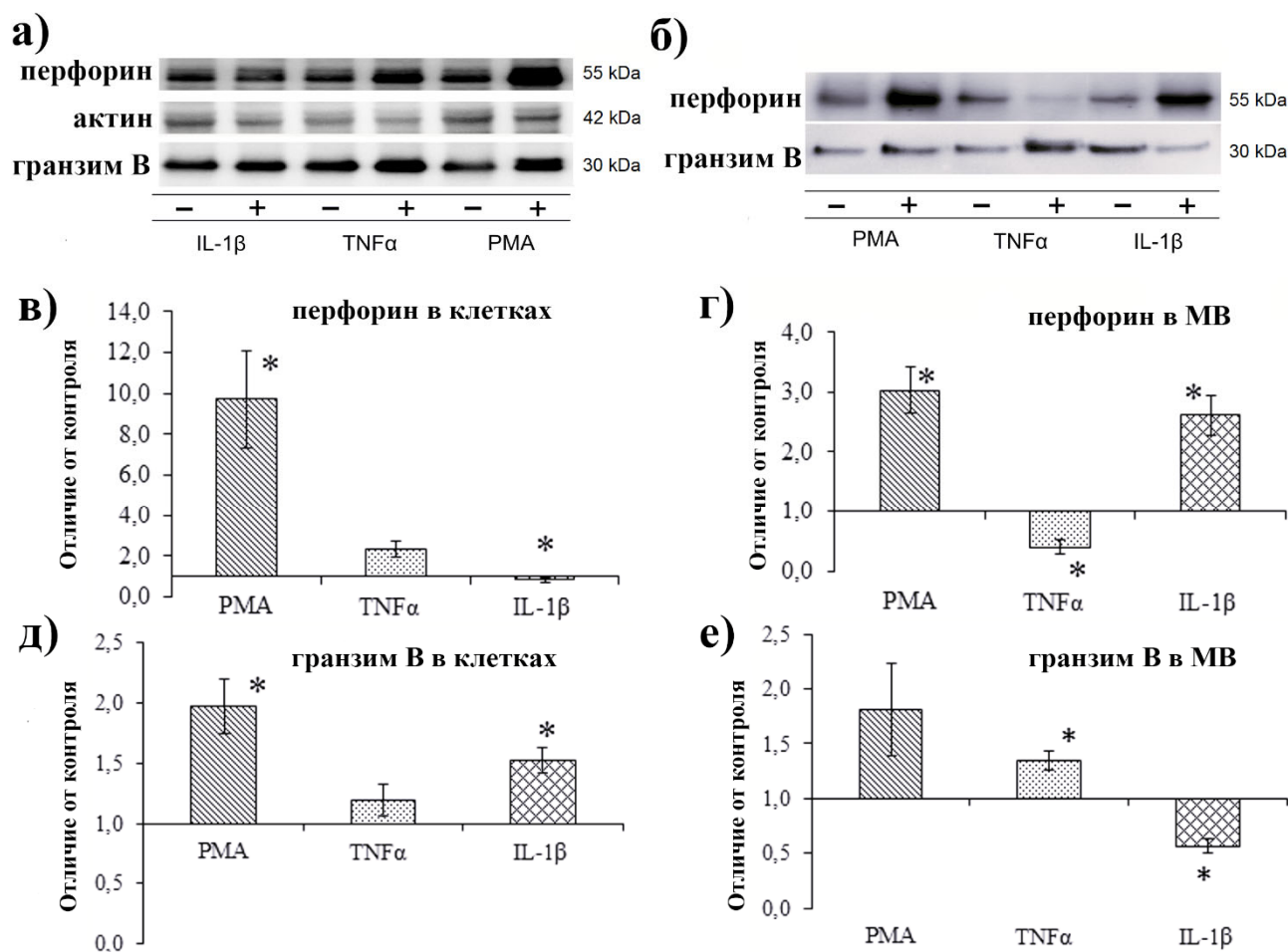


Рисунок 6.7 - Анализ содержания перфорина и GrzV в лизатах клеток линии NK-92 (а) и их микровезикул (б), полученных при спонтанном культивировании клеток (-) или в присутствии индукторов (+); отношение значений результатов иммуноблотинга по экспрессии GrzV и перфорина в клетках линии NK-92 (в, д) или их микровезикул (г,е) в присутствии индукторов к результатам соответствующих контролей (без добавления индукторов). \* -  $p < 0,05$  - отличие от контроля (культивирование в присутствии полной ростовой среды без индукторов)

### 6.2.6 Перенос флуоресцентной метки от микровезикул клеток линии NK-92 клеткам линии JEG-3

Установлено, что в результате культивирования интактных клеток линии JEG-3 в присутствии МВ, полученных от обработанных CFSE клеток линии NK-92 (JEG-3 + MV\CFSE), увеличивался уровень флуоресценции клеток линии JEG-3 по сравнению с уровнем автофлуоресценции неокрашенных клеток линии JEG-3 (negative control) и уровнем



флуоресценции клеток, прокультивированных с МВ, полученных от неокрашенных CFSE клеток линии NK-92 (JEG-3 + MV\unstained) (Рисунок 6.8).

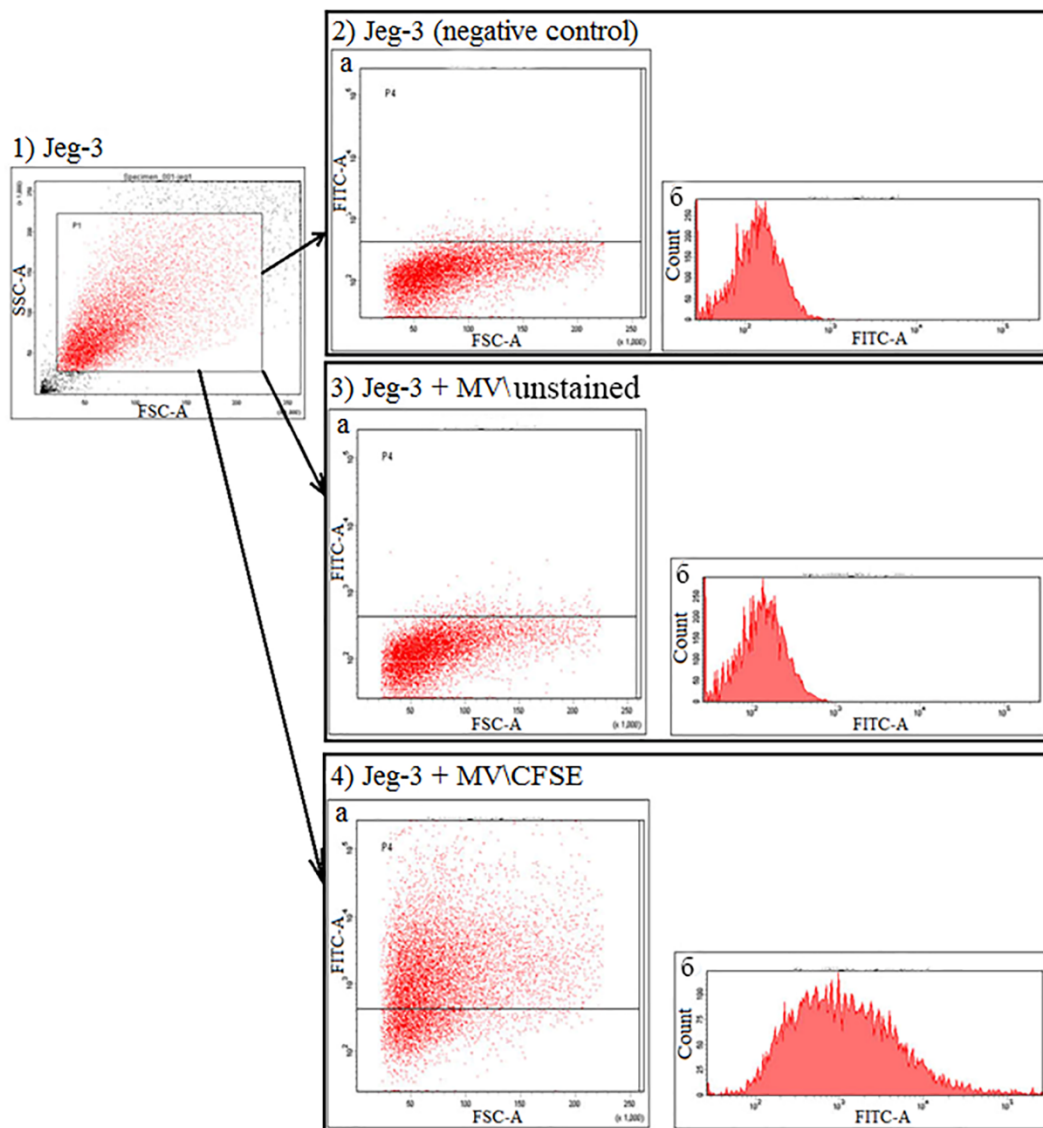


Рисунок 6.8 - Клетки линии JEG-3, проинкубированные в присутствии микровезикул (MV), образованных клетками линии NK-92. 1) распределение клеток линии JEG-3 в координатах FSC-SSC; 2) отрицательный контроль - распределение intactных клеток линии JEG-3 в координатах FITC-FSC (a), гистограмма по каналу FITC (b); 3) клетки линии JEG-3, обработанные МВ, полученными от intactных (необработанных CFSE) NK-клеток в координатах FITC-FSC (a), гистограмма по каналу FITC (b); 4) клеток линии JEG-3, обработанные МВ, полученными от NK-клеток, предварительно обработанных CFSE в концентрации 50 мкМ, в координатах FITC-FSC (a), гистограмма по каналу FITC (b)

### 6.2.7 Влияние микровезикул клеток линии NK-92 на фенотип клеток трофобласта

Установлено, что на поверхности клеток линии JEG-3 присутствуют рецепторы CD54, CD105, CD126, CD130, CD181, CD119, CD120a (Рисунок 6.9) и отсутствуют молекулы CD45, CD56. Инкубация клеток трофобласта с МВ клеток линии NK-92 не приводила к изменению фенотипа клеток линии JEG-3 в рамках изученного нами репертуара поверхностных рецепторов.

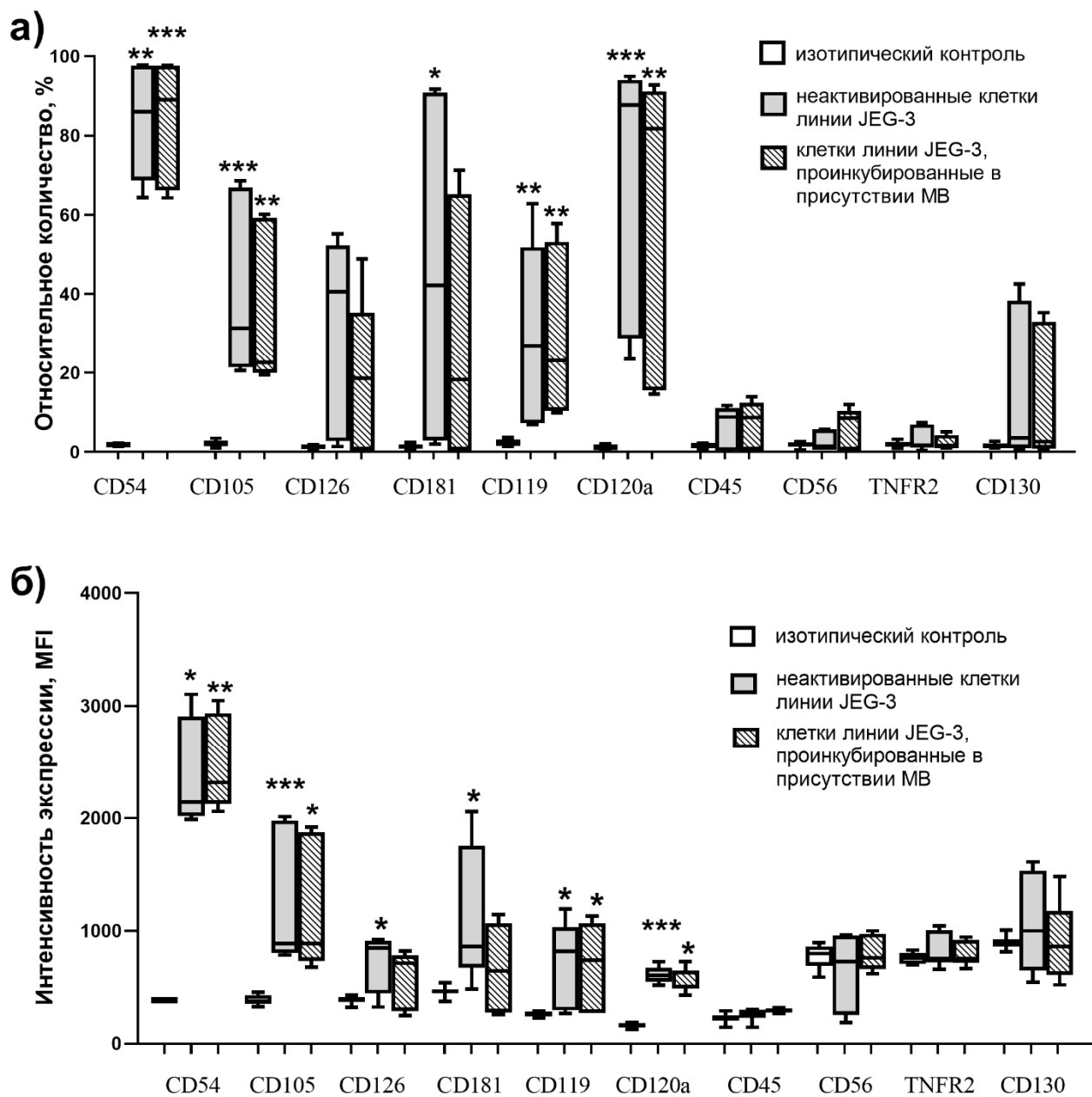


Рисунок 6.9 - Экспрессия клетками линии JEG-3 поверхностных рецепторов в присутствии МВ клеток линии NK-92. Достоверное отличие от клеток линии JEG-3, обработанных изотипическими антителами: \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$

### 6.2.8 Влияние микровезикул клеток линии НК-92 на пролиферацию и миграцию клеток трофобласта

Пролиферация клеток линии JEG-3 в среде, содержащей 2% ЭТС, была принята за базовый уровень. При культивировании клеток линии JEG-3 в присутствии 10% ЭТС уровень пролиферации был выше по сравнению с базовым уровнем (Рисунок 6.10). При культивировании клеток линии JEG-3 в присутствии МВ, полученных от интактных клеток линии НК-92 в концентрации 20 мкг по белку, отмечено снижение уровня пролиферации клеток трофобласта по сравнению с базовым уровнем (Рисунок 6.10).

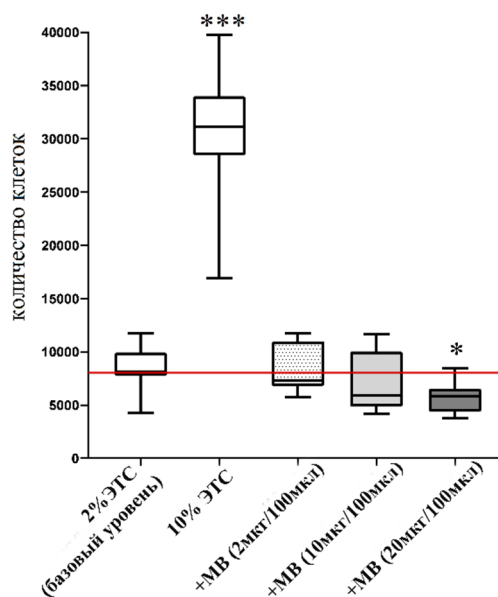


Рисунок 6.10 - Пролиферация клеток линии JEG-3 в присутствии МВ. 2% ЭТС - базовый уровень пролиферации в присутствии среды с добавлением 2% ЭТС (отмечен горизонтальной красной линией). 10 % ЭТС - уровень пролиферации в присутствии среды с добавлением 10% ЭТС. МВ 2мкг/100мкл, 10мкг/100мкл, 20мкг/100мкл - уровень пролиферации в присутствии МВ клеток НК-92 в концентрации по содержанию белка в мкг на 100 мкл среды с добавлением 2% ЭТС. Достоверность различий: \* -  $p < 0.05$ ; \*\*\* -  $p < 0.001$  - отличие от базового уровня

В результате культивирования клеток линии JEG-3 в присутствии МВ клеток линии НК-92 с общим содержанием белка 20 мкг/100 мкл установлено увеличение миграции клеток линии JEG-3 за счет увеличения количества мигрировавших клеток и площади, занятой клетками, по сравнению с культивированием без МВ (Рисунок 6.11). Выбор концентрации МВ 20 мкг/100 мкл был связан с получением эффекта МВ в отношении пролиферации клеток линии JEG-3 только в указанной концентрации.

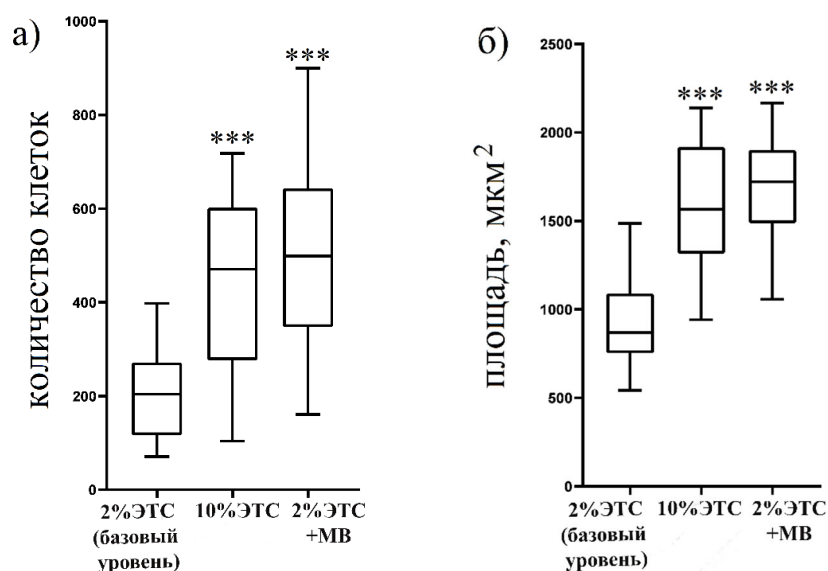


Рисунок 6.11 - Количество (а) и площадь (б), занимаемая клетками линии JEG-3 после культивирования в присутствии МВ клеток линии NK-92. 2% ЭТС (базовый уровень) - базовый уровень миграции в культуральной среде с добавлением 2% ЭТС; 10% ЭТС - положительный контроль, миграция в культуральной среде с добавлением 10% ЭТС; 2%ЭТС+МВ - миграция в присутствии МВ клеток линии NK-92 в концентрации 20 мкг/100 мкл по белку. Достоверность различий: \*\*\* -  $p < 0.001$  - отличие от базового уровня

### 6.2.9 Определение уровня STAT3, STAT1 и их фосфорилированных форм в лизатах клеток линии JEG-3 после их сокультивирования с микровезикулами клеток линии NK-92

Культивирование клеток линии JEG-3 в течение 24 часов, в присутствии МВ клеток линии NK-92 приводило к снижению содержания STAT3 в клетках линии JEG-3 (Рисунок 6.12 б) и не изменяло в них содержание pSTAT3(Tyr705). Отношение содержания фосфорилированной по Tyr705 формы белка STAT3 к общему содержанию STAT3 в клетках линии JEG-3 в указанных условиях также не изменялось (Рисунок 6.12 г). При этом отношение pSTAT3(Ser727)/STAT3 в клетках линии JEG-3 после культивирования в присутствии МВ клеток линии NK-92, было выше по сравнению с интактными клетками линии JEG-3, что характеризует активацию STAT3 по Ser727 (Рисунок 6.12 в). Изменений в содержании и активации STAT1 обнаружено не было (Рисунок 6.12 е-з).

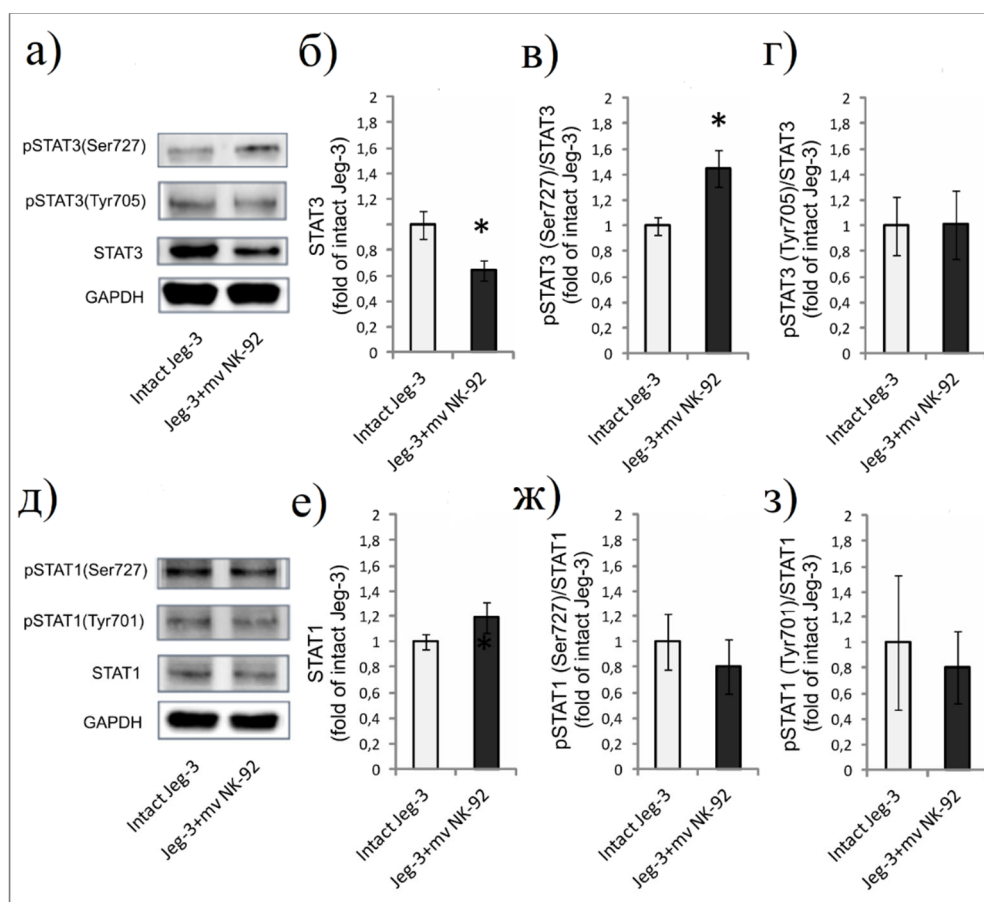


Рисунок 6.12 - Влияние МВ клеток линии NK-92 на содержание белков STAT1, STAT3 и их фосфорилированных форм в лизатах клеток линии JEG-3. Иммуноблот, демонстрирующий содержание STAT3 (а) и STAT1 (д) в интактных клетках линии JEG-3 и после их взаимодействия с МВ клеток линии NK-92; Плотность бенда содержания общего STAT3 (б) и STAT1 (е), в интактных клетках линии JEG-3 и после взаимодействия с МВ клеток линии NK-92, нормализованная по GAPDH; Соотношение phospho-STAT3 (pSTAT3(Ser727), pSTAT3(Tyr(705)) и общего STAT3 (в, г), либо phospho-STAT1 (pSTAT1(Ser727), pSTAT1(Tyr(701)) и общего STAT1 (ж, з) в исследуемых образцах. Достоверность различий между клетками линии JEG-3, обработанными МВ клеток линии NK-92 и интактными клетками линии JEG-3: \* -  $p < 0,05$

### 6.2.10 Определение ERK1/2 и phospho-ERK1/2 в лизатах клеток линии JEG-3 после их сокультивирования с микровезикул клеток линии NK-92

Проанализирована активация MAPK сигнального пути в клетках линии JEG-3. Маркерами такой активации является изменение содержания в клетках ERK1/2 и pERK1/2. Культивирование клеток линии JEG-3 в течение 24 часов в присутствии МВ клеток линии NK-92 не приводило к изменению содержания ERK1/2 и его фосфорилированной формы phospho-

ERK1/2 в клетках линии JEG-3. Отношение содержания фосфорилированной формы pERK1/2 к содержанию общей ERK1/2 в клетках линии JEG-3 в указанных условиях также не изменялось (Рисунок 6.13).

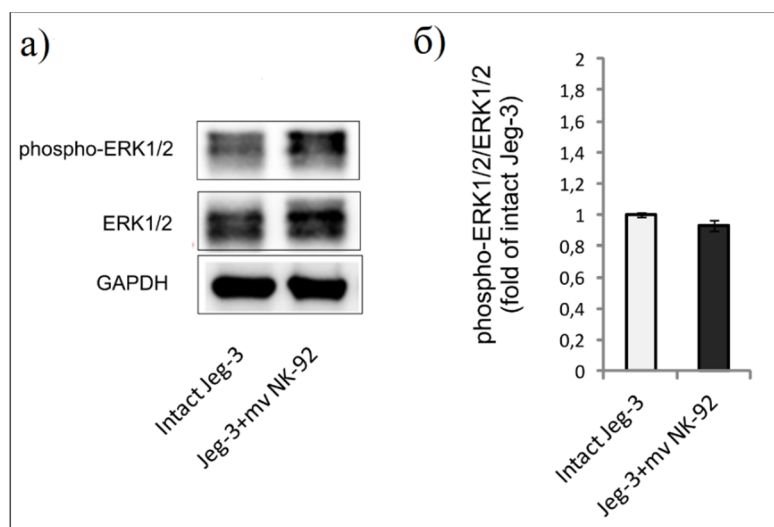


Рисунок 6.13 - Эффект влияния МВ клеток линии NK-92 на фосфорилирование ERK/2, в лизатах клеток линии JEG-3. Иммуноблот, демонстрирующий содержание ERK1/2 в интактных клетках линии JEG-3 и после их взаимодействия с МВ клеток линии NK-92 (а); Соотношение phospho-ERK1/2 и общего ERK1/2 в исследуемых образцах (б)

Таким образом, клетки линии NK-92 секретируют цитокины  $IFN\gamma$ , IL-10, RANTES, и в низких концентрациях TGF $\beta$ . В результате культивирования с TGF $\beta$  NK-клетки снижают секрецию  $IFN\gamma$ , IL-10, RANTES. Клетки линии NK-92 также способны к образованию МВ, фенотипический профиль которых отличается от профиля клеток-источников. В составе МВ клеток линии NK-92 выявлены белки, опосредующие цитотоксическую функцию, - GrzB и перфорин. В зависимости от цитокина, влияющего на NK-клетки, фенотипический профиль МВ изменяется слабо, в то время как содержание GrzB и перфорина в МВ меняется значительно. МВ снижают пролиферацию, но увеличивают миграцию клеток трофобласта при сохранении их жизнеспособности. Инкубация клеток трофобласта в присутствии МВ NK-клеток приводит к активации STAT3 через pSTAT3(Ser727), но не через pSTAT3(Tyr705). Обработка клеток трофобласта МВ не приводит к фосфорилированию STAT1 и ERK1/2.

## **ГЛАВА 7. ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ КЛЕТОК ЛИНИИ НК-92 В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОК ТРОФОБЛАСТА**

Для оценки цитотоксичности НК-клеток использованы стандартные клетки-мишени - линия К-562, а также клетки трофобласта линии JEG-3. Цитотоксическую функцию НК-клеток и экспрессию ими проапоптотических рецепторов оценивали после 4 часовой экспозиции естественных киллеров цитокинам и клеткам-мишеням. Определение содержания гранзима В, перфорины, каспаз 3 и 8 в клетках линий НК-92 и JEG-3 проводили после их контактного и дистантного совместного культивирования в течение 24 часов. Дополнительно проанализировано влияние цитокинов на цитотоксичность НК-клеток после 24-часовой и 96-часовой экспозиции. Также проанализировано содержание перфорины, гранзимов и серпинов после длительного совместного контактного культивирования НК-клеток и клеток трофобласта в течение 96 часов. Изменения непосредственно цитотоксической функции клеток линии НК-92 в результате сокультивирования с клетками трофобласта линии JEG-3 в течение 96 часов оценены в модели с использованием клеток-мишеней линии К-562.

### **7.1 Цитотоксическая активность клеток линии НК-92 под влиянием цитокинов**

Первым этапом работы стала оценка цитотоксической активности клеток линии НК-92 в отношении стандартных клеток-мишеней линии К-562. Установлено, что в присутствии клеток линии НК-92 относительная гибель клеток линии К-562 увеличивалась во всех использованных соотношениях эффектор:мишень (1:1, 1:2, 1:5, 1:8, 1:10). Гибель клеток-мишеней была выше при использовании соотношения 5:1 и 8:1 по сравнению с гибелью клеток после инкубации в соотношении 1:1 (Рисунок 7.1а).

Затем проанализировали цитотоксическую активность клеток линии НК-92 в отношении клеток линии JEG-3. Установлено, что после инкубации клеток линии НК-92 с клетками линии JEG-3 относительное количество погибших клеток линии JEG-3 было выше по сравнению с их спонтанной гибелью в отсутствие клеток-эффекторов. Гибель клеток линии JEG-3 была повышена в случае использования соотношения «эффектор:мишень» 10:1 по сравнению с соотношением 5:1 (Рисунок 7.1б).

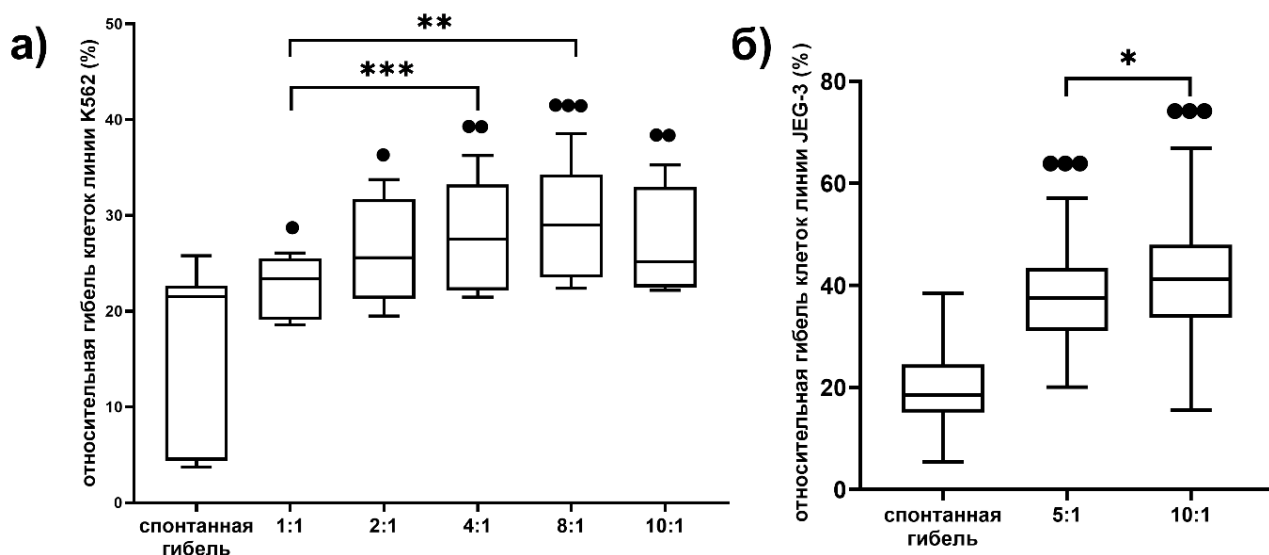


Рисунок 7.1 - Относительная гибель клеток мишеней линий K-562 (а) и JEG-3 (б) без клеток-эффекторов (спонтанная гибель) и в присутствии клеток-эффекторов линии NK-92. Для клеток линии K-562 использованы соотношения «эффектор:мишень» 1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 10:1 (а). Для клеток линии JEG-3 соотношения «эффектор:мишень» 5:1 и 10:1 (б). За 100% принято общее содержание в пробе клеток-мишеней. Статистическая значимость отличия от спонтанной гибели: • -  $p < 0,05$ , •• -  $p < 0,01$ , ••• -  $p < 0,001$ . Статистическая значимость различий между инкубацией в разных соотношениях «эффектор:мишень»: \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$

Также оценивали гибель клеток линии K-562 после инкубации с клетками линии NK-92, которые были предварительно прокультивированы в присутствии цитокинов IL-18, IL-15, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ , IL-10 в течение 24 часов. Установлено, что после предварительного культивирования NK-клеток в течение 24 часов в присутствии цитокинов IL-18, IL-15, TNF $\alpha$  или IL-10 цитотоксичность NK-клеток в отношении клеток линии K-562 была повышена по сравнению с цитотоксической активностью нестимулированных цитокинами NK-клеток (Рисунок 7.2)

Затем оценивали цитотоксическую функцию клеток линии NK-92, предварительно прокультивированных в присутствии цитокинов в течение 24 часов и 96 часов, в отношении клеток линии JEG-3. Установлено, что гибель клеток линии JEG-3 была выше после инкубации с NK-клетками, предварительно прокультивированными в присутствии IL-18 в течение 24 часов (Рисунок 7.3 а) и в присутствии IL-18 или TGF $\beta$  в течение 96 часов (Рисунок 7.3б) по сравнению с гибелью клеток линии JEG-3 после инкубации с нестимулированными цитокинами NK-клетками.



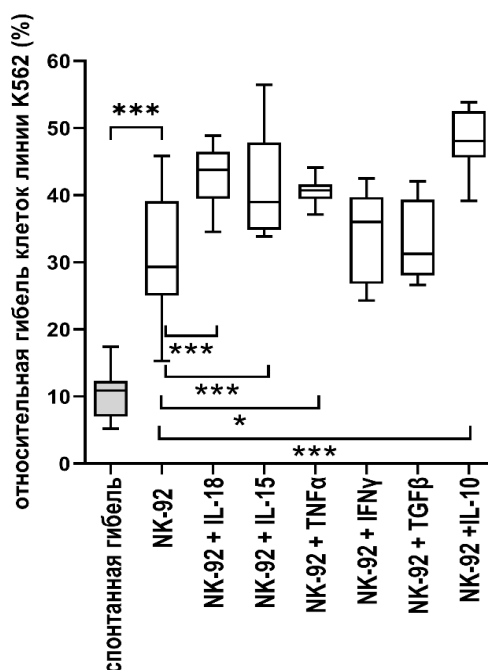


Рисунок 7.2 - Относительная гибель клеток-мишеней линии К-562 без и в присутствии клеток-эффекторов линии НК-92, предварительно прокультивированных в течение 24 часов с цитокинами. Статистическая значимость различий: \* -  $p<0,05$ , \*\* -  $p<0,01$ ; \*\*\* -  $p<0,001$

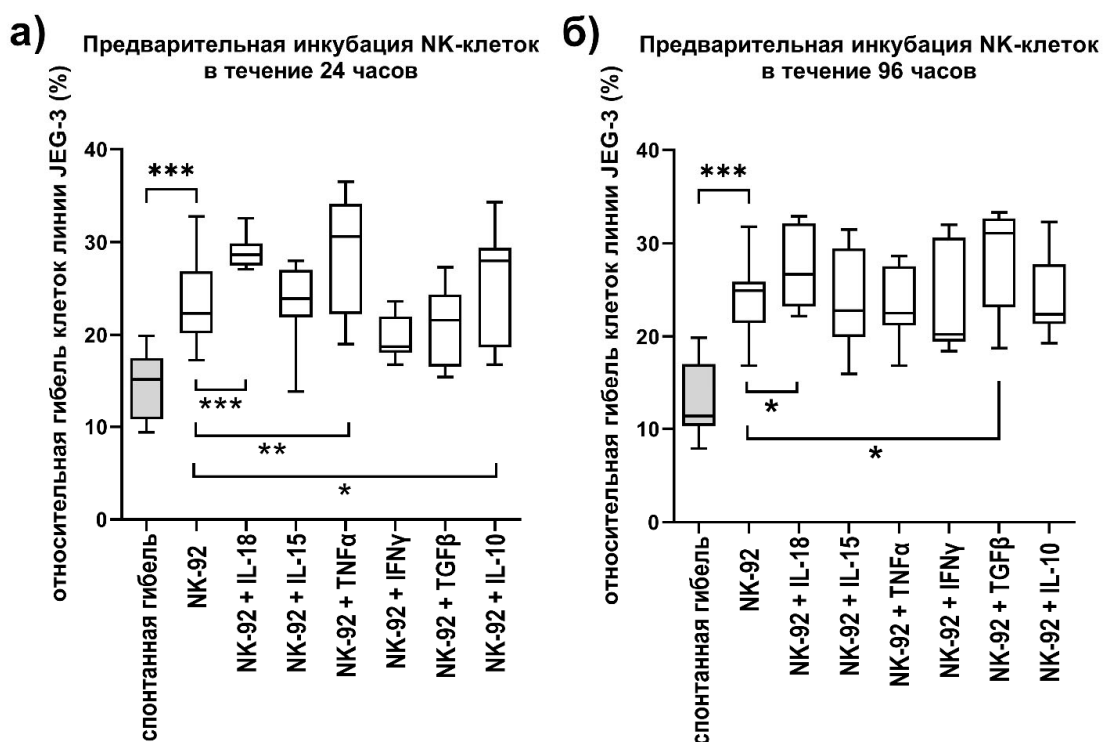


Рисунок 7.3 - Относительная гибель клеток линии JEG-3 без и в присутствии клеток-эффекторов линии НК-92, предварительно прокультивированных в течение 24 часов (а) и 96 часов (б) с цитокинами. Статистическая значимость различий: \* -  $p<0,05$ , \*\* -  $p<0,01$ ; \*\*\* -  $p<0,001$

Затем была проанализирована гибель клеток линии JEG-3 после инкубации с клетками линии NK-92 и цитокинами TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-4, VEGF, PLGF, bFGF, TGF $\beta$ , GM-CSF каждый в трех концентрациях. Для этого оценили прямое влияние цитокинов на жизнеспособность клеток трофобласта линии JEG-3. Установлено, что относительное количество погибших клеток линии JEG-3 было выше в присутствии цитокинов: IL-1 $\beta$  (100Ед/мл и 1000Ед/мл), IL-6 (1нг/мл, 2,5нг/мл, 4нг/мл), IFN $\gamma$  (1000 Ед/мл), IL-4 (1нг/мл, 10нг/мл, 20нг/мл), TGF $\beta$  (5нг/мл, 10нг/мл), bFGF (1нг/мл, 10нг/мл, 20 нг/мл), PLGF (20нг/мл), по сравнению с их спонтанной гибелью (Рисунок 7.4).

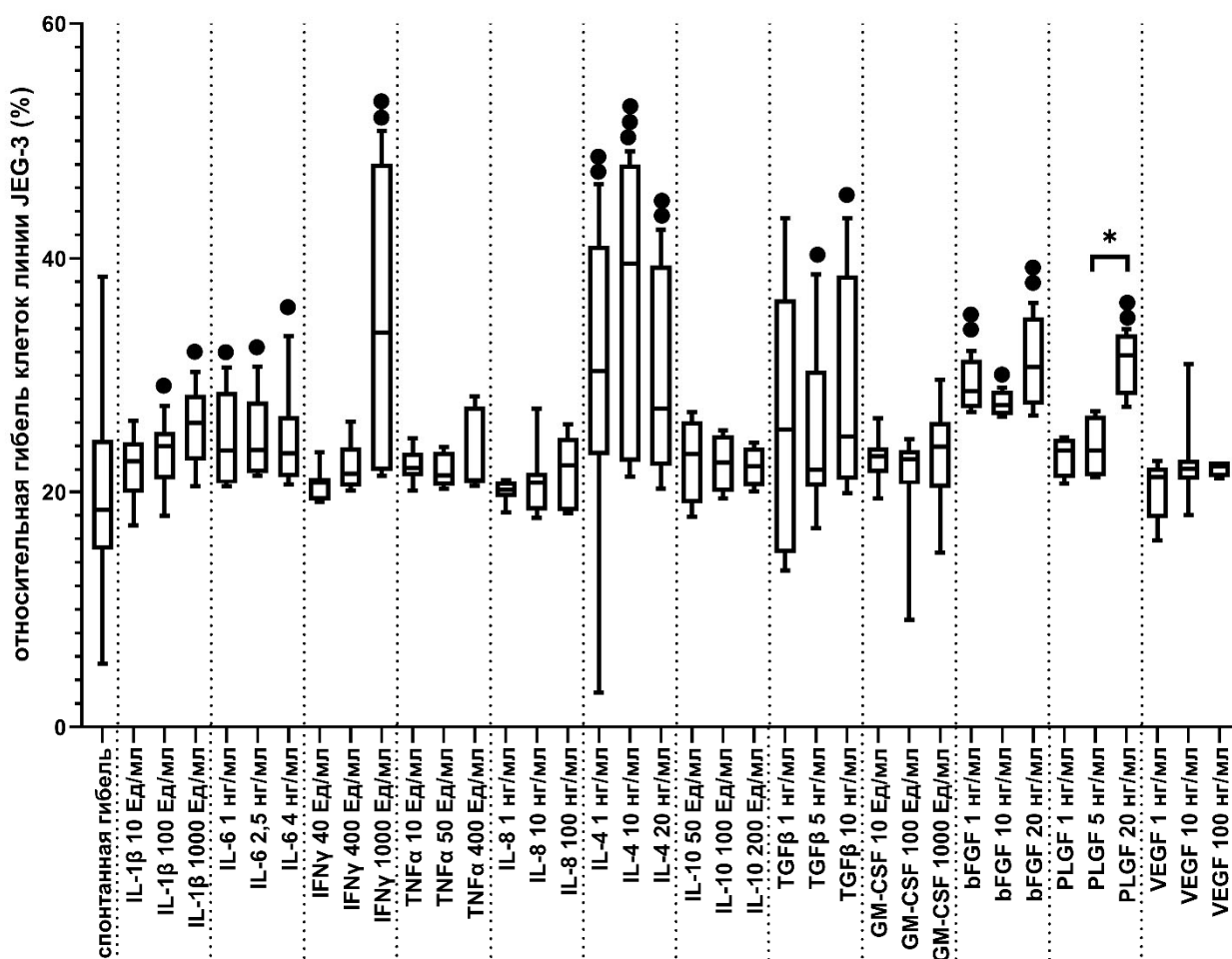


Рисунок 7.4 - Относительная гибель клеток линии JEG-3 в присутствии цитокинов. Статистическая значимость отличия от спонтанной гибели: • -  $p < 0,05$ , •• -  $p < 0,01$ , ••• -  $p < 0,001$

Затем оценивали гибель клеток линии JEG-3 при одновременном присутствии клеток линии NK-92 и цитокинов. Установили, что в присутствии NK-клеток и цитокинов IL-1 $\beta$  (10 Ед/мл, 100Ед/мл и 1000Ед/мл), IFN $\gamma$  (40Ед/мл, 400Ед/мл, 1000 Ед/мл), IL-6 (1нг/мл, 2,5нг/мл, 4нг/мл), IL-4 (1нг/мл, 10нг/мл, 20нг/мл), IL-8 (1нг/мл, 10нг/мл, 100нг/мл), TGF $\beta$  (1нг/мл, 5нг/мл, 10нг/мл), GM-CSF (1000Ед/мл), bFGF (1нг/мл, 10нг/мл, 20 нг/мл) гибель клеток трофобласта

была выше по сравнению с таковой без цитокинов (Рисунок 7.5). В присутствии НК-клеток и  $IFN\gamma$  в концентрации 1000 Ед/мл гибель клеток линии JEG-3 была выше, чем при использовании концентрации 400 Ед/мл (Рисунок 7.5).

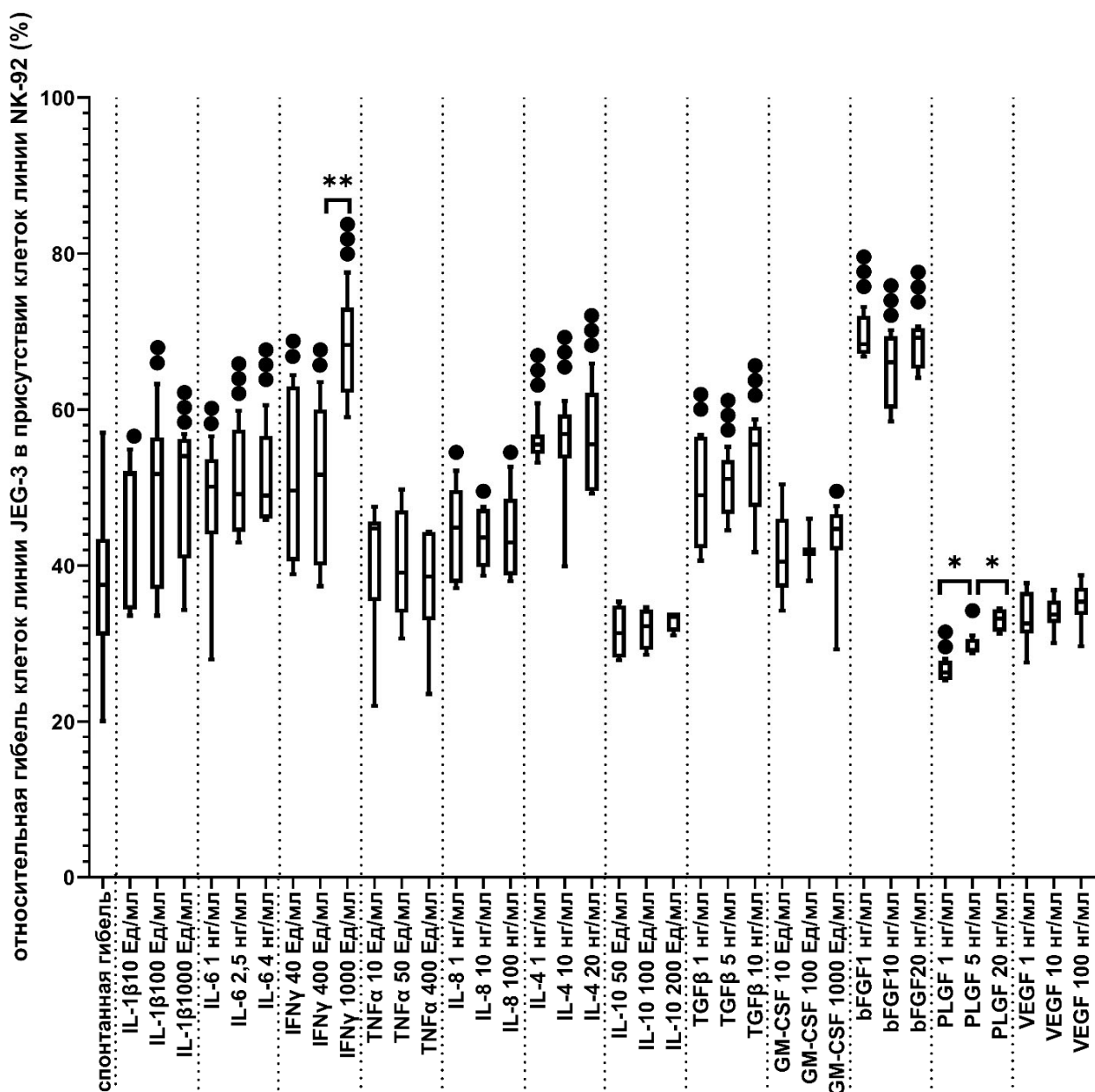


Рисунок 7.5 - Относительная гибель клеток линии JEG-3 после инкубации в присутствии клеток линии NK-92 и цитокинов. Статистическая значимость отличия от спонтанной гибели: • -  $p < 0,05$ , •• -  $p < 0,01$ , ••• -  $p < 0,001$ . Статистическая значимость различий между гибелью клеток линии JEG-3 в присутствии НК-клеток и разных концентраций одного цитокина: \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$

В присутствии НК-клеток и PLGF в концентрациях 1 нг/мл, 5 нг/мл гибель клеток линии JEG-3 была ниже, чем без цитокина. Отмечено, что в присутствии НК-клеток и PLGF в

концентрации 1 нг/мл гибель клеток линии JEG-3 была ниже, чем при использовании концентрации 5 нг/мл, а при использовании концентрации 5 нг/мл - ниже, чем с PLGF в концентрациях 20 нг/мл (Рисунок 7.5).

Сравнение гибели клеток трофобласта в присутствии цитокинов с гибелью клеток трофобласта в присутствии цитокинов и клеток линии NK-92 показало, что при добавлении NK-клеток относительная гибель клеток трофобласта возрастала (Рисунок 7.6). Следует отметить, что в присутствии IL-4 (1 нг/мл, 10 нг/мл), PLGF (20 нг/мл) и VEGF (100 нг/мл) цитотоксичность клеток линии NK-92 в отношении клеток трофобласта не отличалась от гибели клеток трофобласта в присутствии этих же цитокинов, но без клеток линии NK-92.

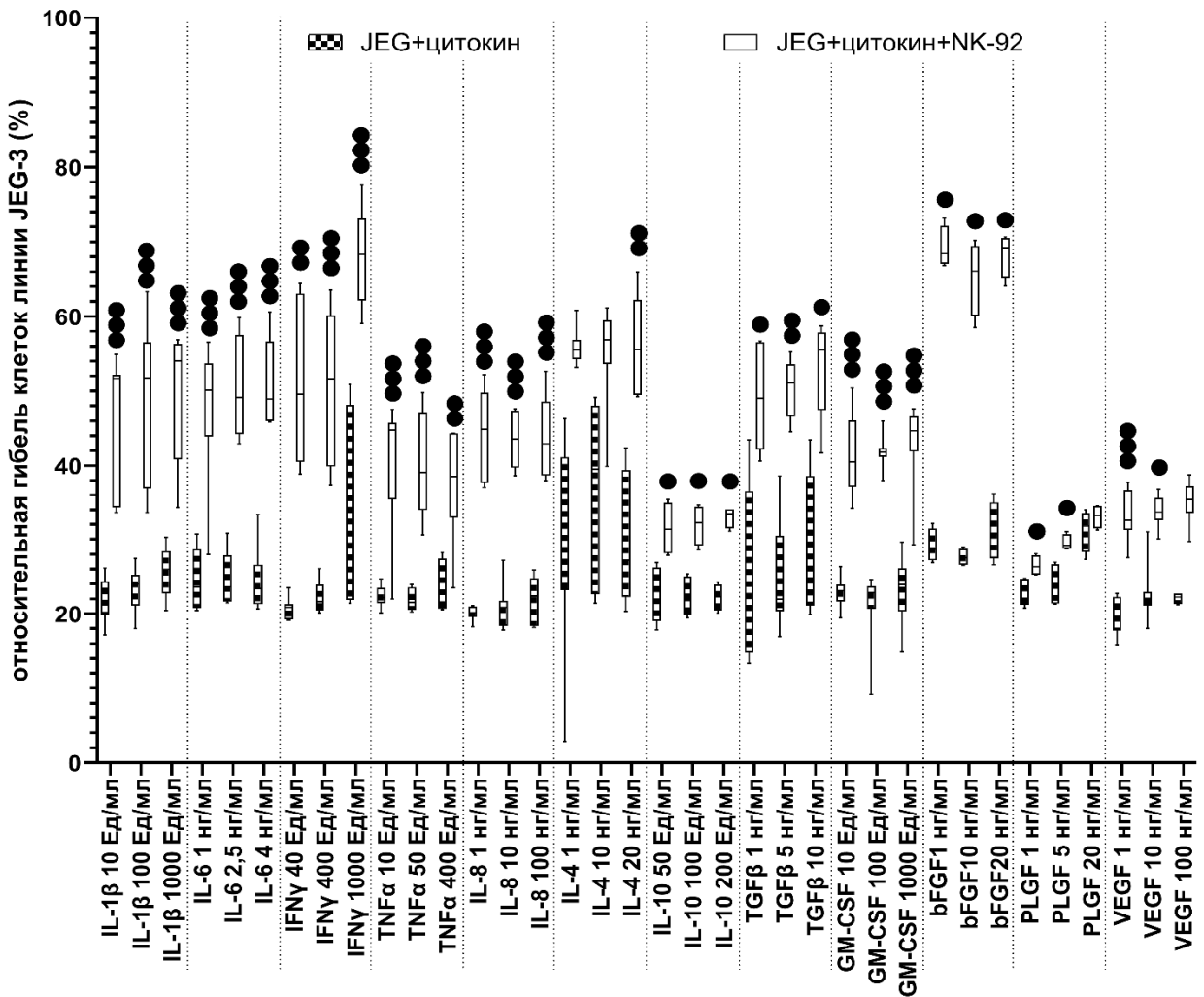


Рисунок 7.6 - Относительная гибель клеток линии JEG-3 после инкубации в присутствии цитокинов, без клеток линии NK-92 и в их присутствии. Статистическая значимость отличия от гибели клеток линии JEG-3 в присутствии цитокина: • -  $p < 0,05$ , •• -  $p < 0,01$ , ••• -  $p < 0,001$

## 7.2 Цитотоксическая активность клеток линии NK-92 под влиянием кондиционированных сред ворсин хориона

Установлено, что в присутствии клеток линии NK-92 и КС ворсин хориона женщин с физиологической беременностью в I и III триместрах гибель клеток трофобласта линии JEG-3 была выше уровня спонтанной гибели (Рисунок 7.7). В присутствии КС ворсин хориона I триместра цитотоксическая активность клеток линии NK-92 была выше по сравнению с таковой при культивировании NK-клеток и клеток трофобласта без добавления индукторов (Рисунок 7.7).

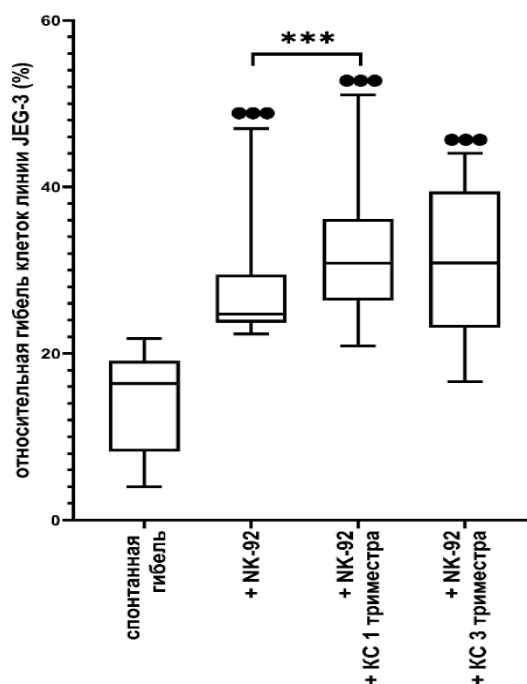


Рисунок 7.7 - Относительная гибель клеток трофобласта линии JEG-3 в присутствии клеток линии NK-92 и КС ворсин хориона I и III триместров. Статистическая значимость отличия от спонтанной гибели клеток линии JEG-3: ••• -  $p < 0,001$ . Статистическая значимость различий: \*\*\* -  $p < 0,001$

## 7.3 Экспрессия проапоптотических рецепторов и лигандов клеток линии NK-92 в присутствии клеток трофобласта и цитокинов

Для определения влияния цитокинов на NK-клетки в модели реализации цитотоксической активности NK-клеток в отношении клеток трофобласта линии JEG-3 оценивали изменение экспрессии проапоптотических рецепторов и лигандов клетками линии NK-92, проинкубированных без цитокинов и в их присутствии. Установлено, что после

инкубации с TNF $\alpha$  количество клеток линии Fas<sup>+</sup> NK-92 и интенсивность экспрессии Fas были повышены по сравнению с количеством этих клеток и интенсивностью экспрессии без индуктора (Рисунок 7.8а, Рисунок 7.9а). В то же время количество NK-клеток, экспрессирующих DR4 и DR5, было снижено в присутствии IL-15 по сравнению с количеством этих клеток в отсутствии индукторов (Рисунок 7.8б). Количество DR5<sup>+</sup> NK-клеток и интенсивность экспрессии ими DR5 были снижены в присутствии TGF $\beta$  по сравнению с нестимулированными NK-клетками (Рисунок 7.8в, Рисунок 7.9в). Экспрессия других проапоптотических рецепторов и лигандов NK-клетками не изменялась в присутствии цитокинов.

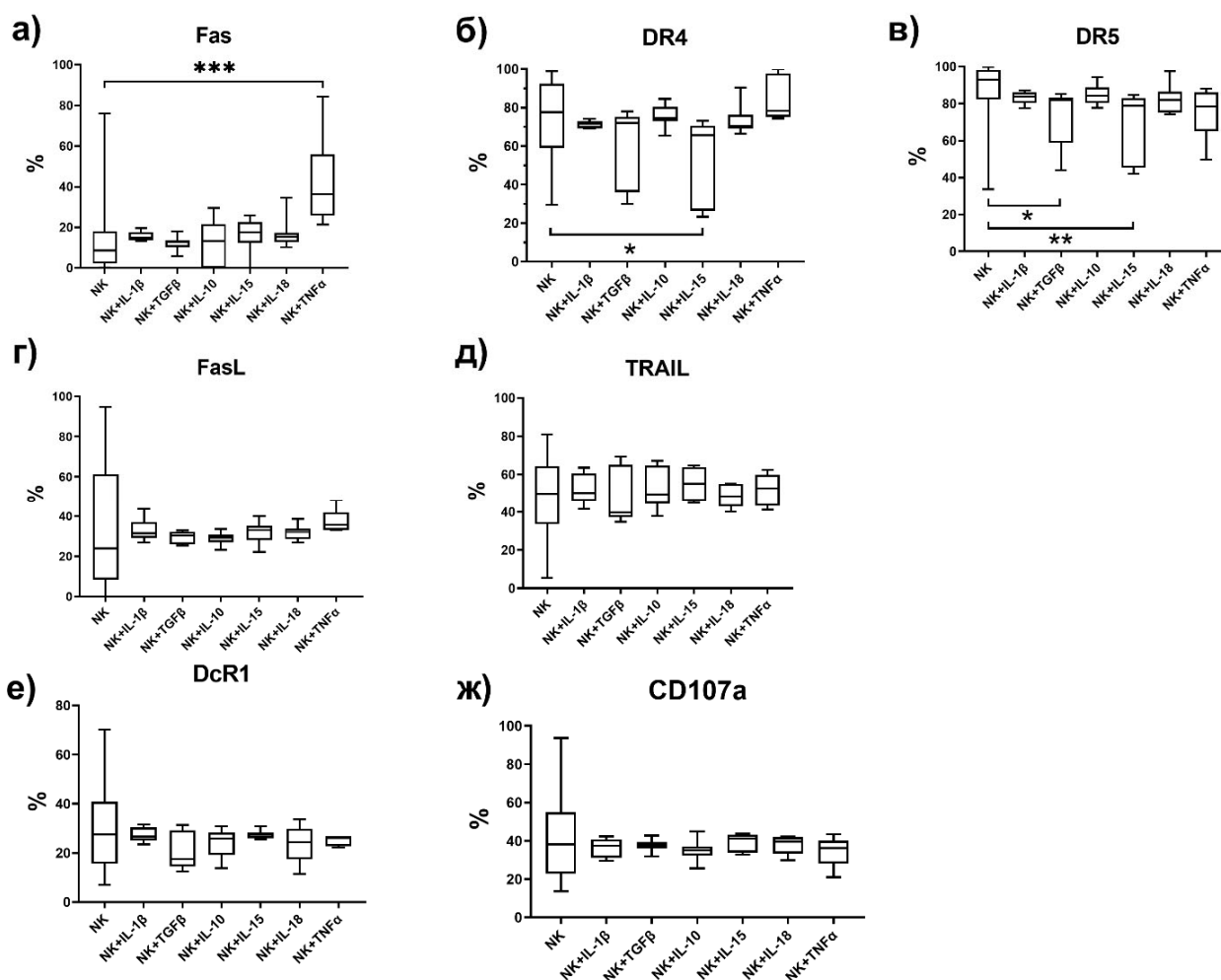


Рисунок 7.8 - Относительное количество (%) клеток линии NK-92, экспрессирующих рецепторы и лиганды, связанные с цитотоксической функцией, после инкубации с цитокинами: а) Fas, б) DR4, в) DR5, г) FasL, д) TRAIL, е) DcR1, ж) CD107a. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ .

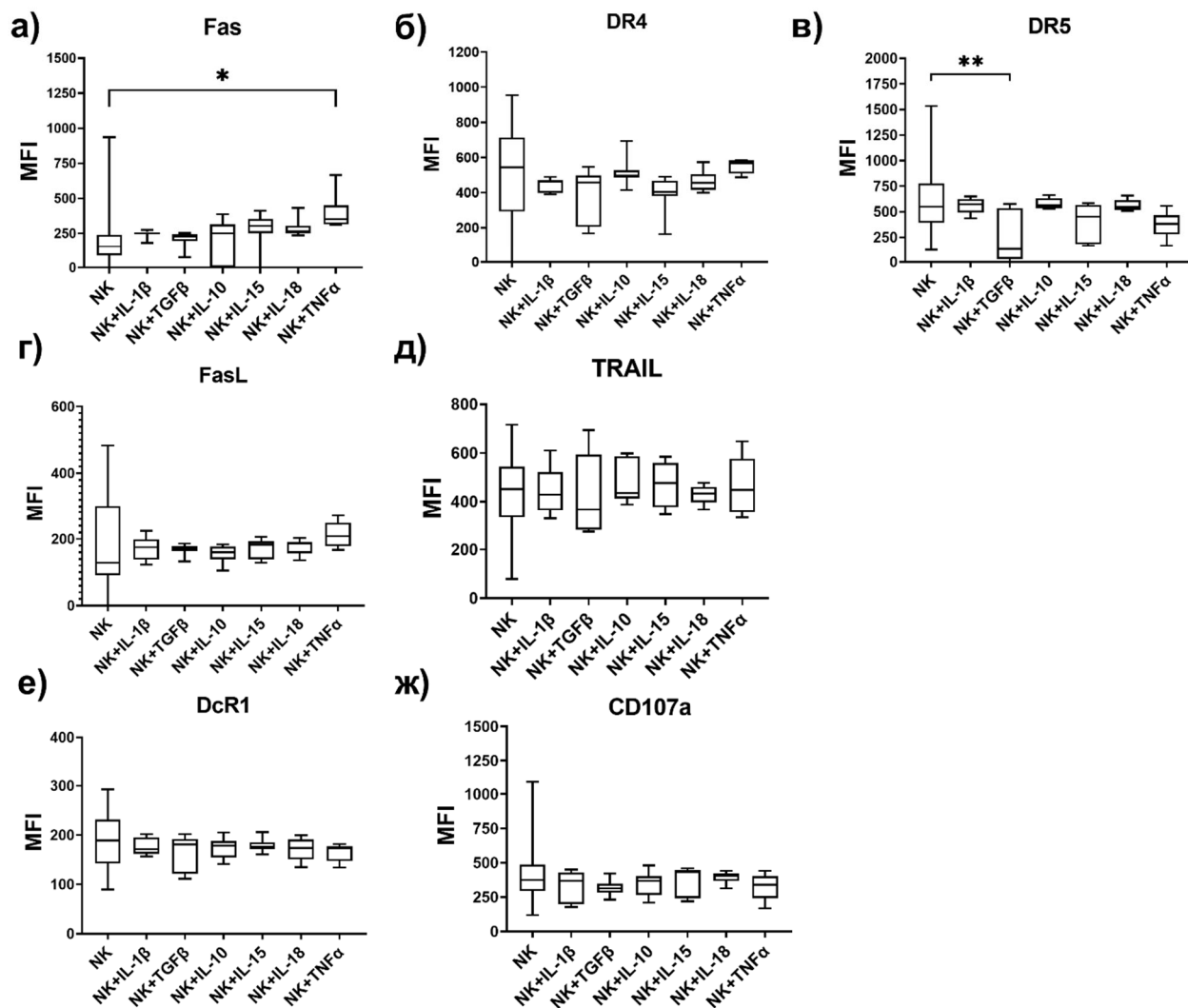


Рисунок 7.9 - Интенсивность экспрессии (MFI) клетками линии NK-92 рецепторов и лигандов, связанных с цитотоксической функцией, после инкубации с цитокинами: а) Fas, б) DR4, в) DR5, г) FasL, д) TRAIL, е) DcR1, ж) CD107a. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$

Установлено, что в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3 в модели реализации цитотоксической активности NK-клеток клетки линии NK-92 изменяют экспрессию рецепторов, связанных с цитотоксичностью. Относительное количество NK-клеток, экспрессирующих рецепторы DR5 и DcR1, а также мембранные белки CD107a и TRAIL, было снижено после контактного взаимодействия с клетками линии JEG-3 по сравнению с интактными NK-клетками (Рисунок 7.10).

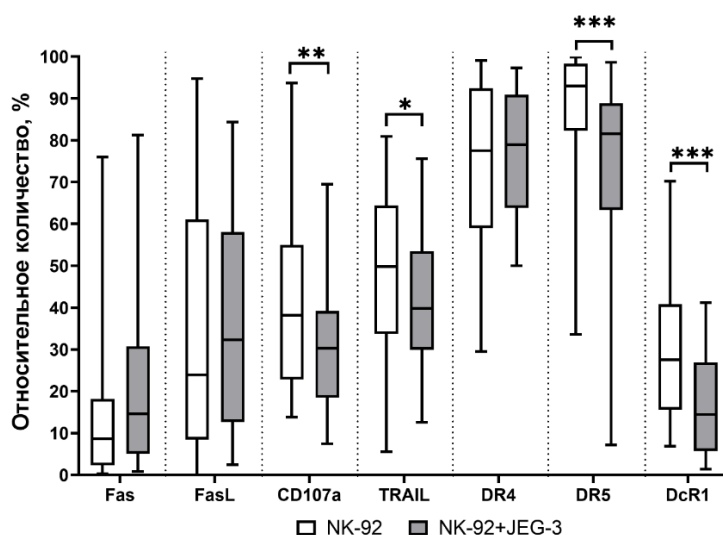


Рисунок 7.10 - Относительное количество клеток линии NK-92, экспрессирующих рецепторы и лиганды, связанные с цитотоксической функцией, в модели реализации NK-клетками цитотоксической активности. Статистическая значимость различий: \* -  $p<0,05$ , \*\* -  $p<0,01$ , \*\*\* -  $p<0,001$

Интенсивность экспрессии TRAIL, DR5 и DcR1 клетками линии NK-92 также была снижена после контактного взаимодействия с клетками трофобласта по сравнению с интенсивностью экспрессии интактных NK-клеток (Рисунок 7.11). При сравнении экспрессии NK-клетками проапоптотических рецепторов и лигандов в присутствии клеток трофобласта и цитокинов различий выявлено не было.

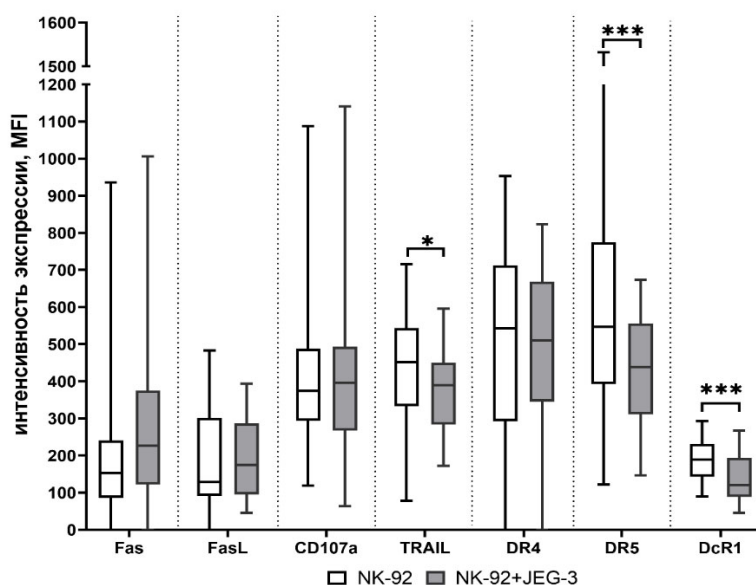


Рисунок 7.11 - Интенсивность экспрессии клетками линии NK-92 рецепторов и лигандов, связанных с цитотоксической функцией, в модели реализации NK-клетками цитотоксической активности. Статистическая значимость различий: \* -  $p<0,05$ , \*\*\* -  $p<0,001$



#### 7.4 Экспрессия проапоптотических рецепторов и лигандов клеток линии NK-92 в присутствии клеток трофобласта и кондиционированных сред ворсин хориона

Установлено, что в присутствии КС ворсин хориона III триместра беременности относительное количество FasL+NK-клеток было повышено, а количество DcR1+NK-клеток понижено по сравнению с количеством клеток, проинкубированных без КС (Рисунок 7.12). Количество NK-клеток, несущих в составе своей мембраны DcR1, было также снижено в присутствии КС ворсин хориона III триместра относительно количества этих клеток в присутствии КС I триместра (Рисунок 7.12).

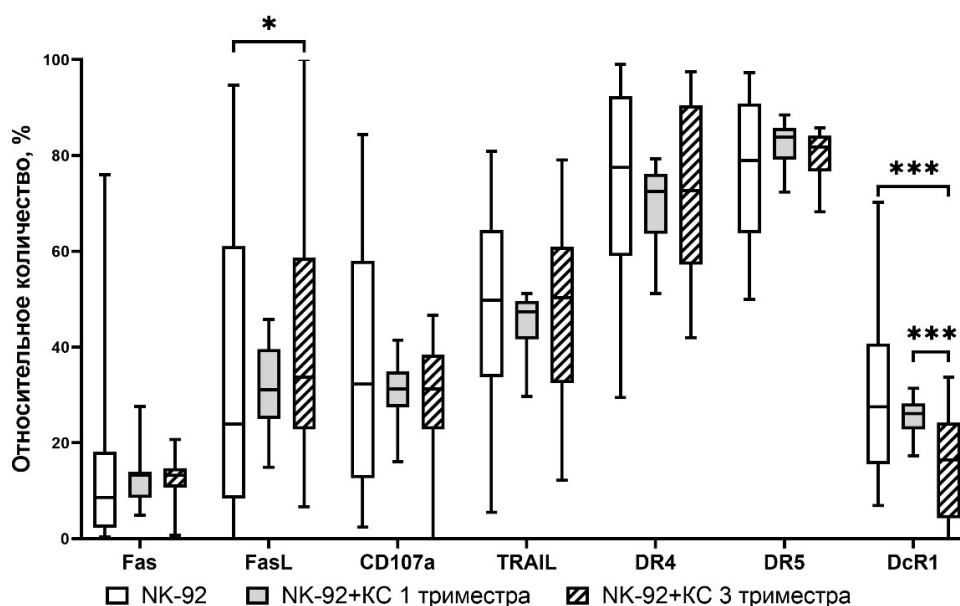


Рисунок 7.12 - Относительное количество клеток линии NK-92, экспрессирующих рецепторы и лиганды, связанные с цитотоксической функцией, после инкубации с КС ворсин хориона. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ , \*\*\* -  $p < 0,001$

Интенсивность экспрессии клетками линии NK-92 TRAIL была снижена в присутствии КС ворсин хориона I триместра по сравнению с уровнем экспрессии неактивированных NK-клеток (Рисунок 7.13).

Установлено, что в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3 в модели реализации цитотоксической активности NK-клеток количество клеток линии NK-92, экспрессирующих CD107a, DR4 и DR5, снижено в присутствии КС I триместра по сравнению с нестимулированными КС клетками (Рисунок 7.14). В присутствии КС III триместра количество NK-клеток с фенотипом DR4+, DR5+, а также интенсивность экспрессии этих рецепторов NK-клетками были снижены по сравнению с параметрами NK-клеток в присутствии трофобласта, но без КС (Рисунок 7.14, Рисунок 7.15).

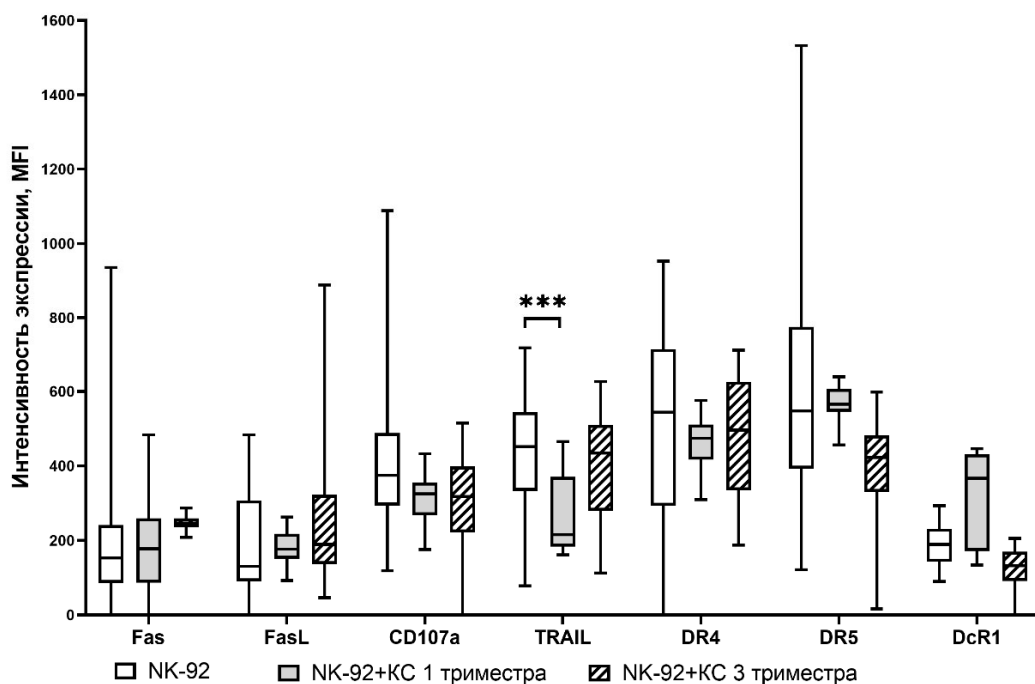


Рисунок 7.13 - Интенсивность экспрессии клетками линии NK-92 рецепторов и лигандов, связанных с цитотоксической функцией, после инкубации с КС ворсин хориона. Статистическая значимость различий: \*\*\* -  $p < 0,001$

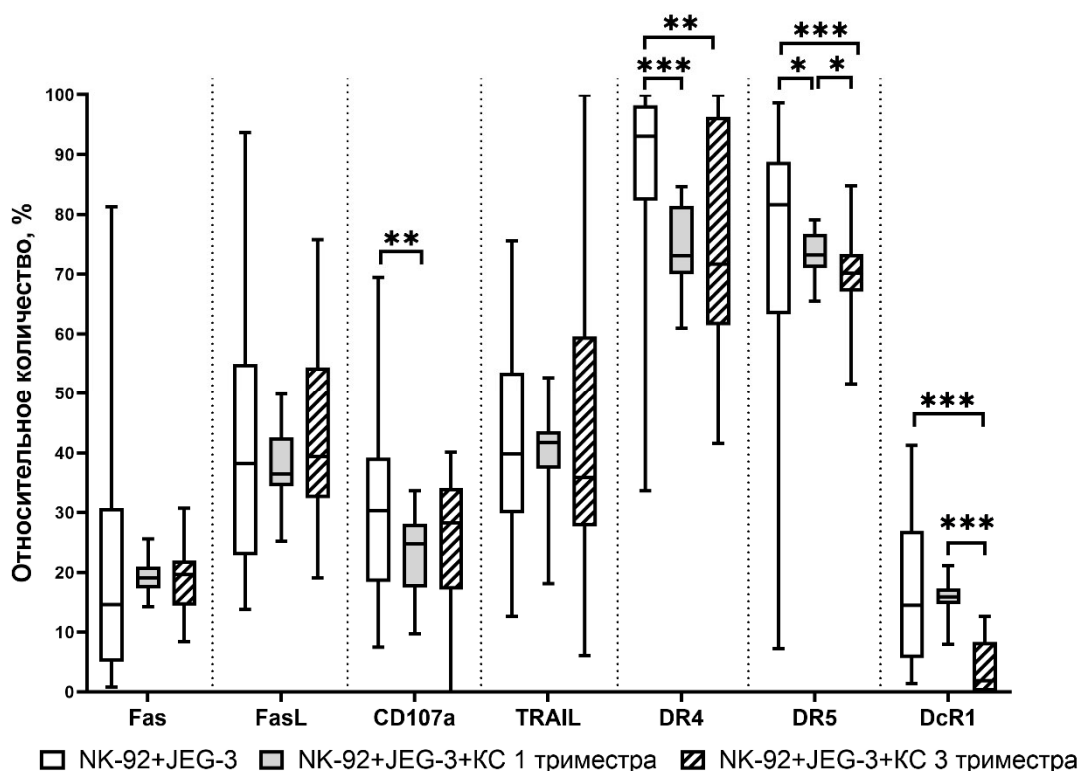


Рисунок 7.14 - Относительное количество клеток линии NK-92, экспрессирующих рецепторы и лиганды, связанные с цитотоксической функцией, в модели реализации NK-клетками цитотоксической активности в КС ворсин хориона. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$

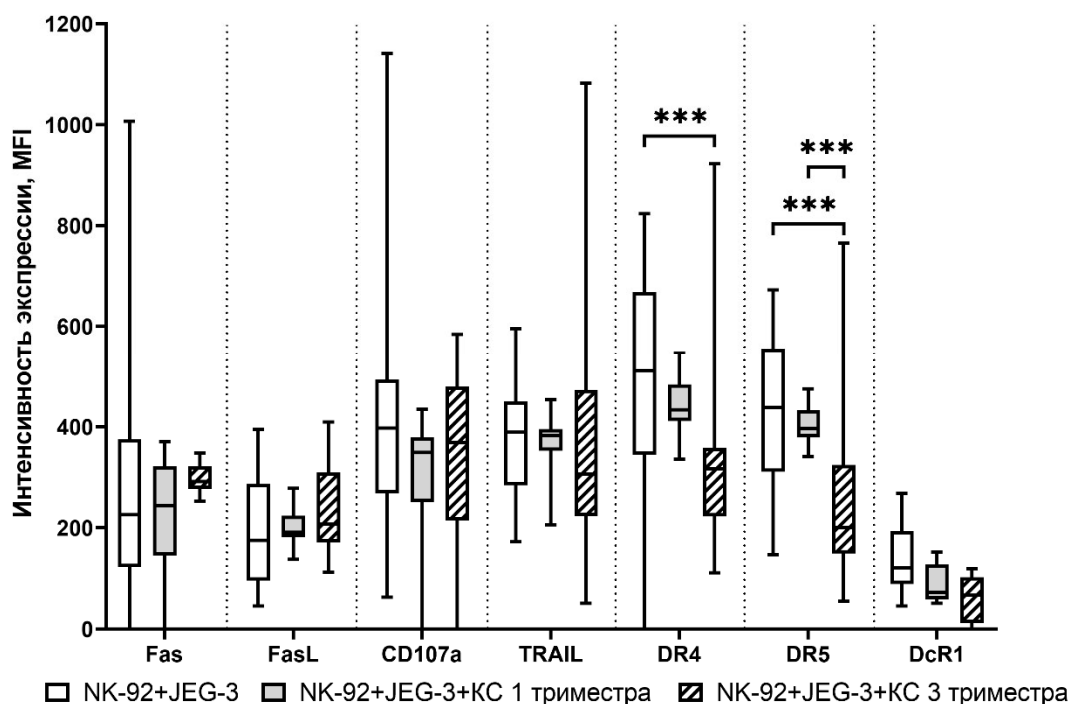


Рисунок 7.15 - Интенсивность экспрессии клетками линии NK-92 рецепторов и дигандов, связанных с цитотоксической функцией, в модели реализации NK-клетками цитотоксической активности в КС ворсин хориона. Статистическая значимость различий: \*\*\* -  $p < 0,001$

Количество DcR1+ NK-клеток было также снижено в присутствии КС ворсин хориона III триместра по сравнению с количеством этих клеток в присутствии трофобласта, но без КС (Рисунок 7.14). Количество NK-клеток, экспрессирующих DR5 и DcR1 было снижено в присутствии клеток трофобласта и КС ворсин хориона III триместра по сравнению с количеством в присутствии клеток трофобласта и КС I триместра (Рисунок 7.14). В присутствии клеток трофобласта и КС ворсин хориона III триместра также была снижена интенсивность экспрессии клетками линии NK-92 DR5 по сравнению с интенсивностью в присутствии клеток трофобласта и КС ворсин хориона I триместра (Рисунок 7.15).

### 7.5 Содержание гранзима В и перфорины в клетках линии NK-92 и каспаз 3 и 8 в клетках линии JEG-3 после контактного и дистантного взаимодействия

После контактного сокультивирования с клетками трофобласта, в лизатах клеток линии NK-92 содержание GrzB было снижено, а содержание перфорины не отличалось от его уровня в интактных клетках (Рисунок 7.16 а,б).

Установлено, что в после контактного сокультивирования клеток линий JEG-3 и NK-92, GrzB обнаруживается в клетках линии JEG-3 (Рисунок 7.16 в). После дистантного сокультивирования этих клеток, в клетках линии JEG-3 гранзим В не выявлен.

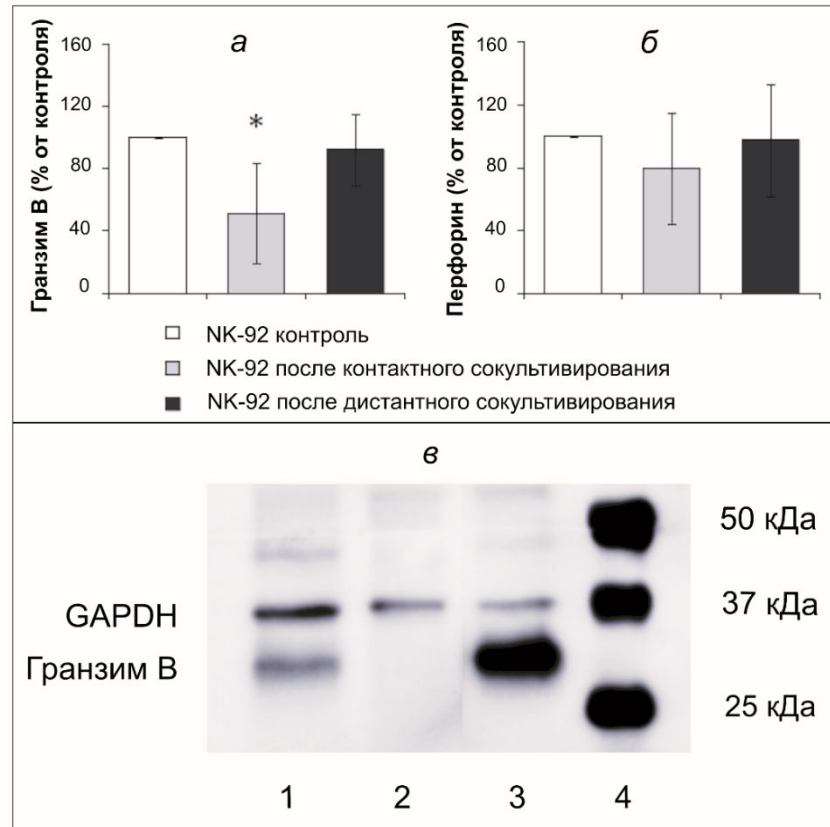


Рисунок 7.16 - Содержание GrzB и перфорина в клетках линии NK-92 после контактного и дистантного сокультивирования с клетками линии JEG-3. (а) Содержание GrzB в лизатах клеток линии NK-92. Статистическая значимость отличия от интактных клеток линии NK-92 (контроль): \* -  $p < 0,05$ . (б) Содержание перфорина в лизатах клеток линии NK-92. (в) Иммуноблот, демонстрирующий содержание GrzB в клетках линии JEG-3 после контактного сокультивирования с клетками линии NK-92. Обозначения на рисунке: 1 - клетки линии JEG-3 после совместного культивирования с клетками линии NK-92; 2 - интактные клетки линии JEG-3; 3 - интактные клетки линии NK-92; 4 - маркеры молекулярной массы

После дистантного сокультивирования с клетками линии NK-92 содержание прокаспазы-3 в клетках линии JEG-3 было снижено, а соотношение фрагмента каспазы-3 к прокаспазе-3 повышено по сравнению с клетками линии JEG-3 из контрольных образцов (Рисунок 7.17 а,б). Однако после дистантного сокультивирования уровень фрагмента активной каспазы-3 в лизатах клеток линии JEG-3 не отличался от показателя клеток линии JEG-3 из контрольных образцов (Рисунок 7.17 б).

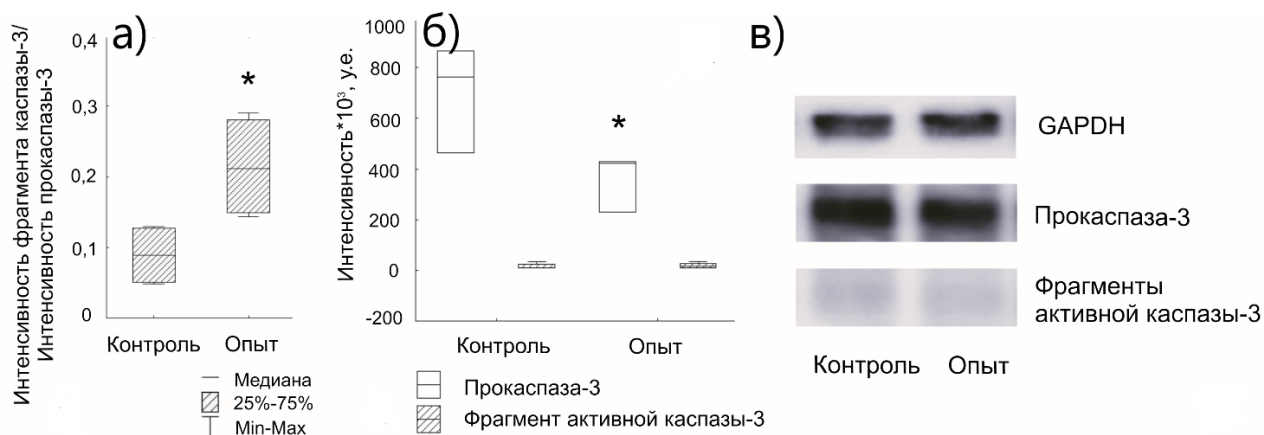


Рисунок 7.17 - Содержание каспазы 3 в клетках линии JEG-3 после дистантного сокультивирования с клетками линии NK-92. Интенсивность хемилюминисценции антител к каспазе-3 и прокаспазе-3 интерпретировали, как их содержание в клетках: (а) соотношение содержания фрагмента активной каспазы-3 к содержанию прокаспазы-3 в клетках линии JEG-3, прокультивированных без NK-клеток (контроль) и после дистантного сокультивирования с клетками линии NK-92 (опыт); (б) влияние клеток линии NK-92 на содержание фрагмента каспазы-3 и прокаспазы-3 в клетках линии JEG-3 после дистантного сокультивирования; (в) иммуноблот, демонстрирующий содержание прокаспазы-3 и каспазы-3 в клетках линии JEG-3. Статистическая значимость отличия от клеток линии JEG-3 в контрольных пробах: \* -  $p < 0,05$

После дистантного сокультивирования содержание прокаспазы-8 было снижено в клетках линии JEG-3 по сравнению с клетками линии JEG-3 из контрольных образцов (Рисунок 7.18). Содержание фрагмента активной каспазы-8, а также отношение содержания фрагмента каспазы 8 к прокаспазе 8, не различалось между клетками линии JEG-3 после дистантного сокультивирования и клетками линии JEG-3 из контрольных образцов (Рисунок 7.18 а,б).

Установлено повышенное соотношение интенсивности фрагмента активной каспазы-3 к интенсивности прокаспазы-3 в клетках линии JEG-3, а также повышенное по сравнению с контролем содержание фрагмента активной каспазы-3 в клетках линии JEG-3 после контактного культивирования с клетками линии NK-92 (Рисунок 7.19 а,б). Содержание прокаспазы-3 не различалось в клетках линии JEG-3 после культивирования без и в присутствии NK-клеток (Рисунок 7.19 б). В отличие от результатов, полученных после дистантного сокультивирования, изменение соотношения связано с повышенным уровнем фрагмента активной каспазы-3 в клетках линии JEG-3 после контактного сокультивирования с клетками линии NK-92 (Рисунок 7.19 б).

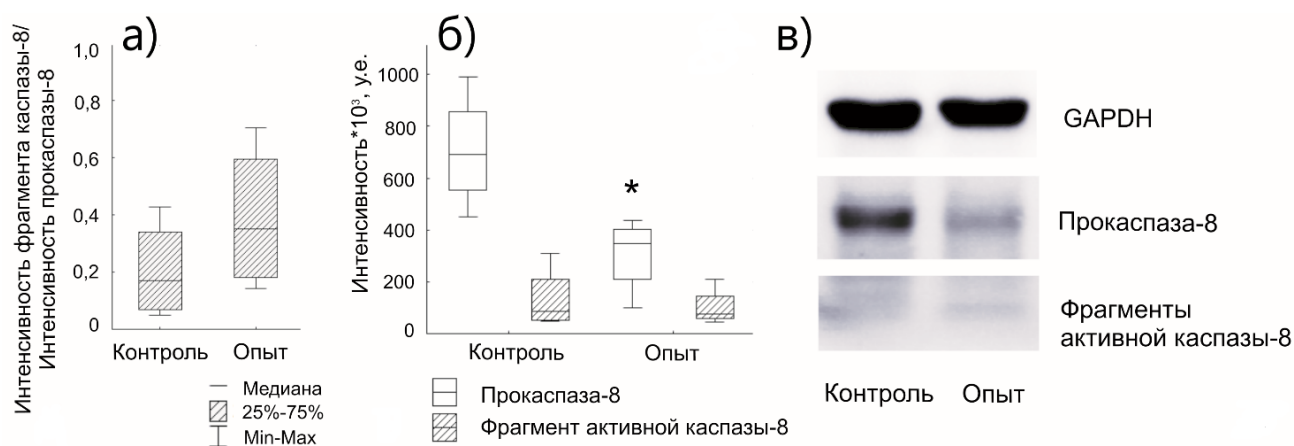


Рисунок 7.18 - Содержание каспазы 8 в клетках линии JEG-3 после дистантного сокультивирования с клетками линии NK-92. Интенсивность хемилюминисценции антител к каспазе-8 и прокаспазе-8 интерпретировали, как их содержание в клетках: (а) отношение содержания фрагмента активной каспазы-8 к содержанию прокаспазы-8 в клетках линии JEG-3, прокультивированных без NK-клеток (контроль), и после дистантного сокультивирования с клетками линии NK-92 (опыт); (б) влияние клеток линии NK-92 на содержание фрагмента каспазы-8 и прокаспазы-8 в клетках линии JEG-3 при дистантном сокультивировании; (в) иммуноблот, демонстрирующий содержание прокаспазы-8 и каспазы-8 клеток линии JEG-3. Статистическая значимость отличия от клеток линии JEG-3 в контрольных пробах: \* -  $p < 0,05$

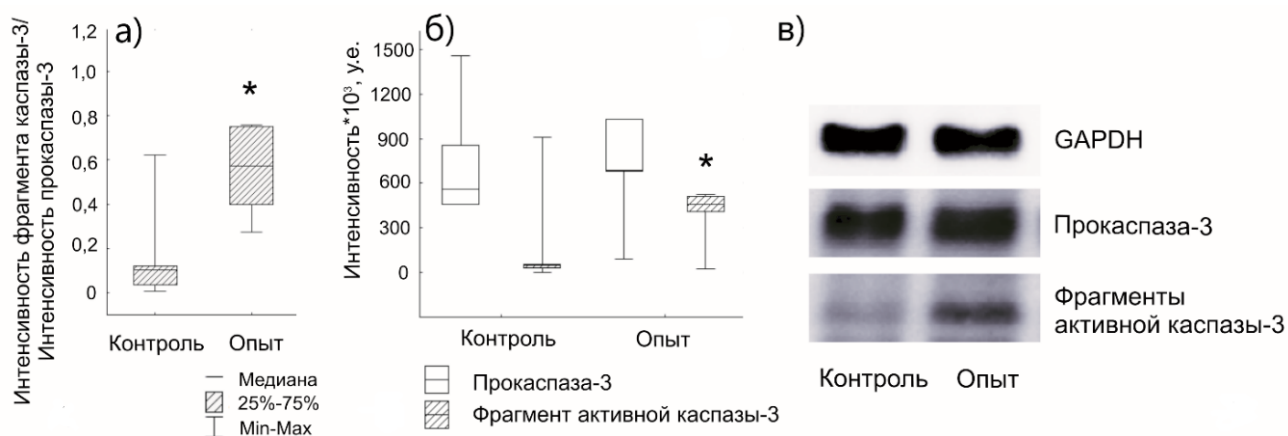


Рисунок 7.19 - Содержание каспазы 3 в клетках линии JEG-3 после контактного сокультивирования с клетками линии NK-92. Интенсивность хемилюминисценции антител к каспазе-3 и прокаспазе-3 интерпретировали, как их содержание в клетках: (а) отношение содержания фрагмента активной каспазы-3 к содержанию прокаспазы-3 в клетках линии JEG-3, прокультивированных без NK-клеток (контроль), и после контактного сокультивирования с клетками линии NK-92 (опыт); (б) влияние клеток линии NK-92 на содержание фрагмента каспазы-3 и прокаспазы-3 в клетках линии JEG-3 при дистантном сокультивировании; (в) иммуноблот, демонстрирующий содержание прокаспазы-3 и каспазы-3 клеток линии JEG-3. Статистическая значимость отличия от клеток линии JEG-3 в контрольных образцах: \* -  $p < 0,05$

После контактного сокультивирования также установлена повышенная степень активации каспазы-8, отраженная в виде отношения фрагмента активной каспазы-8 к прокаспазе-8, в клетках линии JEG-3 по сравнению с клетками линии JEG-3 в контрольных образцах (Рисунок 7.20а). Установленное повышение отношения связано с обнаружением в опытных образцах фрагмента активной каспазы-8 (Рисунок 7.20 б), так как отличия интенсивности прокаспазы-8 в клетках линии JEG-3 после контактного сокультивирования с клетками линии NK-92 от контрольных образцов выявлено не было (Рисунок 7.20 б).

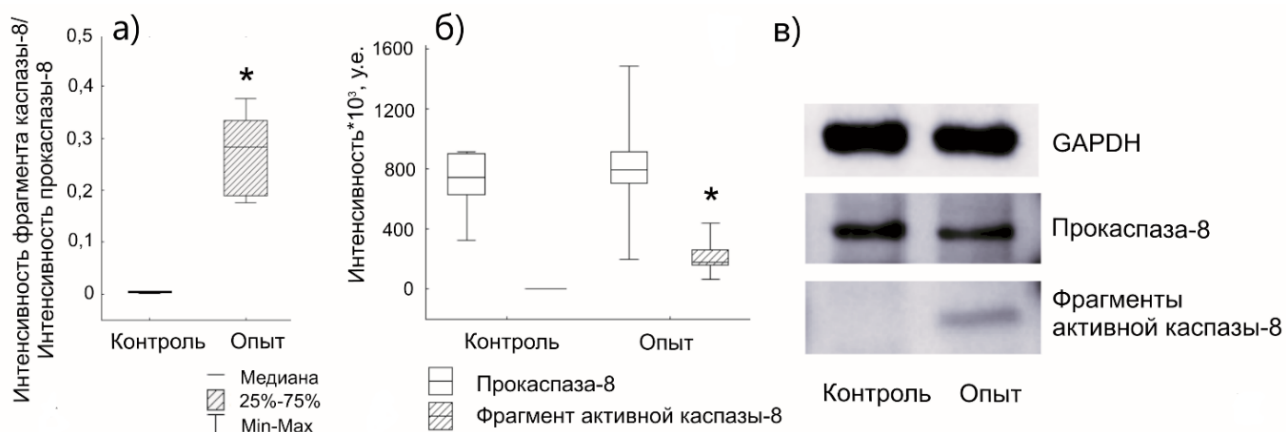


Рисунок 7.20 - Содержание каспазы 8 в клетках линии JEG-3 после контактного сокультивирования с клетками линии NK-92. Интенсивность хемилюминисценции антител к каспазе-8 и прокаспазе-8 интерпретировали, как их содержание в клетках: (а) отношение содержания фрагмента активной каспазы-8 к интенсивности прокаспазы-8 в клетках линии JEG-3, прокультивированных без NK-клеток (контроль), и после контактного сокультивирования с клетками линии NK-92 (опыт); (б) влияние клеток линии NK-92 на содержание фрагмента каспазы-8 и интенсивность прокаспазы-8 в клетках линии JEG-3 при контактном сокультивировании; (в) иммуноблот, демонстрирующий содержание прокаспазы-8 и каспазы-8 клеток линии JEG-3. Статистическая значимость отличия от клеток линии JEG-3 в контрольных пробах: \* -  $p < 0,05$

### 7.6 Цитотоксическая активность клеток линии NK-92 после совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3

После предварительного сокультивирования с клетками трофобласта линии JEG-3 клетки линии NK-92 остаются способны вызывать гибель клеток мишеней линии K-562. Установлено, что цитотоксическая активность NK-клеток после сокультивирования с клетками трофобласта снижена по сравнению с таковой в случае использования интактных NK-клеток (Рисунок 7.21).

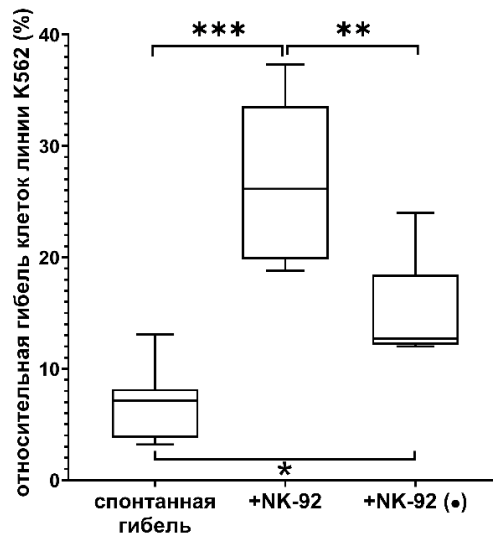


Рисунок 7.21 - Гибель клеток линии К-562 после инкубации с интактными клетками линии NK-92 (+NK-92) и клетками линии NK-92, предварительно прокультивированными с клетками трофобласта линии JEG-3 (+NK-92 (•)). Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$

### 7.7 Содержание белков, связанных с цитотоксичностью, в клетках линии NK-92, после совместного контактного культивирования с клетками линии JEG-3 и цитокинами

Количество клеток линии NK-92, содержащих GrzA, не изменялось при различных условиях культивирования (Рисунок 7.22 а). Интенсивность экспрессии GrzA клетками линии NK-92 была снижена после культивирования в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3 относительно монокультуры NK-клеток (Рисунок 7.22б). Цитокины IL-15, IL-18, IL-10, IFN $\gamma$  или TGF $\beta$  не изменяли влияния клеток трофобласта на интенсивность экспрессии GrzA клетками линии NK-92: в сокультуре в присутствии этих цитокинов она также была снижена по сравнению с экспрессией в монокультуре с цитокинами (Рисунок 7.2б). При добавлении IL-15 или TNF $\alpha$  к сокультуре клеток линии NK-92 и клеток трофобласта линии JEG-3 в естественных киллерах наблюдалась повышенная интенсивность экспрессии GrzA по сравнению с параметром в сокультуре без индукторов (Рисунок 7.22б).



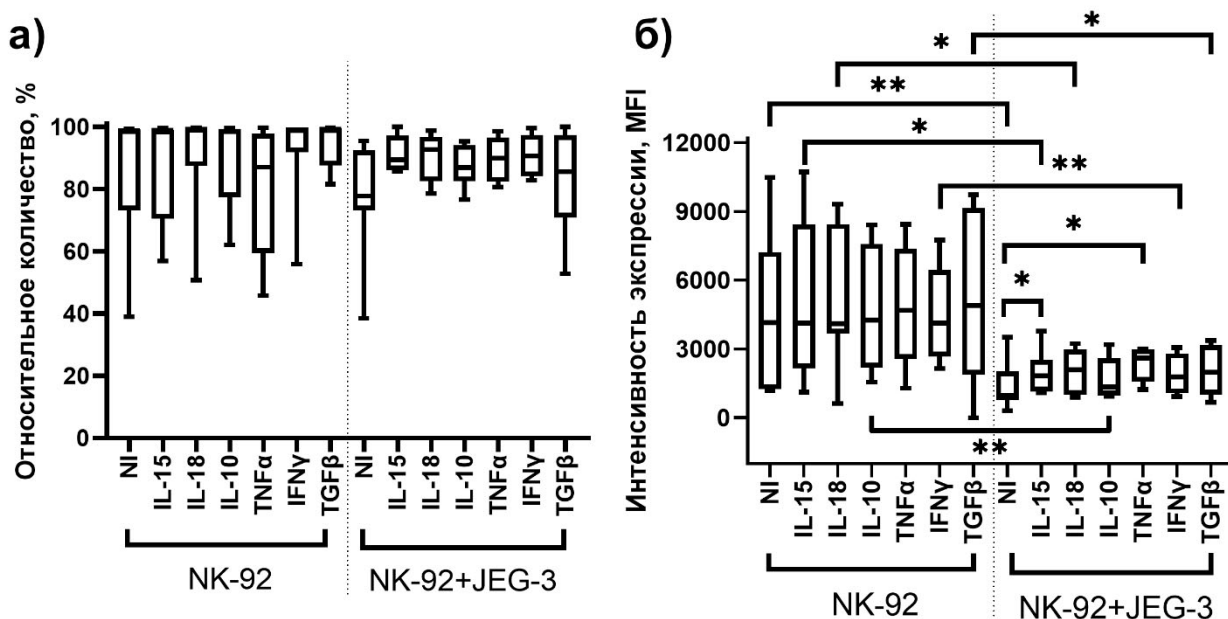


Рисунок 7.22 - Относительное количество клеток линии NK-92, содержащих GrzA (а), и интенсивность экспрессии GrzA в клетках линии NK-92 (б) после культивирования в течение 96 часов в присутствии цитокинов IL-15, IL-18, IL-10, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  или TGF $\beta$ . Обозначения на графиках: NK-92 - NK- клетки без и в присутствии цитокинов; NK-92+JEG-3 - клетки в сокультуре без и в присутствии цитокинов. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$

Относительное количество клеток линии NK-92, содержащих GrzB, было снижено в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3 без добавления цитокинов (Рисунок 7.23а). Интенсивность экспрессии GrzB в клетках линии NK-92 была снижена в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3 по сравнению с монокультурой как без добавления цитокинов, так и в присутствии цитокинов IL-15, IL-18, IL-10, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , TGF $\beta$  (Рисунок 7.23б).

Относительное количество клеток линии NK-92, содержащих перфорин, было ниже после культивирования в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3, относительно монокультуры (Рисунок 7.24 а), причем этот эффект сохранялся при культивировании в присутствии IL-15, IL-18, IL-10 или TGF $\beta$  (Рисунок 7.24а). Интенсивность экспрессии перфорина в клетках линии NK-92 была снижена в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3 по сравнению с монокультурой клеток линии NK-92. Этот эффект сохранялся при добавлении цитокинов IL-15, IL-18, IL-10 и TNF $\alpha$  (Рисунок 7.24б).

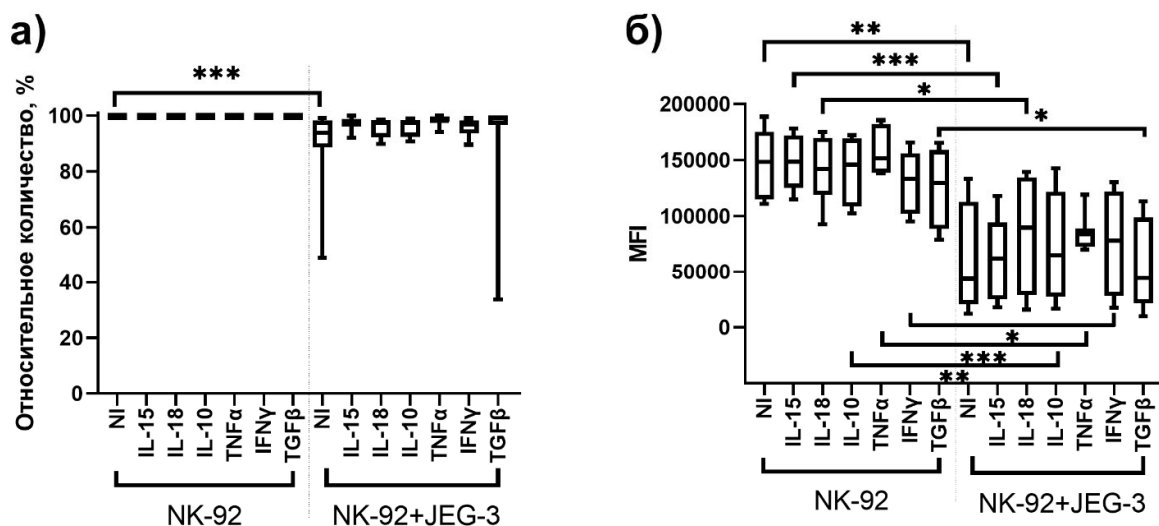


Рисунок 7.23 - Относительное количество клеток линии NK-92, содержащих GrzB (а), и интенсивность экспрессии GrzB клетками линии NK-92 (б) после культивирования в течение 96 часов в присутствии цитокинов IL-15, IL-18, IL-10, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  или TGF $\beta$ . Обозначения на графиках: NK-92 - NK- клетки без и в присутствии цитокинов; NK-92+JEG-3 - клетки в сокультуре без и в присутствии цитокинов. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$

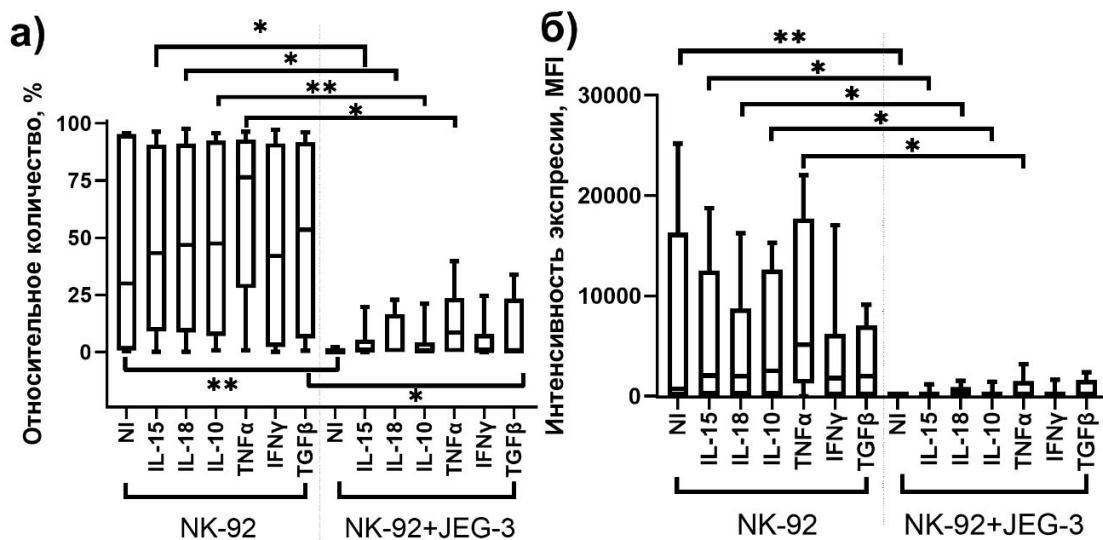


Рисунок 7.24 - Относительное количество клеток линии NK-92, содержащих перфорин (а), интенсивность экспрессии перфорина в клетках линии NK-92 (б) после культивирования в течение 96 часов в присутствии цитокинов IL-15, IL-18, IL-10, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  или TGF $\beta$ . Обозначения на графиках: NK-92 - NK- клетки без и в присутствии цитокинов; NK-92+JEG-3 - клетки в сокультуре без и в присутствии цитокинов. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$

Проанализирована экспрессия белков-ингибиторов сериновых протеаз - серпина В6 и серпина В9. Установлено, что ни клетки трофобласта линии JEG-3, ни клетки линии NK-92 не экспрессируют серпин В6. Относительное количество клеток линии NK-92, содержащих серпин В9, было снижено в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3 относительно монокультуры клеток линии NK-92 (Рисунок 7.25 а). Добавление цитокинов IL-15, IL-18, IL-10, TNF $\alpha$  или TGF $\beta$  не изменяло характера влияния клеток трофобласта на клетки линии NK-92 (Рисунок 7.25 а). Интенсивность экспрессии серпина В9 в клетках линии NK-92 также снижалось в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3 относительно монокультуры (Рисунок 7.25б), этот эффект сохранялся в присутствии цитокинов IL-15, IL-18 или TGF $\beta$  (Рисунок 7.25б).

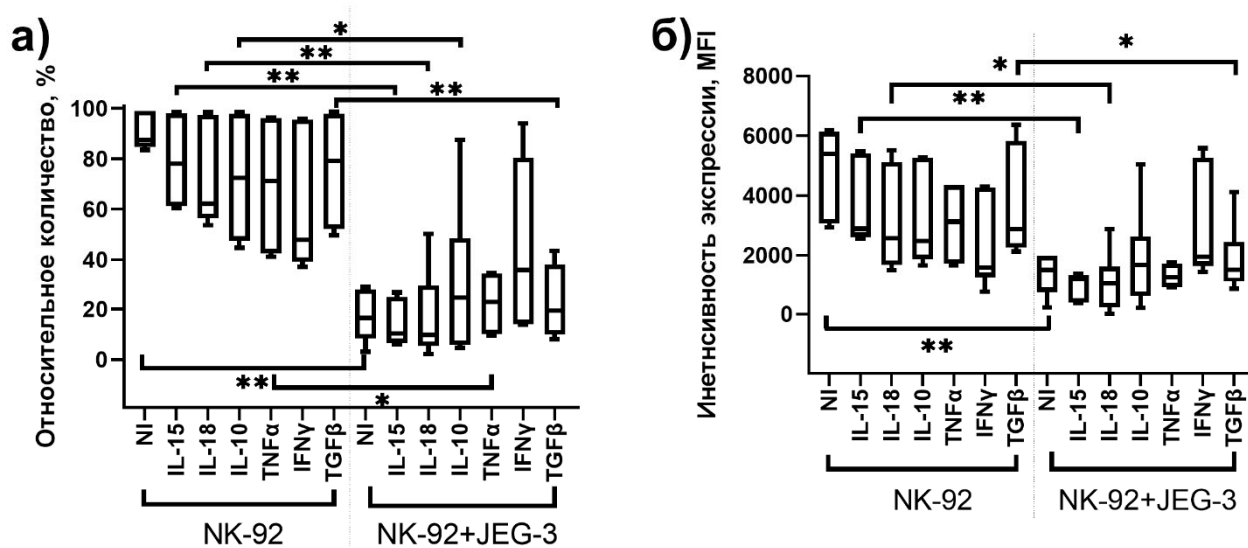


Рисунок 7.25 - Относительное количество клеток линии NK-92, содержащих серпин В9 (а), интенсивность экспрессии серпина В9 в клетках линии NK-92 (б) после культивирования в течение 96 часов в присутствии цитокинов IL-15, IL-18, IL-10, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  или TGF $\beta$ . Обозначения на графиках: NK-92 - NK- клетки без и в присутствии цитокинов; NK-92+JEG-3 - клетки в сокультуре без и в присутствии цитокинов. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$

### 7.8 Содержание белков, связанных с цитотоксичностью, в клетках линии JEG-3, после совместного контактного культивирования с клетками линии NK-92 и цитокинами

Относительное количество клеток линии JEG-3, содержащих GrzA, было повышено в составе сокультуры с клетками линии NK-92 по сравнению с монокультурой как без добавления цитокинов, так и в их присутствии (Рисунок 7.26). Цитокины IL-15 и TGF $\beta$  в сокультуре клеток

трофобласта JEG-3 с клетками линии NK-92 стимулировали повышение относительного количества клеток линии JEG-3, содержащих GrzA, по сравнению с клетками трофобласта линии JEG-3, прокультивированных в присутствии клеток линии NK-92, но без цитокинов (Рисунок 7.26).

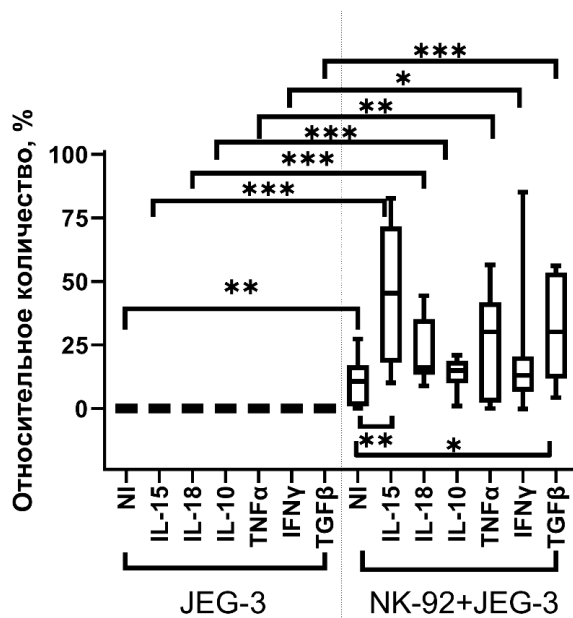


Рисунок 7.26 - Относительное количество клеток линии JEG-3, содержащих GrzA после культивирования в течение 96 часов в присутствии NK-клеток и цитокинов IL-15, IL-18, IL-10, TNFα, IFNγ или TGFβ. Обозначения на графиках: JEG-3 –клетки трофобласта без и в присутствии цитокинов; NK-92+JEG-3 - клетки в сокультуре без и в присутствии цитокинов. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$

Относительное количество клеток линии JEG-3, содержащих GrzB, было повышено после культивирования в присутствии клеток линии NK-92 и цитокинов IL-15, IL-18, IL-10, TNFα, IFNγ или TGFβ по сравнению с клетками линии JEG-3, прокультивированными в присутствии цитокинов (Рисунок 7.27). Добавление IL-10 или IFNγ к сокультуре клеток трофобласта линии JEG-3 и клеток линии NK-92 приводило к повышенному количеству клеток трофобласта, содержащих GrzB, относительно сокультуры без цитокинов (Рисунок 7.27).

Относительное количество клеток трофобласта линии JEG-3, содержащих перфорин, было повышено после культивирования в присутствии клеток линии NK-92 при добавлении цитокинов IL-10 или IFNγ относительно клеток трофобласта, прокультивированных в присутствии этих цитокинов в монокультуре (Рисунок 7.28).

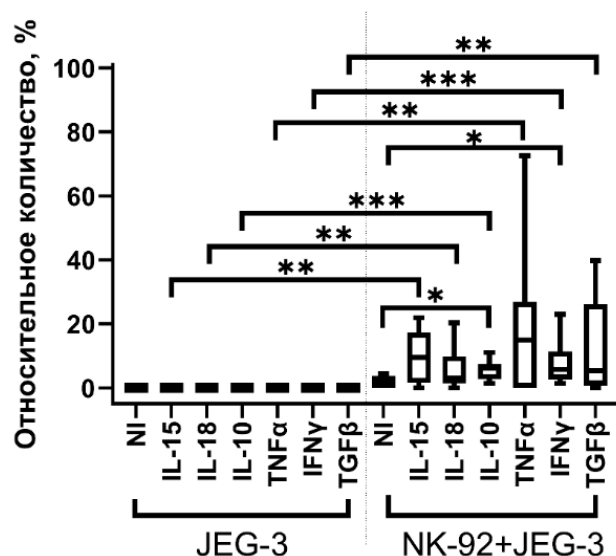


Рисунок 7.27 - Относительное количество клеток линии JEG-3, содержащих GrzB, после культивирования в течение 96 часов в присутствии NK-клеток и цитокинов IL-15, IL-18, IL-10, TNFα, IFNγ или TGFβ. Обозначения на графиках: JEG-3 –клетки трофобласта без и в присутствии цитокинов; NK-92+JEG-3 - клетки в сокультуре без и в присутствии цитокинов. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$

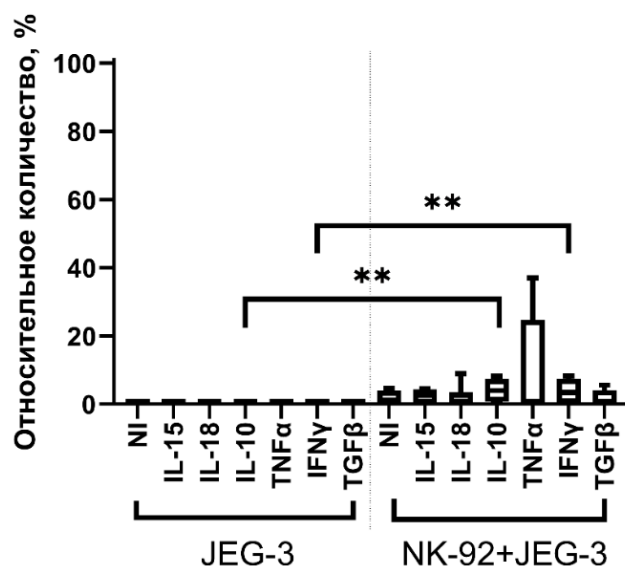


Рисунок 7.28 - Относительное количество клеток линии JEG-3, содержащих перфорин после культивирования в течение 96 часов в присутствии NK-клеток и цитокинов. Обозначения на графиках: JEG-3 –клетки трофобласта без и в присутствии цитокинов IL-15, IL-18, IL-10, TNFα, IFNγ или TGFβ; NK-92+JEG-3 - клетки в сокультуре без и в присутствии цитокинов IL-15, IL-18, IL-10, TNFα, IFNγ или TGFβ. Статистическая значимость различий: \*\* -  $p < 0,01$

Относительное количество клеток линии JEG-3, содержащих серпин В9, было снижено в присутствии цитокинов IL-15, IL-18 или IL-10 (Рисунок 7.29а). Интенсивность экспрессии серпина В9 в клетках линии JEG-3 также была снижена после культивирования в присутствии цитокинов IL-15, IL-18 или IL-10 относительно интактных клеток трофобласта (Рисунок 7.29б). В присутствии IL-15 в сокультуре с клетками линии NK-92 интенсивность экспрессии серпина В9 клетками трофобласта линии JEG-3 была повышена по сравнению с монокультурой клеток трофобласта, прокультивированных с IL-15 (Рисунок 7.29б). Добавление IL-18 к сокультуре клеток трофобласта и клеток линии NK-92 приводило к снижению интенсивности экспрессии серпина В9 в клетках трофобласта (Рисунок 7.29 б).

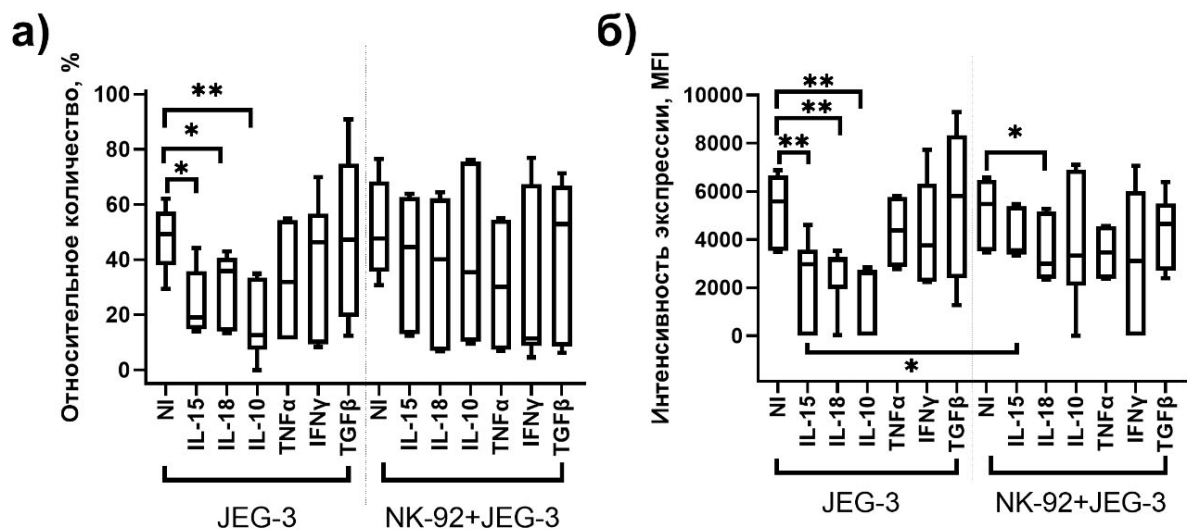


Рисунок 7.29 - Относительное количество клеток линии JEG-3, содержащих серпин В9 (а), интенсивность экспрессии серпина В9 в клетках линии JEG-3 (б) после культивирования в течение 96 часов в присутствии цитокинов. Обозначения на графиках: JEG-3 –клетки трофобласта без и в присутствии цитокинов IL-15, IL-18, IL-10, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  или TGF $\beta$ ; NK-92+JEG-3 - клетки в сокультуре без и в присутствии цитокинов IL-15, IL-18, IL-10, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  или TGF $\beta$ . Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$

Относительное количество клеток трофобласта линии JEG-3, экспрессирующих HLA-G, и интенсивность экспрессии этими клетками HLA-G были повышены в присутствии TGF $\beta$  в монокультуре (Рисунок 7.30 а,б). В сокультуре с клетками линии NK-92 относительное количество и интенсивность экспрессии клетками трофобласта HLA-G повышены в присутствии TNF $\alpha$  по сравнению с культивированием без него (Рисунок 7.30 а,б). В случае наличия TNF $\alpha$  в среде количество HLA-G $^+$  клеток трофобласта было повышено по сравнению с культивированием в среде без TNF $\alpha$  (Рисунок 7.30 а).

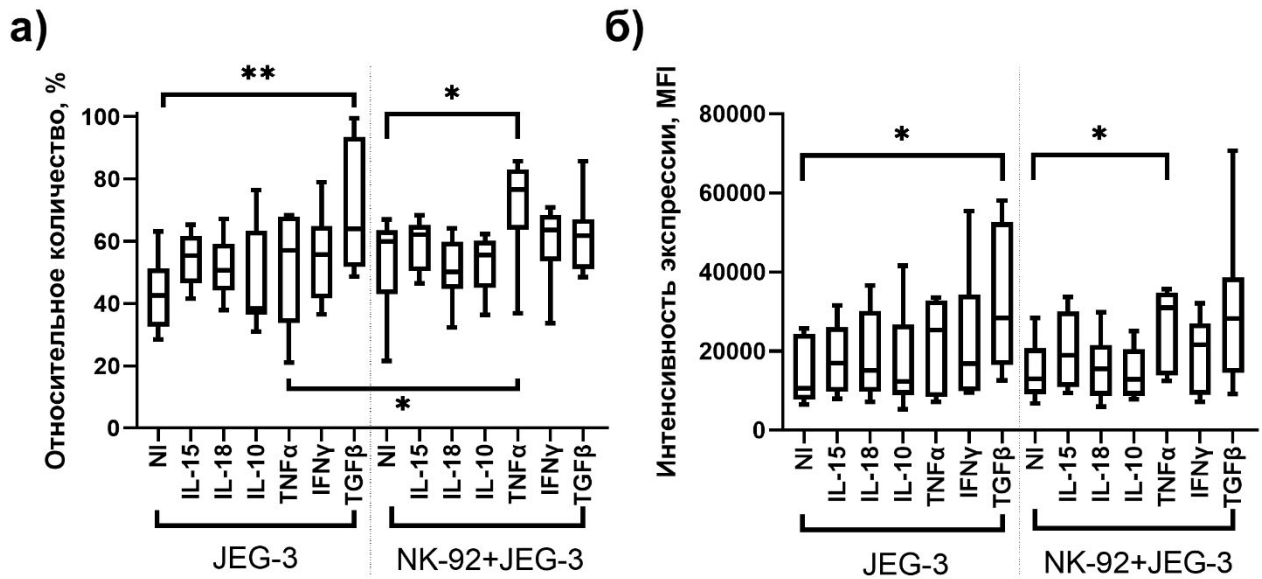


Рисунок 7.30 - Относительное количество клеток линии JEG-3, экспрессирующих HLA-G (а), интенсивность экспрессии HLA-G клетками линии JEG-3 (б) после культивирования в течение 96 часов в присутствии цитокинов IL-15, IL-18, IL-10, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  или TGF $\beta$ . Обозначения на графиках: JEG-3 –клетки трофобласта без и в присутствии цитокинов; NK-92+JEG-3 - клетки в сокультуре без и в присутствии цитокинов. Статистическая значимость различий: \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$

Таким образом, продемонстрировано, что клетки линии NK-92, используемые в качестве модельных клеток естественных киллеров реализуют цитотоксическую активность в отношении стандартных клеток-мишеней линии K-562. Также установлено, что клетки линии NK-92 вызывают гибель клеток трофобласта линии JEG-3 в случае краткосрочной инкубации в течение 4 часов. Было оценено влияние цитокинов на цитотоксическое взаимодействие NK-клеток и трофобласта на примере использования клеточных линий NK-92 и JEG-3 и краткосрочной инкубации. Оценено изолированное влияние цитокинов на жизнеспособность клеток трофобласта линии JEG-3: IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN $\gamma$ , IL-4, TGF- $\beta$ , bFGF повышали их гибель по сравнению с интактными клетками. Затем был оценен вклад цитокинов в гибель клеток трофобласта в присутствии NK-клеток: установлено, что IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-8, TGF- $\beta$ , GM-CSF усиливать гибель клеток трофобласта в присутствии NK-клеток. В присутствии PLGF цитотоксичность NK-клеток в отношении клеток трофобласта была снижена по сравнению с клетками в модели без цитокинов. Кроме того, установлено, что в случае 4-часовой инкубации с КС ворсин хориона I триместра усиливается цитотоксичность NK-клеток в отношении клеток трофобласта по сравнению с нестимулированными NK-клетками. Таким образом, цитокины в случае краткосрочной инкубации стимулируют цитотоксический потенциал NK-клеток в

отношении клеток трофобласта. После инкубации в течение 4 часов в модели, используемой для оценки цитотоксичности НК-клеток, также была проанализирована экспрессия клетками линии NK-92 проапоптотических рецепторов Fas, DR4, DR5, DcR1 и лигандов FasL, TRAIL. Установлено, что в присутствии TNF $\alpha$  повышено количество и интенсивность экспрессии НК-клетками Fas, в то время как в присутствии TGF $\beta$  количество и интенсивность экспрессии рецептора DR5 снижена по сравнению с неактивированными клетками. В присутствии клеток трофобласта экспрессия НК-клетками TRAIL была снижена по сравнению с интактными НК-клетками. Кроме того, отмечено сниженное количество CD107a НК-клеток после взаимодействия с клетками трофобласта. Однако установлено, что интенсивность экспрессии DcR1 НК-клетками была также снижена после инкубации с клетками трофобласта. Установлено, что под влиянием КС ворсин хориона I триместра экспрессия TRAIL клетками линии NK-92 снижена, в присутствии КС III триместра количество НК-клеток, экспрессирующих FasL, повышено. В присутствии КС ворсин хориона и клеток трофобласта снижено количество НК-клеток, экспрессирующих DR4 и DR5, что отражает устойчивость НК-клеток к гибели за счет связывания TRAIL и поддержание их активности на определенном уровне в случае контакта с клетками трофобласта. Более длительная инкубация (в течение 24 часов часов) НК-клеток с цитокинами также приводила к повышению цитотоксичности в стандартной модели с использованием клеток линии K-562. В то же время в модели реализации цитотоксической активности в отношении клеток линии JEG-3 только НК-клетки, предварительно прокультивированные в течение суток с цитокинами IL-18, TNF $\alpha$  или IL-10, демонстрировали повышенную цитотоксичность по сравнению с неактивированными НК-клетками. Были рассмотрены два варианта взаимодействия НК-клеток и клеток трофобласта, включающие взаимодействие посредством секреторных веществ (цитокинов, микровезикул) и контактное рецепторное взаимодействие. Установлено, что для активации каспазы-8 и каспазы-3 в клетках трофобласта необходимо контактное взаимодействие естественных киллеров и клеток трофобласта. Дистантное сокультивирование клеток линий NK-92 и JEG-3 не приводит к активации инициаторной и эффекторной каспаз в клетках линии JEG-3, характерной для картины развития апоптоза. После длительного предварительного культивирования НК-клеток в течение 96 часов с цитокинами, они проявляли повышенную цитотоксичность по сравнению с нестимулированными НК-клетками, только в случае применения IL-18 или TGF $\beta$ . После сокультивирования НК-клеток в присутствии клеток трофобласта в течение 96 часов установлено снижение цитотоксичности НК-клеток. Показано также, что после совместного культивирования в течение 96 часов с клетками трофобласта содержание GrzA, GrzB, перфорины в НК-клетках снижено, в то время как в клетках трофобласта эти белки появляются. Кроме того, экспрессия серпинов B9 в НК-клетках снижена после сокультивирования с клетками



трофобласта. Отмечено, что цитокины IL-15, IL-18, IL-10 вызывали снижение экспрессии серпина В9 клетками трофобласта в монокультуре, в то время как TGF $\beta$  вызывал повышение экспрессии HLA-G клетками трофобласта. В сокультуре клеток трофобласта с НК-клетками TNF $\alpha$  стимулировал экспрессию HLA-G клетками трофобласта.

## ГЛАВА 8. ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ НК-КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОК ТРОФОБЛАСТА ПРИ ПРИВЫЧНОМ НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ

Установлено, что гибель клеток трофобласта линии JEG-3 как в присутствии НК-клеток в составе мононуклеарной фракции (Рисунок 8.1а), так и предварительно изолированных из периферической крови spNK-клеток (Рисунок 8.1б), была повышена по сравнению со спонтанной гибелью клеток линии JEG-3.

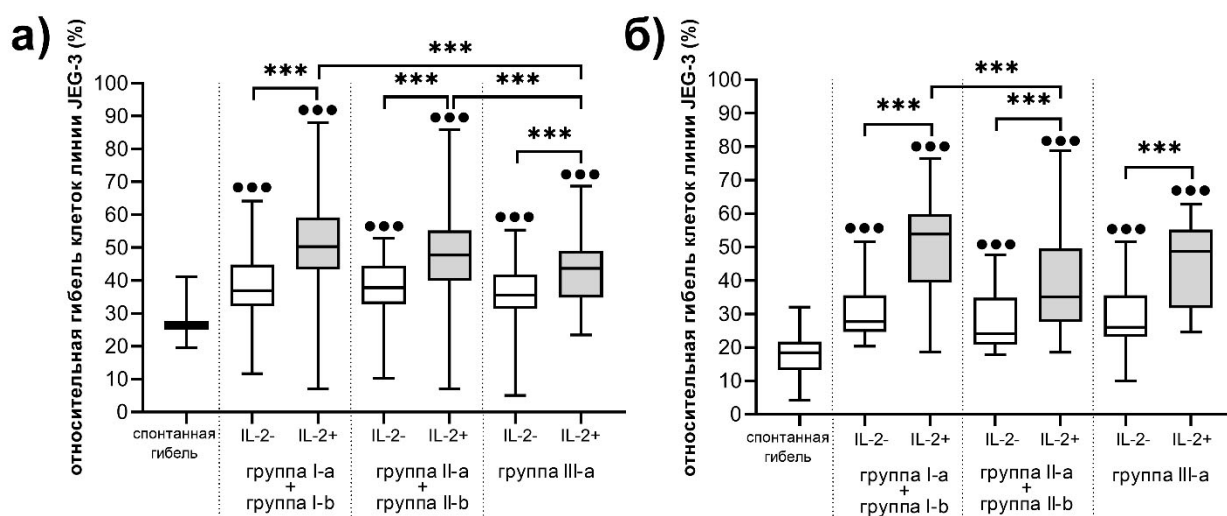


Рисунок 8.1 - Относительная гибель клеток линии JEG-3 после инкубации с предварительно проинкубированными без IL-2 (IL-2 -) и в присутствии IL-2 (IL-2+): а) рNK-клетками в составе мононуклеарной фракции, б) spNK-клетками, изолированными из мононуклеарной фракции. Группа I-a: небеременные женщины в пролиферативной фазе цикла; группа I-b: небеременные женщины в секреторной фазе цикла, группа II-a: небеременные фертильные женщины в пролиферативной фазе цикла; группа II-b: небеременные фертильные женщины в секреторной фазе цикла; группа III-a: женщины с физиологическим течением беременности в I триместре. Статистическая значимость отличия от спонтанной гибели: \*\*\* -  $p < 0,001$ . Статистическая значимость различий между разными вариантами инкубаций: \*\*\* -  $p < 0,001$

Эти изменения отмечены при использовании мононуклеаров и рNK-клеток, предварительно проинкубированных с IL-2, а также без него. После предварительной инкубации мононуклеаров и spNK-клеток в присутствии IL-2 цитотоксический эффект в отношении клеток трофобласта был выше, чем в случае использования мононуклеаров (Рисунок 8.1а) или spNK-

клеток (Рисунок 8.1б), не инкубированных с IL-2. Эти изменения отмечены во всех обследованных группах.

Гибель клеток трофобласта линии JEG-3 в присутствии мононуклеаров периферической крови, полученных от женщин с физиологической беременностью (группа III-a) и предварительно проинкубированных с IL-2, была ниже, чем в случае использования периферической крови небеременных женщин (группа I-a+ группа I-b) и от фертильных женщин (группа II-a+группа II-b) (Рисунок 8.1 а). В то же время изолированные из фракции мононуклеаров и затем проинкубированные с IL-2 spNK-клетки женщин с физиологической беременностью (группа III-a) не демонстрировали отличий в цитотоксической активности от НК-клеток здоровых небеременных женщин: гибель клеток трофобласта линии JEG-3 не различалась (Рисунок 8.1 б). Гибель клеток трофобласта линии JEG-3 была снижена в случае использования spNK-клеток фертильных женщин (группа II-a+группа II-b) по сравнению с показателями для группы небеременных женщин (группа I-a + группа I-b). Различий между активностью spNK-клеток в группах фертильных женщин и женщин с физиологической беременностью не выявлено (Рисунок 8.1 б).

Установлено, что группы здоровых небеременных женщин без акушерского анамнеза в пролиферативной (группа I-a) и секреторной (группа I-b) фазе менструального цикла не отличались по цитотоксическому эффекту НК-клеток в отношении клеток трофобласта линии JEG-3 от группы здоровых мужчин. Отсутствие различий по цитотоксичности pNK-клеток у здоровых небеременных женщин и здоровых мужчин указывает на одинаковое базисное функциональное состояние НК-клеток вне зависимости от пола.

Установлено, что в случае использования НК-клеток, предварительно неинкубированных с IL-2, полученных от здоровых небеременных женщин группы I-a, гибель клеток трофобласта линии JEG-3 была выше, чем в случае использования НК-клеток женщин с физиологической беременностью (группа III-a) и небеременных женщин группы I-b (Рисунок 8.2). При сравнении групп здоровых небеременных фертильных женщин в разных фазах цикла (группы II-a и II-b) и женщин группы III-a обнаруживались сходные различия: показатели группы II-a были выше, чем у группы II-b и группы III-a (Рисунок 8.2). Различий между группами I-b и III-a, а также группами II-b и III-a не выявлено.

Установлено, что гибель клеток трофобласта линии JEG-3 повышена в случае инкубации с мононуклеарами, полученными от небеременных женщин с ПНБ (группа IV-b) по сравнению с группой IV-a женщин с ПНБ (Рисунок 8.2). Кроме того, гибель клеток трофобласта линии JEG-3 также была повышена в случае инкубации с мононуклеарами, полученными от женщин группы IV-b по сравнению с соответствующим показателем для группы II-b (Рисунок 8.2). В случае использования мононуклеаров, полученных от беременных женщин с ПНБ в анамнезе

(группа V) гибель клеток трофобласта была снижена по сравнению с соответствующим показателем для группы IV-b (Рисунок 8.2).

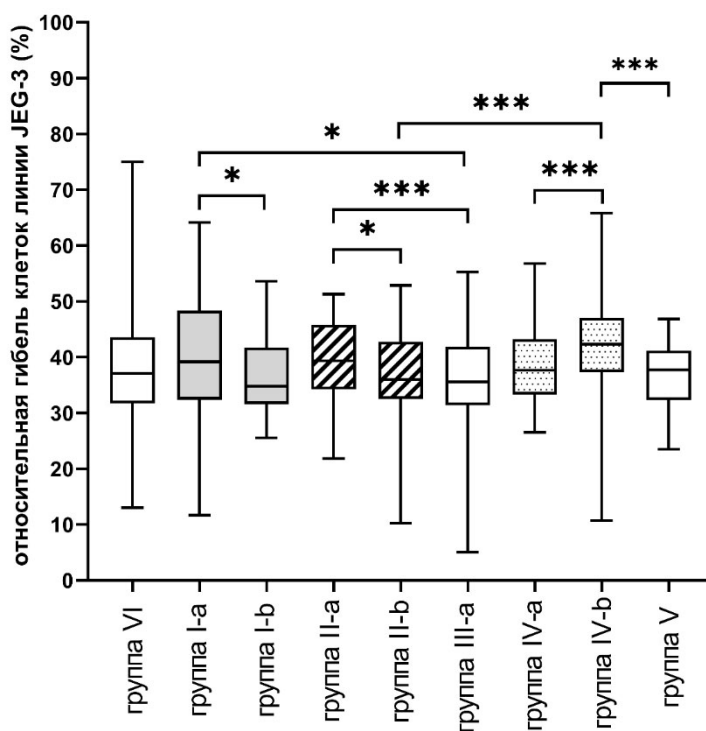


Рисунок 8.2 - Относительная гибель клеток трофобласта линии JEG-3 после инкубации с мононуклеарными фракциями, содержащими NK-клетки, групп здоровых небеременных и беременных женщин и женщин с ПНБ. Группа I-a: небеременные женщины в пролиферативной фазе цикла; группа I-b: небеременные женщины в секреторной фазе цикла, группа II-a: небеременные фертильные женщины в пролиферативной фазе цикла; группа II-b: небеременные фертильные женщины в секреторной фазе цикла; группа III-a: женщины с физиологическим течением беременности в I триместре; группа IV-a: небеременные женщины с ПНБ в пролиферативной фазе цикла; группа IV-b: небеременные женщины с ПНБ в секреторной фазе цикла; группа V: беременные женщины в I триместре с ПНБ в анамнезе; группа VI – здоровые мужчины. Статистическая значимость: \* -  $p < 0,05$ , \*\*\* -  $p < 0,001$

После разделения групп небеременных женщин на подгруппы в зависимости от фазы менструального цикла также было показано, что гибель клеток трофобласта линии JEG-3 в присутствии pNK-клеток в составе мононуклеарной фракции во всех группах была выше в случае предварительной инкубации мононуклеарной фракции с IL-2 по сравнению с клетками, проинкубированными без IL-2 ( $p < 0,001$ ). В присутствии IL-2 гибель клеток трофобласта линии JEG-3 была повышена в случае использования мононуклеаров, полученных от небеременных женщин группы I-a (51,7% {44,2%; 58,4%}) и группы I-b (48,8% {42,7%; 59,8%}), чем у женщин

с физиологической беременностью группы III-a (43,7% {34,8%; 49,0%};  $p < 0,001$ ). Кроме того, при инкубации в присутствии IL-2 НК-клетки в составе мононуклеаров демонстрировали сниженную цитотоксичность в отношении клеток трофобласта линии JEG-3 у беременных женщин группы V (44,4% {37,0%; 50,8%}) по сравнению с соответствующим показателем для группы IV-b (48,6% {39,7%; 53,8%};  $p < 0,05$ ).

Таким образом, цитотоксическую активность рНК-клеток можно оценивать в разработанной модели с использованием клеток трофобласта. Полученные из периферической крови НК-клетки стимулировали гибель клеток трофобласта как в составе мононуклеарной фракции, так и в случае предварительного изолирования из нее. У женщин с физиологической беременностью цитотоксичность НК-клеток в составе мононуклеаров, предварительно прокультивированных с IL-2, была ниже, чем у небеременных женщин, ранее не бывших беременными, и фертильных женщин. В случае spНК-клеток, предварительно проинкубированных с IL-2, установлена их сниженная цитотоксичность в отношении клеток трофобласта у фертильных женщин по сравнению с небеременными женщинами, которые ранее не были беременными. После разделения групп женщин в зависимости от фазы менструального цикла установлено, что у небеременных фертильных женщин цитотоксическая активность НК-клеток в отношении клеток трофобласта снижена в секреторной фазе цикла по сравнению с показателем в пролиферативной фазе цикла. У небеременных женщин с ПНБ цитотоксическая активность рНК-клеток повышена в секреторной фазе по сравнению с пролиферативной фазой цикла, а также по сравнению с соответствующим показателем для группы небеременных фертильных женщин в секреторной фазе цикла.

## Глава 9. ОБСУЖДЕНИЕ

НК-клетки составляют около 70% лейкоцитов децидуальной оболочки в I триместре, снижая свое количество в III триместре [166, 190, 240, 249, 363, 422, 716]. Присутствие этой клеточной популяции в децидуальной оболочке в течение всей беременности указывает на роль НК-клеток в ее физиологическом течении. Показано, что dNK-клетки являются источником цитокинов, в том числе ангиогенных факторов VEGF и PLGF, а также факторов, регулирующих инвазию клеток трофобласта, - IL-8 и IP-10 [130, 267, 303]. Описаны три возможных варианта формирования пула dNK-клеток: пролиферация dNK-клеток эндометрия, дифференцировка стволовых клеток в dNK-клетки и миграция НК-клеток из периферической крови [39, 320, 418, 422, 424, 610, 671].

В экспериментальной модели с использованием линии мышей, у которых отсутствуют НК-клетки, продемонстрировано, что в матке НК-клетки появлялись только у мышей, которым была проведена пересадка спленоцитов от мышей-доноров [162]. В то же время при пересадке трансплантата рога матки от мышей-доноров пул НК-клеток матки у мутантных мышей не формировался [162]. Эта работа указывает на участие в формировании пула НК-клеток матки процесса миграции из лимфоидных органов [162]. В другой работе с использованием мышей напротив, описано, что формирование пула dNK-клеток в начале беременности происходит только в случае трансплантации и последующей миграции в матку гемопоэтических стволовых клеток, в то время как миграция pNK-клеток в матку не установлена [137]. Также продемонстрировано, что pNK-клетки мигрировали в регионарные лимфатические узлы, однако не переходили затем в матку [137]. Показано, что у мыши в поддержание пула dNK-клеток может быть вовлечен процесс их дифференцировки из предшественников НК-клеток, которые могут как мигрировать из периферической крови, так и находиться в матке [137]. В работе D. K. Sojka и соавторов с использованием мышей продемонстрировано, что пул dNK-клеток матки формировался за счет пролиферации тканерезидентных НК-клеток, уже присутствовавших в матке до беременности. Миграция НК-клеток из периферической крови не вносила существенных изменений в формирующийся пул dNK-клеток [609].

В экспериментах с использованием биоматериала человека установлено, что НК-клетки могут мигрировать через монослой эндотелиальных клеток или стромальных клеток под влиянием хемокина Chemerin [116]. Также продемонстрирована секреция этого хемокина стромальными децидуальными клетками и клетками трофобласта [116]. Под влиянием цитокинов IP-10 и I-TAC, секреция которых установлена для децидуальных стромальных клеток, pNK-клетки демонстрировали повышенную экспрессию хемокинового рецептора к IP-10 и I-TAC - CXCR3 и миграцию в системе «трансвелл» по направлению концентрации

цитокинов IP-10 и I-TAC [398]. Показано, что dNK-клетки человека экспрессируют рецепторы к хемокинам CXCL6 и CCL14, которые в свою очередь секретируют клетки эндотелия спиральных артерий [140]. Была предложена гипотеза стадийного формирования пула dNK-клеток: первая стадия совпадает по времени с децидуализацией эндометрия, и включает пролиферацию тканерезидентных NK-клеток, в то время как вторая стадия формирования и поддержания пула dNK-клеток предполагает миграцию NK-клеток из периферической крови [418]. Кроме того, секретируемые клетками децидуальной оболочки вещества также могут участвовать в регуляции формирования пула dNK-клеток. Например, под влиянием гликоделина - гликопротеина, выявляемого в эндометрии и амниотической жидкости, рNK-клетки с фенотипом CD16-CD56<sup>bright</sup> начинали экспрессировать характерные для dNK-клеток поверхностные рецепторы CD9 и CD49d, а также повышать продукцию VEGF [366]. Таким образом, механизм формирования пула dNK-клеток однозначно не определен, на этот процесс могут влиять факторы микроокружения.

В литературе описано, что развитие ПНБ сопряжено с формированием dNK-клетками провоспалительного микроокружения в децидуальной оболочке и нарушением регуляции формирования сосудистой сети плаценты [349, 541]. Продемонстрировано, что в децидуальной оболочке при ПНБ повышено содержание CD56<sup>+</sup> и CD16<sup>+</sup> клеток [502], а в периферической крови повышено содержание NKp30<sup>+</sup> NK-клеток [148] и снижено содержание CD56<sup>bright</sup> NK-клеток [388, 648]. Однако, в литературе отсутствуют данные о моделировании особенностей взаимодействия NK-клеток с клетками микроокружения при ПНБ, в частности с клетками трофобласта.

Клетки трофобласта активно инвазируют в стенку матки при беременности [691]. Существует несколько подходов для изучения интенсивности инвазии клеток трофобласта: с использованием модельных животных, клеток, полученных из эксплантатов плацент, а также клеточных линий, в том числе в 2D-моделях и 3D-моделях (с формированием органоидов из клеток трофобласта), с использованием системы «трансвелл» или метода «заживления раны» [45, 481, 665]. Растворимые факторы, секретируемые клетками матки могут влиять на инвазию клеток трофобласта. Например, под влиянием активина А, секретируемого клетками децидуальной оболочки, клетки трофобласта демонстрировали повышенную экспрессию интегрина  $\beta 1$  и усиление инвазии в матку до 10 недели беременности [81, 776]. Стромальные клетки эндометрия секретируют IL-6, IL-8, IL-17, GM-CSF, MCP-1, под влиянием КС стромальных клеток эндометрия повышалась степень инвазии клеток трофобласта в модельной системе *in vitro* [748]. Кроме того, за счет экспрессируемых рецепторов, а также растворимых факторов, клетки трофобласта могут влиять на формирование пула dNK-клеток. Например, под влиянием хемокина CXCL12, который секретируют клетки трофобласта, повышается

экспрессия dNK-клетками адгезионного рецептора CD29 и их адгезия [405]. В связи с этим, нами был проведен анализ фенотипа клеток трофобласта и его изменений под влиянием растворимых факторов - цитокинов и КС ворсин хориона I и III триместров беременности. На этом этапе применяли стандартное время экспозиции клеток индукторам, составляющее 24 часа.

В dNK-клетках выявлено содержание мРНК VEGF и PLGF [303]. Под влиянием VEGF первичные клетки трофобласта, выделенные из плацент I триместра, демонстрировали усиление образования синцития [158]. По другим данным, VEGF стимулировал миграцию клеток трофобласта *in vitro* [359]. В условиях гипоксии клетки трофобласта характеризовались повышенной секрецией VEGF [358], sVEGFR-1 [471], сниженным содержанием мРНК PLGF и сниженной его секрецией по сравнению с клетками в условиях нормоксии, что может быть расценено как компенсаторная реакция в гипоксических условиях [358, 471]. Кроме того, PLGF продуцируют эндотелиальные клетки, а ингибирование его синтеза не влияет на функциональное состояние эндотелиальных клеток, однако снижает миграционную активность моноцитов [725]. Выявлены мРНК VEGF в эндотелиальных клетках и гладкомышечных клетках [725]. В сокультуре эндотелиальных клеток и клеток трофобласта под влиянием экзогенного PLGF установлена повышенная пролиферация обоих типов клеток как в условиях гипоксии, так и нормоксии. Однако экзогенный PLGF не приводит к повышению экспрессии VEGF и PLGF ни в сокультуре, ни изолированными после совместного культивирования клетками трофобласта [129].

Нами было установлено, что в присутствии ростового фактора VEGF количество клеток трофобласта, экспрессирующих рецептор TGF $\beta$ 2, среди всех клеток трофобласта было выше по сравнению с интактными клетками. Кроме того, нами установлено, что клетки трофобласта линии JEG-3, используемые нами в работе, секретируют TGF $\beta$ , что согласуется с данными литературы [749]. По данным литературы, в эндометрии при беременности присутствуют три изоформы TGF $\beta$ : TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TGF $\beta$ 3 [51]. Кроме того, по данным литературы клетки экстравиллезного и ворсинчатого трофобласта у женщин на ранних сроках беременности экспрессируют TGF $\beta$ 1 [357]. Показано, что TGF $\beta$  снижает экспрессию клетками трофобласта VE-кадгерина, что приводит к подавлению инвазии [134]. Однако, влияние TGF $\beta$  может различаться в зависимости от клетки-мишени, например, показано, что TGF $\beta$ 1 ингибирует инвазию первичных клеток вневорсинчатого трофобласта [354], но стимулируют инвазию и дифференцировку клеток трофобласта линии JEG-3 [290]. Цитокин TGF $\beta$ , воздействуя на клетки трофобласта клеточной линии HTR-8/SVneo и первичные клетки экстравиллезного трофобласта, вызывает активацию канонического пути передачи сигнала с участием SMAD2/3 и SMAD4, а также с участием путей ERK1/2 и PI3K/АКТ [208]. Также показано, что TGF $\beta$  стимулирует экспрессию кисспептина в клетках трофобласта, что приводит к подавлению их инвазивной



активности [208]. Кроме того, под влиянием TGF $\beta$  в клетках трофобласта линии HTR-8/SVneo продемонстрировано повышение экспрессии белка COX-2, повышенное содержание которого подавляет инвазию клеток трофобласта [744]. Таким образом, впервые показанная нами секреция TGF $\beta$  и экспрессия одного из его рецепторов - TGF $\beta$ R2 клетками трофобласта линии JEG-3 указывают на возможность клеток трофобласта регулировать интенсивность инвазии. Так как нами установлено, что экспрессия TGF $\beta$ R2 клетками трофобласта линии JEG-3 была повышена в присутствии VEGF, который в свою очередь могут продуцировать клетки микроокружения в децидуальной оболочке, в том числе dNK-клетки [303, 725], на способность клеток трофобласта к регуляции собственной инвазии влияют клетки микроокружения.

Нами установлено, что в присутствии цитокинов IL-6, IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$  количество клеток трофобласта линии JEG-3, экспрессирующих TGF $\beta$ R2, также было повышено. Отметим, что цитокины IL-6 и IL-1 $\beta$  являются провоспалительными и их концентрации повышены, например, при внутриутробной инфекции [532]. Описана ассоциация риска развития ПНБ с определенными полиморфизмами гена, кодирующего IL-6 [566]. Однако IL-6 и IL-1 $\beta$  также участвуют в физиологических процессах, происходящих после имплантации. Так, клетки трофобласта секретируют IL-6, что способствует трансформации макрофагов в подтип M2 [181]. Описана роль IL-6 и IL-1 $\beta$  в стимуляции инвазии и миграции клеток трофобласта [186, 535]. Продемонстрировано, что IFN $\gamma$  ингибирует пролиферацию и инвазию клеток трофобласта [355]. Однако, по некоторым данным IFN $\gamma$  может снижать вероятность имплантации бластоцисты [553]. В целом, продемонстрированное нами повышение экспрессии TGF $\beta$ R2 клетками трофобласта в присутствии IL-6, IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$  также согласуется с предположением, высказанным выше: TGF $\beta$  является цитокином, влияющим на клетки трофобласта, повышение экспрессии его рецептора клетками трофобласта в присутствии провоспалительных цитокинов указывает на ауторегуляцию клеток трофобласта.

Также нами установлены повышенное количество клеток трофобласта, экспрессирующих TNFR2, и повышенная экспрессия клетками трофобласта рецепторов CD54, CD104 в присутствии ростового фактора VEGF. По данным литературы, TNF $\alpha$  секретируют многие клеточные популяции децидуальной оболочки, в том числе NK-клетки, клетки экстравиллезного и ворсинчатого трофобласта [498]. Иммуногистохимическое исследование срезов плацент показало, что TNFR1 и TNFR2 локализуются на клетках экстравиллезного трофобласта [498]. Под влиянием TNF $\alpha$ , а также комбинации TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  продукция клетками трофобласта MMP2, а также инвазия клеток трофобласта были снижены [498]. Показано, что клетки трофобласта линии HTR-8/SVneo также экспрессируют TNFR1 и под влиянием TNF $\alpha$  дозозависимо повышают секрецию хемокинов CCL2 и CCL5 и инвазивную способность моноцитоподобных клеток линии THP-1 [549]. Повышенная экспрессия мембранной формы

TNFR1 клетками ворсинчатого трофобласта была показана при невынашивании беременности по сравнению со здоровыми беременными женщинами [753]. По данным литературы экспрессия CD54 характерна для клеток эндovasкулярного цитотрофобласта [286]. Нами впервые установлена экспрессия CD54 клетками трофобласта линии JEG-3.

В исследовании, посвященном регуляции функционального состояния трофобласта с участием интегринов показано, что при усилении инвазии клеток трофобласта линии HTR-8/SVneo экспрессия этими клетками интегрин  $\beta 4$  (CD104) была снижена [133]. В регуляции экспрессии этого интегрин задействован ядерный фактор MARVELD1, показано, что в процессе трансмиграции клеток трофобласта линии HTR-8/SVneo его экспрессия находилась на низком уровне [133]. Однако при ингибировании фактора MARVELD1 адгезия клеток трофобласта линии HTR-8/SVneo, а также продукция клетками трофобласта мРНК, кодирующей CD104, были снижены. У мышей, нокаутных по белку MARVELD1 также выявлена сниженная экспрессия CD104 клетками трофобласта и нарушенная структура формирующейся плаценты [133]. Таким образом, повышенная экспрессия TNFR2, CD54 и CD104 клетками трофобласта, установленная нами под влиянием VEGF, отражает регуляцию функционального состояния клеток трофобласта, включающую как процессы взаимодействия с другими клетками, которые могут присутствовать в децидуальной оболочке, так и сам процесс инвазии клеток трофобласта и их трансформации в эндovasкулярный трофобласт.

В настоящем исследовании продемонстрировано, что ростовой фактор PLGF, продукция которого характерна для dNK-клеток [267, 303], усиливал экспрессию CD29 клетками трофобласта линии JEG-3. По данным литературы первичные клетки трофобласта, полученные от приматов, экспрессируют CD29 в присутствии эндотелиальных клеток, причем в случае контактного взаимодействия этих клеточных популяций, экспрессия CD29 клетками трофобласта усиливалась [654]. Также показано, что блокирование функциональных рецепторов CD49a/CD29 в клетках трофобласта линии в HTR-8/SVneo, прокультивированных с клетками эндотелия, вызывало снижение продукции мРНК Galectin-1, а блокирование CD29 снижало продукцию мРНК TIMP-1 [728]. Полученные нами данные дополняют данные литературы и указывают на участие CD29 в регуляции секреторной активности клеток трофобласта.

Нами установлено, что в присутствии IL-4 было повышено количество клеток трофобласта, экспрессирующих рецептор лептина. Описано, что IL-4 присутствует в зоне маточно-плацентарного контакта на протяжении всей беременности и принимает участие в регуляции физиологического развития плаценты, в том числе регулируя провоспалительную реакцию, характерную для I триместра беременности [128]. Лептин представляет собой пептидный гормон жировой ткани. Описано присутствие лептина в зоне маточно-плацентарного контакта, и его плейотропные эффекты [572]. Например, после имплантации лептин продолжает

поддерживать дальнейшую инвазию клеток трофобласта [120], а также стимулирует увеличение количества CD56<sup>bright</sup>NKp46<sup>+</sup> NK-клеток [43]. В ткани хорионкарциномы повышена экспрессия лептина и его рецептора [455]. В строме эндометрия продемонстрирована экспрессия фактора PIBF (Progesterone-induced blocking factor - блокирующий фактор, индуцированный прогестероном) [36]. Показано, что под влиянием PIBF экспрессия клетками трофобласта линии HTR-8/SVneo лептина была снижена, а экспрессия рецептора к лептину повышена [455]. На основании полученных нами данных, можно предположить, что IL-4 стимулирует чувствительность клеток трофобласта к лептину через усиление экспрессии его рецептора. Нельзя также исключать, что установленная экспрессия рецептора лептина является следствием использования в нашей модели линейных клеток трофобласта, так как экспрессия рецептора лептина на срезах плаценты от физиологической беременности I триместра не была выявлена [455]. Однако выборка, на основании которой было сделано заключение об отсутствии экспрессии лептина, была ограничена тремя плацентами [455].

Нами впервые установлено, что в присутствии IL-4 количество клеток трофобласта линии JEG-3 с фенотипом CD54<sup>+</sup> было повышено. Необходимо отметить, что лейкоциты в децидуальной оболочке могут формировать иммунологические синапсы с участием CD54-CD11a лиганд-рецепторного взаимодействия [212]. Так как CD11a является субъединицей адгезионного рецептора LFA-1 лимфоцитов [260], нельзя отрицать возможность образования контакта между иммунными клетками и клетками трофобласта с участием CD54-CD11a. Показано также, что dNK-клетки экспрессируют CD11a [110]. Продемонстрированное нами повышенное количество клеток трофобласта, экспрессирующих CD54 в присутствии IL-4, может отражать активированное состояние клеток трофобласта и готовность к контактному взаимодействию с другими клетками, в том числе с dNK-клетками.

В целом, результаты работы по оценке влияния отдельных цитокинов на экспрессию рецепторов адгезии и экспрессию цитокиновых рецепторов клетками трофобласта показали, что выраженные изменения экспрессии наблюдаются в случае воздействия на клетки трофобласта линии JEG-3 ростовых факторов VEGF и PLGF, а также TGFβ. Выявленные изменения экспрессии, по-видимому, определяют возможность клеток трофобласта, подобно эндотелию, обеспечивать адгезию и диапедез лейкоцитов.

По данным литературы плацента является источником многих цитокинов, в том числе TNFα, IFNγ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-5, IL-10, ростовых факторов VEGF, PDGF, bFGF, PlGF, TGFβ, GM-CSF, TSP-1 и хемокинов IL-8, IP-10, MCP-1, MIG, RANTES [410, 496, 571, 628, 715, 736]. Спектр секретируемых цитокинов и их концентрации изменяются на протяжении беременности [128, 244, 604]. В I триместре по сравнению с III триместром преобладают

цитокины VEGF, PDGF, bFGF, IL-8, IL-6, MMP2, TSP-1, TGF $\beta$  [496, 613]. Эти цитокины стимулируют пролиферацию и миграцию клеток трофобласта и эндотелия, что необходимо для развития плаценты, сопровождающееся инвазией клеток трофобласта в эндометрий и формированием сосудистой сети [127, 316, 442]. Эти цитокины также повышают жизнеспособность клеток маточно-плацентарного комплекса. В течение III триместра беременности характерна большая секреция цитокинов IP-10, MCP-1, RANTES, IFN $\gamma$ , IL-10, IL-4, и меньшая секреция VEGF, PDGF, bFGF, IL-8, IL-6, MMP2, TSP-1, TGF $\beta$  [410, 496, 613, 628], что связывают с завершением процесса формирования плаценты и необходимостью поддержания ее структуры [316, 442].

Для исследования влияния совокупности секреторных продуктов плацент на клетки трофобласта нами были использованы КС ворсин хориона I и III триместров. Ранее в отделе иммунологии ФГБНУ «АГиР им.Д.О.Отта» было установлено, что КС ворсин хориона I и III триместров содержат цитокины IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 [28]. По данным литературы IL-15 и IL-18 являются цитокинами микроокружения децидуальной оболочки и плаценты [192, 247, 364, 579, 658, 661, 686, 699, 705]. В этой работе в КС ворсин хориона дополнительно было проанализировано содержание IL-15 и IL-18, и установлено наличие этих цитокинов как в КС I триместра, так и III триместра, что согласуется с данными литературы.

Нами впервые установлено масштабное влияние КС ворсин хориона на фенотип клеток трофобласта линии JEG-3. Однако, несмотря на изменения продукции цитокинов клетками плаценты от I к III триместру, это не отражалось в однонаправленных изменениях экспрессии рецепторов клетками трофобласта линии JEG-3. Нами установлено, что в присутствии КС ворсин хориона I и III триместров беременности по сравнению со спонтанным уровнем экспрессии повышалось количество клеток трофобласта, экспрессирующих интегрин  $\beta$ 6, и интенсивность его экспрессии, а также интенсивность экспрессии CD106, CD49a, CD95, CD31, CD51/61, CD49e. В целом, полученные результаты указывают на то, что растворимые факторы плаценты I триместра усиливают экспрессию рецепторов клеток трофобласта, регулирующих их адгезию к внеклеточному матриксу. В I триместре эти эффекты способствуют становлению структуры плаценты, в III триместре - стабилизируют ее. Кроме того, установленное нами повышение экспрессии клетками трофобласта CD106 (VCAM-1) и высокая экспрессия CD54 может способствовать адгезии лейкоцитов и их трансмиграции через трофобласт, подобно трансэндотелиальной миграции [248, 362].

В то же время нами установлено, что количество клеток трофобласта, экспрессирующих E-кадгерин и интенсивность его экспрессии были снижены в присутствии КС. Ранее было высказано предположение, что дифференцировка цитотрофобласта во вневорсинчатый трофобласт сопровождается эпителиально-мезенхимным переходом, подобным тому, что

происходит в процессе развития эмбриона [165]. Показано, что в клетках вневорсинчатого трофобласта экспрессия многих генов, в том числе E-кадгерина и окклюдина, была снижена по сравнению с клетками цитотрофобласта, в то время как экспрессия около 30 генов, в том числе кодирующих MMP2, MMP9, виментин, фибронектин, была повышена [165]. Установленное нами снижение экспрессии E-кадгерина, таким образом, согласуется с представлениями о трансформации клеток трофобласта в течение беременности.

Установленное нами снижение экспрессии клетками трофобласта CD104 под влиянием КС III триместра по сравнению с экспрессией без КС можно расценивать как отражение процесса стабилизации структуры плаценты, так как этот рецептор участвует в регуляции инвазии клеток трофобласта [133]. Нами также установлено, что количество и интенсивность экспрессии VE-кадгерина клетками трофобласта линии JEG-3 были повышены в присутствии КС I триместра и снижены в присутствии КС III триместра. Экспрессия VE-кадгерина характерна для эпителиальных клеток [271] и также выявлена на клетках трофобласта [640]. На мышах показано, что нарушение экспрессии клетками трофобласта VE-кадгерина вызывает нарушение эндovasкулярной инвазии клеток трофобласта, что приводит к нарушению развития беременности и гибели плода [640]. Для клеток эндovasкулярного трофобласта характерна экспрессия таких адгезионных рецепторов, как VE-кадгерин, CD31 (PECAM-1), CD106 (VCAM-1), CD49d/CD29 ( $\alpha4\beta1$ ), CD51/61 ( $\alpha v\beta3$ ) [772], CD54 [107]. Таким образом, изменения экспрессии VE-кадгерина, а также CD106, CD31, CD51/CD61 под влиянием КС ворсин хориона I триместра указывают на участие растворимых факторов плаценты в регуляции инвазии клеток трофобласта и замещении ими эндотелиальных клеток в спиральных артериях матки. Нарушение этой регуляции может приводить к неадекватной инвазии клеток трофобласта в стенку матки и способствовать невынашиванию беременности.

Так как физиологическое течение беременности сопровождается изменением содержания НК-клеток в децидуальной оболочке [166, 240, 363] нами был оценен эффект КС ворсин хориона на НК-клетки, в том числе на их фенотип, а также функции адгезии и трансмиграции. Также как в случае работы с клетками трофобласта, на этом этапе работы применяли стандартное время инкубации клеток с индукторами, составляющее 24 часа. Нами впервые установлено, что КС ворсин хориона влияли не только на фенотип клеток трофобласта, но также изменяли экспрессию поверхностных рецепторов НК-клетками. В присутствии КС ворсин хориона I триместра было повышено количество НК-клеток с фенотипом KIR2DL3+, CD29+, и CD119+, а также интенсивность экспрессии НК-клетками CD11a, CD29, CD49d, CD58 и снижена экспрессия CD184. В присутствии КС ворсин хориона III триместра беременности количество НК-клеток с фенотипом KIR2DL3+, CD119+, CD29+ и CD49d+, а также интенсивность

экспрессии NK-клетками CD49d, CD11a, CD29, CD58 были повышены, а интенсивность экспрессии CD47, CD184 и CD54 снижена по сравнению со спонтанным уровнем.

Рецепторы CD49d, CD11a, CD29 регулируют адгезию лимфоцитов, в том числе и NK-клеток к эндотелию [219, 710]. Описана ассоциация высокой экспрессии CD11a и повышенной цитотоксической активности NK-клеток [667], что, вероятно, связано с участием LFA-1 в стабилизации иммунологического синапса [700]. Адгезионный рецептор CD58 также участвует в образовании и стабилизации иммунологического синапса, но со стороны клетки-мишени [765]. Так как по нашим данным под влиянием КС ворсин хориона возрастает экспрессия адгезионных рецепторов CD11a, CD29, CD49, CD58, можно заключить, что растворимые факторы, секретируемые клетками плаценты, повышают адгезионный потенциал NK-клеток и их способность к реализации функционального статуса. Повышение экспрессии NK-клетками CD58 указывает на возможный механизм обратной связи, который способствует элиминации части NK-клеток в случае избыточной активации. Установленное в настоящей работе повышение экспрессии адгезионных рецепторов клеток трофобласта в совокупности с данными об экспрессии рецепторов адгезии NK-клеток (CD11a/CD18 (NK) \ CD54 (JEG-3); CD49d/CD29 (NK) \ CD106 (JEG-3); CD31 (NK) \ CD31 (JEG-3)) позволяют предположить, что по аналогии с процессом трансэндотелиальной миграции возможна адгезия и трансмиграция NK-клеток через клетки трофобласта. Установленное нами повышение под влиянием КС ворсин хориона количества NK-клеток, экспрессирующих рецепторы к цитокинам (CD119 и CD184), а также ингибиторный рецептор KIR2DL3, указывает на их способность связывать хемокины и HLA-C, экспрессируемые клетками трофобласта, а также на снижение цитотоксичности NK-клеток [215, 442, 587].

В литературе описана инвазия клеток трофобласта в стенки спиральных артерий матки [315]. Показано, что клетки вневорсинчатого трофобласта также инвазируют в венозные сосуды децидуальной оболочки, а также в лимфатические сосуды [717]. С 5 по 8 недели беременности, показано, что клетки экстравиллезного трофобласта инвазируют в децидуальные вены [275], после 8 недели до 12 недели беременности клетки трофобласта встраиваются в стенки спиральных артерий [275]. Затем процесс инвазии трофобласта продолжается наряду с инвазией в эндотелиальную выстилку спиральных артерий, а также в лимфатические сосуды децидуальной оболочки [275]. В связи с установленными в настоящей работе изменениями экспрессии клетками трофобласта и NK-клетками адгезионных рецепторов, а также с описанной в литературе масштабной инвазией клеток трофобласта в сосуды децидуальной оболочки, возможна адгезия и миграция NK-клеток в децидуальную оболочку через клетки трофобласта.

Нами была проанализирована функция адгезии и трансмиграции NK-клеток к клеткам трофобласта *in vitro*, под влиянием отдельных цитокинов, а также КС ворсин хориона.

Использованная нами модель оценки функции адгезии успешно применялась ранее для изучения взаимодействия лейкоцитов с эндотелиальными клетками [287, 528, 682]. Установлено, что НК-клетки лучше адгезировали к трофобласту, предварительно обработанному РМА, а также в присутствии TNF $\alpha$ . По данным литературы, РМА вызывает активацию в клетках протеин-киназы C, которая затем стимулирует фосфорилирование STAT4. В результате в НК-клетках происходит инициация транскрипции генов, кодирующих цитокины IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  [314]. В свою очередь IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  усиливают адгезию и затем трансмиграцию лимфоцитов через эндотелий [299]. В связи с этим можно предположить, что усиление адгезии НК-клеток в трофобласту в присутствии провоспалительных факторов соответствует формированию НК-клетками цитотоксического иммунологического синапса и отражает звено патогенетического процесса, способствующего гибели клеток трофобласта и развитию ПНБ.

В настоящей работе с помощью лазерной сканирующей микроскопии удалось показать, что клетки линии НК-92 располагаются внутри слоя клеток трофобласта линии JEG-3. Однако при исследовании функции трансмиграции НК-клеток через монослой клеток трофобласта нами не было выявлено достоверных изменений в присутствии отдельных цитокинов, в том числе TNF $\alpha$ , в системе: количество клеток линии НК-92, мигрировавших через клетки трофобласта линии JEG-3 не отличалось от миграции в отсутствие цитокинов. Анализ фенотипа клеток линии НК-92, которые мигрировали в нижнюю камеру «трансвелла» через монослой клеток трофобласта, показал повышение экспрессии НК-клетками субъединицы адгезионного рецептора LFA-1 - CD11a. Экспрессия других адгезионных рецепторов - CD11b, CD11c, CD18 не изменялась после миграции НК-клеток в нижнюю камеру. Результаты указывают на то, что для преодоления трофобластического барьера НК-клетки задействуют рецептор LFA-1, который используют лейкоциты для трансэндотелиальной миграции [274, 427].

Необходимо отметить, что по данным литературы блокирование отдельных субъединиц адгезионных рецепторов CD11a, CD11b или CD11c не оказывало сильного влияния на адгезию НК-клеток, в то время как блокирование всех трех субъединиц CD11 подавляло их адгезию к клеткам-мишеням [657]. Блокирование CD18 также вызывало подавление адгезии НК-клеток к клеткам-мишеням [657]. Нами была продемонстрирована повышенная экспрессия CD11a после миграции в нижнюю камеру «трансвелла» в случае воздействия на НК-клетки всех цитокинов, использованных в работе (bFGF, IL-10, IL-8, SDF-1, TGF $\beta$ , IL-15, IL-18, IFN $\gamma$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IL-4, IL-1 $\beta$ ). В то же время повышение количества НК-клеток, мигрировавших в нижнюю камеру и экспрессирующих рецепторы CD11b и CD11c, были отмечены только в случае цитокинов bFGF, IL-8 (установлено для CD11b и CD11c), IL-15 или IL-18 (установлено только в отношении CD11b). Повышенная экспрессия CD18 была установлена для НК-клеток в нижней камере «трансвелла» в случае воздействия на НК-клетки цитокинов bFGF, IL-10, IL-8, а также SDF-1

или TGF $\beta$ . Установленные различия позволяют говорить об индивидуальных изменениях экспрессии субъединиц рецепторов адгезии NK-клетками в случае взаимодействия с клетками трофобласта и активации отдельными цитокинами.

Отметим, что для NK-клеток характерна экспрессия адгезионного рецептора LFA-1, состоящего из субъединиц CD11a и CD18 [667]. Изменение конформации LFA-1, способствующее формированию более прочной адгезионной связи, а также повышение интенсивности экспрессии, наблюдается вскоре после связывания (10 минут) активационных рецепторов NK-клетки - NKG2D и 2B4 [667]. Адгезионная молекула LFA-1 принимает участие в формировании иммунологического синапса NK-клетки с клеткой-мишенью, таким образом участвуя в реализации цитотоксической активности NK-клеток [667, 687, 700]. На дегрануляцию NK-клеток также влияет жесткость мембраны клетки-мишени. *In vitro* с использованием синтетических сфер, схожих по размерам с клетками, а также обладающих различной жесткостью и покрытых антителами, связывающими рецепторы NK-клеток NKp30 и LFA-1, показано, что жесткие сферы вызывали дегрануляцию NK-клеток более эффективно [222]. Кроме того, более жесткие сферы вызывали секрецию NK-клетками IFN $\gamma$ , а также GrzA, GrzB, гранулизина [222]. Отмеченные изменения связаны с эффективностью формирования иммунологического синапса, в том числе с поляризацией ЦОМТ, и непосредственным участием LFA-1 в стабилизации синапса [222]. Разные популяции NK-клеток обладают различной способностью к формированию активной конформации LFA-1: после связывания 2B4 NK-клетки с фенотипом CD56<sup>dim</sup> CD57<sup>+</sup> эффективнее, чем CD56<sup>bright</sup> NK-клетки, формируют такие комплексы [667]. Соответственно, в случае рассмотрения в настоящей работе не отдельных субъединиц, а функциональных рецепторов (CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD11c/CD18) можно выделить следующий эффект: экспрессию NK-клетками адгезионных рецепторов LFA-1 в случае миграции через трофобластический барьер повышают цитокины bFGF, IL-10, IL-8, SDF-1, а также TGF $\beta$ . Учитывая вовлеченность LFA-1 в реализацию цитотоксической активности NK-клетками можно предположить усиление готовности NK-клеток, подвергшимся воздействию цитокинов bFGF, IL-10, IL-8, SDF-1, а также TGF $\beta$ , к образованию контактов с клетками-мишенями. Далее в работе оценена цитотоксическая активность клеток линии NK-92 в отношении клеток трофобласта в присутствии цитокинов, и установлено, что в присутствии bFGF, IL-8, IL-10 или TGF $\beta$  гибель клеток трофобласта была повышена. Эти результаты подкрепляют предположение, что экспрессия CD11a/CD18 связана не только с адгезией NK-клеток при миграции, но и с их цитотоксической активностью.

В литературе описано, что экспрессия адгезионных рецепторов CD11b NK-клетками связана со стадиями их дифференцировки у мыши [136] и у человека [224]. У мыши дифференцировка NK-клеток сопровождается приобретением сначала рецептора CD27, затем



CD11b [136]. У человека более 95% pNK-клеток обладают фенотипом зрелых клеток - CD11b+CD27-, в то время как dNK-клетки представляют гетерогенную популяцию, 60% которой составляют незрелые NK-клетки с фенотипом CD11b+CD27+ [224]. Показано, что CD11b+CD27+ NK-клетки способны к секреции цитокинов IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ , а CD11b+CD27- NK-клетки характеризуются высокой цитотоксической активностью [224]. Показано, что количество CD11b+CD27- pNK-клеток было повышено у пациенток с антифосфолипидным синдромом, манифестировавшим при беременности [766]. Продемонстрировано наличие положительной корреляционной связи между количеством клеток с фенотипом CD11b+CD27+ в популяции CD3-CD16+CD56<sup>dim</sup> pNK-клеток и содержанием в сыворотке крови антител IgG и IgA к  $\beta$ 2-гликопротеину [766]. Как описано выше, нами установлено, что количество CD11b+ NK-клеток было повышено в нижней камере «трансвелла» после миграции NK-клеток через трофобластический барьер под влиянием цитокинов bFGF, IL-8, IL-15 или IL-18. Также была отмечена повышенная интенсивность экспрессии CD11b NK-клетками до миграции в присутствии SDF-1 или TNF $\alpha$  по сравнению с интенсивностью экспрессии в отсутствии индукторов. В целом, установленные изменения могут быть связаны как с инициацией дифференцировки NK-клеток в процессе их контакта с клетками трофобласта, так и с тем, что клетки трофобласта осуществляют селективное взаимодействие с отдельными популяциями NK-клеток, определяя возможность их трансмиграции.

Полученные нами результаты по экспрессии CD11/CD18 в процессе трансмиграции клеток линии NK-92 через клетки трофобласта линии JEG-3 в присутствии цитокинов указывают на обеспечение клетками трофобласта базового уровня миграции NK-клеток. Отдельные цитокины изменяют экспрессию адгезионных рецепторов NK-клетками, однако более выраженные изменения барьерной функции трофобласта возможны в присутствии множества цитокинов, продуцируемых различными клетками зоны маточно-плацентарного контакта. Нами установлено, что в присутствии КС ворсин хориона I и III триместров функция адгезии NK-клеток к клеткам трофобласта снижена по сравнению с уровнем базовой адгезии к клеткам трофобласта. Сниженная адгезия NK-клеток в присутствии КС может являться следствием быстрой инвазии NK-клеток в монослой клеток трофобласта, что косвенно подтверждается изображениями NK-клеток, погруженных в монослой клеток трофобласта, полученными нами с помощью лазерной сканирующей микроскопии.

Нами установлено, что в присутствии КС ворсин хориона I триместра по сравнению КС ворсин хориона III триместра беременности функция трансмиграции NK-клеток через клетки трофобласта повышена. Полученные данные согласуются с данными литературы о повышенном количестве NK-клеток в децидуальной оболочке в I триместре и снижении их количества в III триместре [240]. Так, например, показано, что клетки трофобласта секретируют различные

хемокины, в том числе CXCL12, в ответ на КС клеток трофобласта был отмечен повышенный хемотаксис всей популяции рNK-клеток, а также рNK-клеток, экспрессирующих на своей мембране хемкиновый рецептор CXCR4 [648]. Кроме того, в I триместре беременности количество NK-клеток в норме повышено, в особенности вблизи сосудов децидуальной оболочки в период с 9 по 13 неделю беременности [190]. В то же время повышенное количество dNK-клеток в III триместре беременности и повышенная продукция ими  $IFN\gamma$ , GrzB и перфорина были ассоциированы с развитием преэклампсии [190]. В связи с этим отсутствие изменений в трансмиграции NK-клеток через трофобластический барьер под влиянием КС III триместра, установленное нами, отражает физиологическую ситуацию.

В целом, полученные результаты позволяют резюмировать, что клетки трофобласта экспрессируют цитокиновые рецепторы  $TGF\beta R2$ , а также секретируют  $TGF\beta$ , что позволяет клеткам осуществлять ауторегуляцию (Рисунок 9.1).

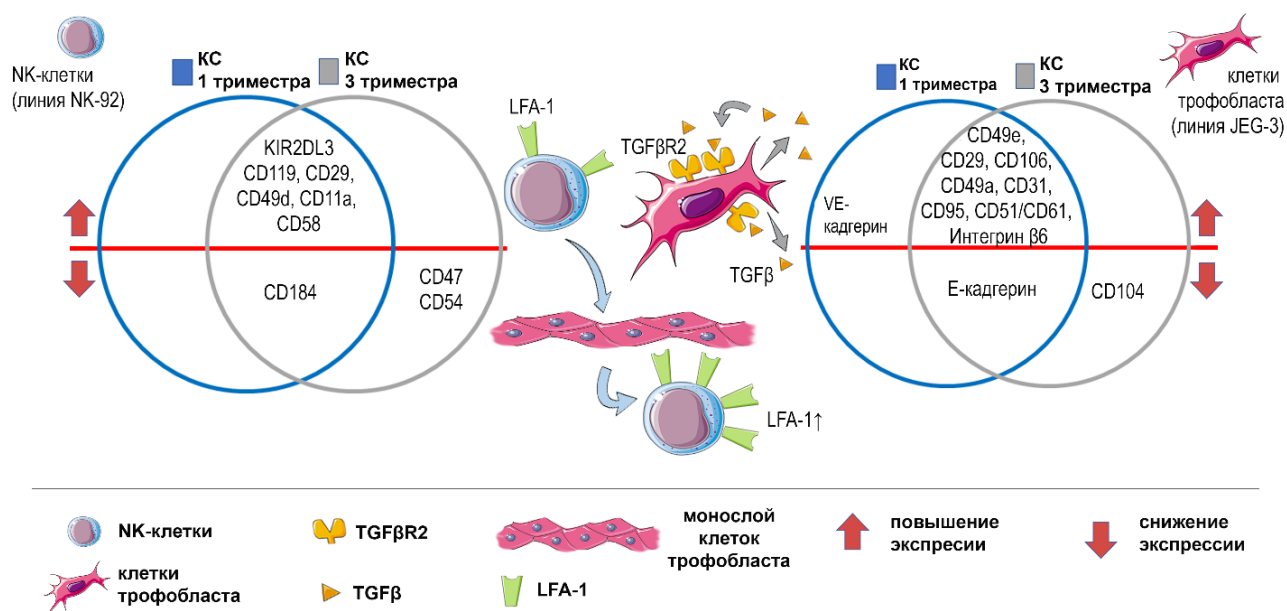


Рисунок 9.1 – Схема влияния клеток трофобласта линии JEG-3 на фенотип и трансмиграцию естественных киллеров линии NK-92

Под влиянием секретируемых клетками маточно-плацентарного комплекса цитокинами клетки трофобласта изменяют экспрессию адгезионных рецепторов CD29, CD104, интегрин  $\beta 6$ , VE-кадгерина, E-кадгерина, CD106 (VCAM-1), CD31, CD51/CD61, что может способствовать инвазии клеток трофобласта, их встраиванию в сосуды децидуальной оболочки и участию в регуляции диапедеза лейкоцитов в матку. Продемонстрировано, что NK-клетки изменяют экспрессию адгезионных рецепторов CD11a, CD29, CD49, CD58, а также рецепторов к цитокинам и хемокинам под влиянием растворимых факторов, секретируемых клетками

маточно-плацентарного комплекса. Зарегистрированная экспрессия адгезионных рецепторов и их лигандов НК-клетками и клетками трофобласта позволяют говорить о возможной миграции НК-клеток в децидуальную оболочку через клетки трофобласта. Отмеченное повышение экспрессии НК-клетками CD58, который связывает CD2 НК-клеток, отражает возможность ауторегуляции НК-клеток для предотвращения избыточной активации. Указанные результаты согласуются с установленной нами повышенной функцией трансмиграции НК-клеток через клетки трофобласта в присутствии КС ворсин хориона I триместра, а также данными литературы о повышении количества НК-клеток в децидуальной оболочке в I триместре беременности [166, 240, 249, 363, 422, 716]. Установленная в работе сниженная функция адгезии НК-клеток в присутствии КС может быть результатом быстрой инвазии НК-клеток в монослой клеток трофобласта, что косвенно подтверждается полученными изображениями с помощью лазерной сканирующей микроскопии. Изменения экспрессии адгезионных рецепторов CD11a-c/CD18 НК-клетками в процессе трансмиграции неоднозначны. Принимая во внимание, что в литературе описаны изменения аффинности взаимодействия с адгезионными рецепторами НК-клеток в зависимости от сопутствующего связывания активационных рецепторов [667], а также участие отдельных рецепторов адгезии в процессе дифференцировки НК-клеток [224], необходимо было оценить изменения спектра рецепторов НК-клеток, связанных с их созреванием, в присутствии клеток трофобласта, что явилось предметом дальнейшего рассмотрения.

На втором этапе работы мы увеличили время экспозиции естественных киллеров клеткам трофобласта до 96 часов для оценки параметров дифференцировки НК-клеток. Нами впервые установлено, что клетки линии NK-92 экспрессируют рецепторы CD56, CD161, CD117, CD57, CD62L, рецепторы к цитокинам CD122 (IL-2R $\beta$ ), CD215 (IL-15R $\alpha$ ), CD127 (IL-7R $\alpha$ ), активационные рецепторы цитотоксической активности NKp30, NKp44, NKG2D, NKG2C, KIR2DL4, KIR2DS4, ингибиторные рецепторы цитотоксичности NKG2A, KIR2DL1, KIR2DL3, KIR3DL1. Полученные результаты дополняют данные литературы об экспрессии поверхностных рецепторов рНК-клетками, dНК-клетками, eНК-клетками, клетками линии NK-92 (Таблица 10.1).

Таблица 10.1 - Экспрессия поверхностных рецепторов рNK-, dNK-, eNK-клетками, а также клетками линии NK-92 в условиях моно- и сокультивирования с клетками линии JEG-3

	Популяции NK-клеток					
	pNK	dNK	eNK	pNK+DSC	NK-92	NK-92 + JEG-3 {н.д.}
<b>NKG2A</b>	+ (<dNK) [348]+ (<eNK) [215]	+ (>pNK) [348] + [293, 586, 726]	+ (>pNK) [215]		+ [762] + {н.д.}	+(>NK-92)
<b>NKG2C</b>	+ [215, 348]	+ [348]	+ [215]		+ {н.д.}	+ (>NK-92)
<b>NKG2D</b>	+(>dNK) [644]	+ [267] +(<pNK) [644]	+ [426]	+ (<pNK) [161]	+ [762] + {н.д.}	+ (>NK-92)
<b>NKp30</b>	+ [426] +(>dNK) [644]	+ [267] +(<pNK) [644]	- [426]	+ (<pNK) [161]	+ [351] + {н.д.}	+ (<NK-92)
<b>NKp44</b>	- [426] +(<dNK) [597, 644]	+ [267] +(>pNK) [597, 644]	- [426]	+ (<pNK) [161]	+ {н.д.}	+ (>NK-92)
<b>NKp46</b>	+ [161] +(>dNK) [644]	+ [267] +(<pNK) [644]	+ [426]	+ [161]	+ [351]	
<b>KIR2DL1</b>	+/- [319, 586, 726] +(<eNK) [215] + [215] + (<dNK) [319]	+/- [319, 586, 726] + [739] + (>pNK) [319]	+ (>pNK) [215]		+ [635] + {н.д.} - [333]	+ (>NK-92)
<b>KIR2DL2</b>	+ (<eNK) [215]		+ (>pNK) [215]			
<b>KIR2DL3</b>	+ (<eNK) [215]	+ [586, 726]	+ (>pNK) [215]		+ [635] + {н.д.} - [333]	+ (>NK-92)
<b>KIR2DS2</b>	+ (<eNK) [215]		+ (>pNK) [215]			
<b>KIR2DS4</b>	+ [319]	+ [319]			+ [635] + {н.д.}	+ (>NK-92)
<b>KIR2DS1</b>	+ [215] + (<dNK) [319]	+ (>pNK) [319]	+ [215]			
<b>KIR3DL1</b>	+ [215]	+ [586, 726, 739]	+ [215]		+ [635] + {н.д.} - [333]	+ (>NK-92)
<b>KIR2DL4</b>	+ [251, 374]	+ [251] + (>pNK) [374]			+ [396, 537] + {н.д.}	+ (>NK-92)
<b>CD62L</b>	+ (для CD56 <sup>bright</sup> pNK) [366]				+ {н.д.}	+ (>NK-92)
<b>CD161</b>	+ [197]	+ [197]			+ {н.д.}	+ (>NK-92)
<b>CD117</b>		+ [422]			+ {н.д.}	+ (>NK-92)
<b>CD57</b>					+ {н.д.}	+ (>NK-92)
<b>CD215</b>		+ [686]			+ [762] + {н.д.}	+ (>NK-92)
<b>CD122</b>					+ [762] + {н.д.}	+ (>NK-92)
<b>CD127</b>	+ (for CD56 <sup>bright</sup> NK)[59]	+ (dNK мыши) [758]			+ {н.д.}	+ (>NK-92)

Обозначения в таблице: (+/-) - противоречивые данные; (<dNK) - экспрессия меньше, чем у dNK; (>dNK) - экспрессия больше, чем у dNK; (<pNK) - экспрессия меньше, чем у pNK; (>pNK) - экспрессия больше, чем у pNK; (<eNK) - экспрессия меньше, чем у eNK; (<NK-92) - экспрессия меньше, чем у NK-92; (>NK-92) - экспрессия больше чем у NK-92; {н.д.} - данные, полученные в настоящей работе; DSC - decidual stromal cells.

Культивирование клеток линии NK-92 с клетками трофобласта линии JEG-3 способствует значительному изменению экспрессии NKG2A, NKp30, NKp44, KIR2DL1, KIR2DL3, KIR2DL4, CD117, CD215, CD127, приближая их к фенотипу dNK-клетками (Таблица 10.1). Отметим, что dNK-клетки экспрессируют NKG2D, однако в меньшей степени, чем pNK-клетки [644]. Нами установлено, что экспрессия NKG2D клетками линии NK-92 возрастала только в случае сокультивирования с клетками трофобласта без IL-2. Таким образом, выявленные нами изменения экспрессии как ингибиторных рецепторов, так и ряда активационных рецепторов клетками линии NK-92 в присутствии клеток линии JEG-3 свидетельствуют об общей активации NK-клеток клетками трофобласта и указывают на активные взаимодействия клеточных популяций.

С помощью статистического метода анализа связи признаков нами была проанализирована интенсивность экспрессии поверхностных белков NK-клеток и выявлено три кластера рецепторов. В один из кластеров входят рецепторы CD56, CD117 и NKG2A NK-клеток. Также была установлена положительная корреляционная связь как при монокультивировании NK-клеток, так и при сокультивировании с клетками линии JEG-3. По данным литературы *in vitro* в присутствии SCF, FLT3-L, IL-7, IL-15, IL-21 стволовые клетки образуют промежуточную популяцию с фенотипом CD56+CD117-/+CD94/NKG2A + [164]. Анализ клеточного состава децидуальной оболочки показал наличие клеток с фенотипом CD56+ CD117+ CD127+ CD94/NKG2A-, которые определяют как ILC3 [293, 510]. Нами выявлено общее повышение экспрессии рецепторов данного кластера в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3. Таким образом, сокультивирование с клетками трофобласта линии JEG-3 способствует изменению экспрессии рецепторов NK-клеток, частично сближая их с фенотипом ILC3.

К второму выявленному нами кластеру относятся рецепторы CD122, NKG2C, KIR2DL4, NKG2D, NKp44 и CD161. По данным литературы при культивировании CD34+ клеток *in vitro* в присутствии SCF, IL-3, IL-7, IL-15, FLT-3L образуются CD56+ CD161+ NKp44+ клетки, затем приобретающие рецепторы NKp30, NKp46, NKG2A, NKG2D [259]. Связывание рецепторов NKG2D и NKG2C с лигандами MICA и HLA-E приводит к модулированию функций NK-клеток [402]. Рецептор KIR2DL4, связывая HLA-G, ингибирует активность NK-клеток [401, 402]. Таким образом, к данному кластеру относятся рецепторы, связанные с приобретением NK-клетками функциональных свойств.

К третьему кластеру относятся KIR-рецепторы (KIR2DL3, KIR3DL1, KIR2DL1, KIR2DS4), рецептор CD57, а также рецепторы к IL-7 (CD127) и к IL-15 (CD215). Также нами выявлены положительные корреляционные связи изменения количества NK-клеток, экспрессирующих CD57 и CD127, а также CD57 и KIR2DL1, CD127 и KIR2DL1, CD127 и KIR2DL4, NKG2C и CD122, в условиях совместного культивирования с клетками трофобласта.

Совместная экспрессия маркера терминальных стадий дифференцировки CD57 и рецептора CD127 (маркера ILC) [47, 568], свидетельствует о возможности NK-клеток приобретать ILC-подобный фенотип в присутствии клеток трофобласта.

Таким образом, рецепторы клеток линии NK-92 могут быть разделены на кластеры, отражающие потенциал NK-клеток в случае совместного культивирования с клетками трофобласта приобретать ILC-подобный фенотип, а также выделяющие основные функциональные рецепторы, изменение которых происходит при сокультивировании. В связи с разнообразием характеристик dNK-клеток и популяций ILC, присутствующих в матке [669], а также с возможностью перехода ILC в dNK-клетки [463], можно расценивать эффект клеток трофобласта на NK-клетки в использованной модельной системе, как модулирующий трансформацию в сторону dNK-клеток. Однако для более однозначного определения, трансформируются ли NK-клетки в децидуальные под влиянием трофобласта, необходимо рассмотреть экспрессию транскрипционных факторов в используемой модельной системе, что будет описано ниже.

В регуляции дифференцировки NK-клеток и их функций участвуют цитокины IL-15 и IL-18 [82, 151, 198, 660, 723, 751]. Например, IL-15 стимулирует дифференцировку и жизнеспособность NK-клеток, усиливая их пролиферацию и способствуя сохранению уровня антиапоптотического белка Bcl-2 [82, 151]. IL-18 вызывает повышение экспрессии NK-клетками IL-2R $\alpha$  (CD25) [373, 484], а также снижает экспрессию рецептора CD16 [484], усиливает продукцию IFN $\gamma$  и цитотоксическую активность [660], а также вызывает повышение экспрессии Bcl-2 и Bcl-XL [198]. Как описано выше, нами было установлено, что после миграции в нижнюю камеру «трансвелла», содержащую среду с IL-15 или IL-18, возрастает количество NK-клеток с фенотипом CD11b<sup>+</sup> и CD18<sup>+</sup>. Также нами установлено содержание этих цитокинов в КС ворсин хориона I и III триместров беременности. Так как экспрессия CD11b связана со степенью зрелости NK-клеток [136, 224], для моделирования взаимодействий, которые могут протекать *in vivo*, нами оценено влияние цитокинов IL-15 и IL-18 на сокультуру NK-клетки и клеток трофобласта.

В случае сокультивирования NK-клеток и клеток линии JEG-3 IL-15 не изменял тенденции сближения фенотипа NK-клеток с фенотипом dNK-клеток. Нами установлен иммуномодулирующий эффект IL-15 на систему сокультивирования NK-клеток и клеток трофобласта: выявлено повышение количества NKG2D<sup>+</sup> NK-клеток и уменьшение количества KIR2DS4<sup>+</sup> NK-клеток в условиях культивирования с IL-15 и клетками трофобласта по сравнению с количеством этих клеток после культивирования только с клетками трофобласта. Также нами продемонстрировано, что IL-15 вызывал повышение интенсивности экспрессии NK-клетками CD127 в присутствии клеток линии JEG-3 и IL-2. Рецептор CD127 является

фенотипическим маркером дифференцировки NK-клеток, исчезающим на поздних стадиях созревания [47, 568]. Другие популяции ILC в отличие от NK-клеток сохраняют CD127 [96, 550, 735]. Таким образом, IL-15 модулирует экспрессию некоторых активирующих и ингибирующих рецепторов NK-клетками наряду с рецептором, характерным для ILC.

В системе сокультивирования IL-18 также не изменял характера влияния клеток трофобласта на NK-клетки. Иммуномодулирующий эффект IL-18 на систему сокультивирования NK-клеток и клеток трофобласта выражался в повышении количества NKp44+ NK-клеток. По данным литературы экспрессия NKp44 установлена для dNK-клеток I [597] и III триместра беременности [644]. IL-18 присутствует в цитокиновом микроокружении dNK-клеток [364, 579, 658, 699, 705]. Изменения экспрессии NKp44 NK-клетками можно расценивать как один из способов регуляции функции dNK-клеток. Кроме того, рецептор NKp44 характерен как для NK-клеток, так и для других популяций ILC [602]. В децидуальной оболочке присутствуют различные популяции ILC [456, 669, 672, 735], в связи с чем нельзя исключать возможности приобретения NK-клетками ILC-подобного фенотипа под действием цитокинов IL-15 и IL-18. Однако, нами не было выявлено изменений содержания в NK-клетках мРНК гена *NCAMI*, кодирующего фенотипический маркер CD56, в условиях монокультуры в присутствии IL-15 и IL-18. Вероятно, для изменений экспрессии генов NK-клетками требуется не только стимул со стороны цитокинов IL-15 и IL-18, но и дополнительные контакты с фидерными клетками, моделирующими клеточное микроокружение в ткани и присутствие цитокинов, характерных для зоны маточно-плацентарного контакта. Одним из таких цитокинов является TGF $\beta$ . Предполагают, что под влиянием TGF $\beta$ , NK-клетки могут последовательно приобретать свойства ILC1 и ILC3 [157].

По данным литературы клетки экстравиллезного трофобласта продуцируют TNF $\alpha$  и его рецепторы [498], а также TGF $\beta$  [534]. Нами также показано, что клетки линии JEG-3 также секретируют TGF $\beta$  и экспрессируют рецепторы к TNF $\alpha$ , что согласуется с данными литературы [265]. Кроме клеток трофобласта источником TGF $\beta$  могут быть и другие клетки микроокружения в матке. Например, под влиянием кондиционированных сред клеток трофобласта моноциты периферической крови дифференцируются в макрофаги, сходные по характеристикам с макрофагами децидуальной оболочки и продуцируют TGF $\beta$  [55]. За счет секреции TGF $\beta$  децидуальные макрофаги могут ингибировать цитотоксическую активность dNK-клеток [146]. TGF $\beta$  стимулирует приобретение pNK-клетками характеристик, характерных для dNK-клеток [637], а также влияет на функции естественных киллеров [592]. TGF $\beta$  также приводит к снижению интенсивности секреции NK-клетками IFN $\gamma$ , а также блокирует сигналы от рецепторов NKG2D и CD244 NK-клеток и способствует снижению экспрессии NKp30, что в итоге приводит к уменьшению цитотоксической активности NK-клеток [121, 636].

Для анализа внутриклеточной передачи сигнала от НК-клеток клеткам трофобласта клетки линий NK-92 и JEG-3 совместно прокультивировали в течение 24 часов. Нами впервые установлено, что после контактного культивирования содержание фосфорилированных форм белков SMAD2/3 (pSMAD2/3) в НК-клетках было увеличено. Повышение содержания pSMAD2/3 указывает на активацию канонического пути передачи сигнала от TGF $\beta$  в НК-клетках и согласуется с данными литературы. Так, Yang B. и соавторы показали, что через 16 часов после активации клеток линии NK-92 цитокином TGF $\beta$  в них присутствует pSMAD2 [738]. Однако не выявлено увеличения отношения содержания SMAD2/3 к его фосфорилированной форме, что может быть связано с восполнением пула нефосфорилированных форм SMAD2/3 в процессе сокультивирования. Кроме того, воздействие TGF $\beta$  может быть реализовано посредством активации альтернативных SMAD-независимых сигнальных путей [767]. Описано, что TGF $\beta$  может активировать фосфатидилинозитол 3-киназный путь (PI3K)/АКТ, а также сигнальные пути с участием MAPK/ERK и RhoA [208, 382]. Отметим также, что на мышях продемонстрировано, что помимо TGF $\beta$ , белок активин А может связываться с рецептором к TGF $\beta$ , вызывая снижение синтеза IFN $\gamma$  НК-клетками [412].

Нами установлено, что после длительного культивирования (в течение 96 часов) НК-клеток в условиях монокультуры в присутствии TGF $\beta$  НК-клетки характеризуются повышенным содержанием мРНК гена *NCAM1*, кодирующего CD56, что косвенно подтверждает увеличение продукции НК-клетками этого фенотипического маркера. Кроме того, нами установлено, что НК-клетки под влиянием TGF $\beta$  повышают экспрессию CD56 на своей мембране, а также снижают экспрессию цитотоксических рецепторов NKp30. По данным литературы, TGF $\beta$  подавляет экспрессию рецептора CD16 CD56<sup>bright</sup> НК-клетками, стимулируя дифференцировку CD56<sup>bright</sup> CD16- НК-клеток [58]. Показано, что TGF $\beta$  ингибирует цитотоксичность НК-клеток в отношении дендритных клеток за счет снижения экспрессии НК-клетками NKp30 [121]. Таким образом, установленные нами изменения экспрессии естественными киллерами CD56 и NKp30 можно расценивать как индукцию их регуляторного фенотипа.

В то же время по нашим данным TGF $\beta$  вызывает снижение количества клеток линии NK-92 с фенотипом NKG2A<sup>+</sup> и KIR2DL4<sup>+</sup> в монокультуре. Hawke L. et al. показал, что в результате культивирования рНК-клеток в присутствии IL-15 и TGF $\beta$  НК-клетки приобретают ILC1-подобный фенотип и изменяют экспрессию транскрипционных факторов T-bet и Eomes [273]. В ответ на TGF $\beta$  в системе культивирования с IL-15 повышалась экспрессия ILC1-подобными клетками как активационных рецепторов, так и ингибиторных, в том числе NKG2A [273]. По нашим данным в сокультуре клеток линий NK-92 и JEG-3 TGF $\beta$  также вызывал повышение экспрессии CD56 НК-клетками, сближая их фенотип с регуляторным. В системе



сокультивирования TGF $\beta$  может оказывать влияние и на клетки трофобласта. Показано, что TGF $\beta$  стимулирует инвазию клеток трофобласта линии JEG-3 [290]. Ингибирование сигналинга от TGF $\beta$  в клетках линии JEG-3 приводит к снижению пролиферации клеток трофобласта [177], их способности к миграции и инвазии [744, 749]. По данным литературы, клетки трофобласта линии JEG-3 экспрессируют Galectin-1 [540]. Лигандом Galectin-1 является белок Tim-3, экспрессированный на dNK-клетках [637]. Показано, что в работе с использованием мышей TGF $\beta$  вызывает супрессию характерного для NK-клеток транскрипционного фактора Eomes в NK-клетках селезенки и индуцирует приобретение ими ILC1-подобного фенотипа [153]. На примере ILC, полученных из слюнных желез мышей продемонстрировано, что ILC1-подобные клетки содержат больше мРНК гранзима В и С, чем NK-клетки. В случае нокаутных мышей, неэкспрессирующих TGF $\beta$ R2, экспрессия гранзима С в ILC1-подобных клетках снижена [153].

Таким образом, наши результаты дополняют данные, описанные в литературе: TGF $\beta$  как в условиях монокультуры, так и сокультуры с клетками трофобласта изменяет экспрессию NK-клетками рецепторов, делая их сходными с другими популяциями ILC. В связи с описанным участием TGF $\beta$  в регуляции цитотоксичности NK-клеток нами также оценена цитотоксичность клеток линии NK-92 в присутствии цитокинов, в том числе TGF $\beta$ . Нами установлено, что цитотоксичность клеток линии NK-92 была повышена после предварительной инкубации клеток с TGF $\beta$ , что подтверждает предположение о способности NK-клеток к трансдифференцировке в ILC1.

При оценке влияния TNF $\alpha$  на NK-клетки нами установлена сниженная интенсивность экспрессии CD56 клетками линии NK-92 после культивирования с TNF $\alpha$  в течение 96 часов, а также сниженное содержание мРНК гена *NCAM1*, кодирующего CD56, в NK-клетках. Также мы выявили, что после предварительного культивирования с TNF $\alpha$  в течение 24 часов усиливается цитотоксичность клеток линии NK-92 в отношении клеток трофобласта линии JEG-3. Эти изменения фенотипа и функции NK-клеток можно расценивать как индукцию в присутствии TNF $\alpha$  цитотоксического фенотипа - CD56<sup>dim</sup>, способствующего развитию невынашивания беременности.

Описано, что NK-клетки после культивирования *in vitro* в присутствии фидерных клеток, экспрессирующих мембран-связанную форму цитокина IL-21, могут менять свой фенотип, начиная экспрессировать рецепторы NKG2C и CD57, сохраняя способность к индукции цитотоксичности [328]. Данные изменения в совокупности с приобретением HLA-DR расценивают как характерные для адаптивных NK-клеток [328]. У женщин с предшествовавшими беременностями описаны dNK-клетки, «лицензированные в отношении беременности», для которых характерна повышенная экспрессия NKG2C [237]. При сравнении eNK-клеток и pNK-клеток показано, что eNK-клетки больше экспрессируют NKG2A, чем pNK-

клетки [215]. В настоящей работе в случае культивирования в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3 добавление TNF $\alpha$  вызывало повышенную экспрессию NKG2C и ингибиторного рецептора NKG2A. Также установлено повышенное количество CD57+ клеток линии NK-92 и экспрессия ими CD57 в случае сокультуры по сравнению с монокультурой. Данные изменения фенотипа клеток линии NK-92 в присутствии клеток трофобласта могут отражать влияние клеток трофобласта и индукцию фенотипа NK-клеток, подобных клеткам памяти. По данным литературы TNF $\alpha$  продуцируют эндометриальные клетки в секреторной фазе менструального цикла [680], а также dNK-клетки I триместра беременности [390]. В связи с этим воздействие TNF $\alpha$  в совокупности с контактным взаимодействием с клетками трофобласта нельзя расценивать исключительно как провоспалительное.

Среди цитокинов децидуальной оболочки I триместра помимо TGF $\beta$  и TNF $\alpha$  присутствуют IL-10, IFN $\gamma$ , секретируемые макрофагами децидуальной оболочки [356, 443, 453, 465]. Рецептор IL-10 состоит из двух субъединиц и экспрессирован на многих клетках, в том числе на NK-клетках [465]. По некоторым данным IL-10 подавляет активность NK-клеток, ингибируя транскрипционный фактор NF-kB [189]. Помимо децидуальных макрофагов [443] продукция IL-10 также показана для dNK-клеток [380]. IL-10 влияет на взаимодействие dNK-клеток и дендритных клеток маточно-плацентарного комплекса в модели с использованием мышей [97]. Однако нам не удалось установить непосредственного эффекта IL-10 на фенотип NK-клеток как в моно, так и в сокультуре клеток линий NK-92 и JEG-3. В случае присутствия IL-10 в культуральной среде экспрессия NK-клетками CD56 и CD57 была повышена в сокультуре по сравнению с монокультурой. Данные изменения фенотипа указывают на сохраняющийся модулирующий эффект клеток трофобласта на фоне присутствия IL-10.

На мышинной модели показано, что IFN $\gamma$  стимулирует разнонаправленное изменение экспрессии ингибиторных рецепторов pNK-клеток [383]. Показано, что повышение продукции макрофагами IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  приводит к усилению апоптоза клеток трофобласта [453]. Выявлена ассоциация повышенной продукции цитокинов IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  плацентарными макрофагами и dNK-клетками, и развитием невынашивания беременности [390, 453]. Нами установлено, что IFN $\gamma$  вызывал повышение экспрессии рецептора KIR3DL1 клетками линии NK-92 в случае монокультуры. В случае культивирования в среде с IFN $\gamma$  влияние клеток трофобласта на клетки линии NK-92 сохранялось и выражалось в повышении экспрессии CD56 и KIR2DS4 по сравнению с показателем для монокультуры. Нами не было установлено изменений содержания мРНК гена *NCAM1*, кодирующего CD56, в NK-клетках после культивирования в монокультуре в присутствии IFN $\gamma$ , что подтверждает предположение о необходимости дополнительных цитокиновых и рецепторных стимулов со стороны клеток микроокружения для изменения дифференцировки NK-клеток, отражающееся в изменении экспрессии CD56. Song X. et al.

описана корреляция цитотоксической функции клеток линии NK-92 и секрецией ими IFN $\gamma$  при взаимодействии с клетками-мишенями K-562 [617]. По данным литературы в случае длительного культивирования (72 часа) клеток линии JEG-3 в присутствии IFN $\gamma$  экспрессия клетками трофобласта HLA-G повышена [515]. Таким образом, согласно полученным нами данным и данным литературы, взаимодействие NK-клеток и клеток трофобласта в присутствии IFN $\gamma$  представляет собой не просто контактный цитолиз, но включает и изменения фенотипических характеристик как NK-клеток, так и клеток трофобласта.

Так как клетки децидуальной оболочки секретируют широкий спектр цитокинов [473, 589], для более комплексной оценки влияния секреторных факторов на взаимодействие NK-клеток и клеток трофобласта нами оценен фенотип NK-клеток после культивирования в присутствии КС ворсин хориона I и III триместров, полученных от здоровых женщин. Установлено, что количество CD215+, NKG2D+, KIR2DS4+ NK-клеток и интенсивность экспрессии ими CD56, KIR2DS4 повышена в присутствии КС III триместра по сравнению с КС I триместра. Таким образом, нами впервые продемонстрировано, что растворимые компоненты, секретируемые клетками плаценты в III триместре, стимулируют формирование более цитотоксически-активных NK-клеток, которые экспрессируют как активационные рецепторы (NKG2D и KIR2DS4), так и рецептор к IL-15 (CD215).

В случае культивирования NK-клеток в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3 и КС по сравнению с показателями для NK-клеток, прокультивированных только с КС, приобретение фенотипа, сходного с фенотипом dNK-клеток, установленное нами для клеток линии NK-92, сохранялось. В сокультуре с клетками линий JEG-3 количество NKG2D+ NK-клеток и интенсивность экспрессии NKG2D NK-клетками были снижены после инкубации с КС III триместра по сравнению с КС I триместра. По данным литературы dNK-клетки экспрессируют NKG2D [337, 760]. Клетки линии JEG-3 экспрессируют лиганды NKG2D (ULBP1 [69], ULBP2 [668]). Показано, что dNK-клетки формируют иммунные синапсы как с клетками-мишенями K-562, так и с клетками трофобласта линий BeWo и JEG-3 [337]. Однако при связывании с клетками трофобласта в NK-клетках не происходит поляризации перфорин-содержащих гранул, что приводит к сниженной цитотоксичности dNK-клеток [337]. По данным литературы количество NKG2D+ dNK-клеток в III триместре беременности снижено по сравнению с количеством этих клеток в периферической крови [644]. По другим данным dNK-клетки характеризуются повышением экспрессии NKG2D в течение I [434] и II [760] триместра беременности. Однако в случае культивирования с КС клеток трофобласта линии HTR-8, а также КС децидуальных стромальных клеток NK-клетки демонстрировали снижение экспрессии NKG2D [760]. Таким образом, установленное нами повышение интенсивности

экспрессии NKG2D в присутствии клеток линии JEG-3 и КС I триместра может отражать общий активационный потенциал NK-клеток в I триместре беременности, необходимый для ремоделирования стенки матки и формирования плаценты. Выявленное снижение экспрессии NKG2D в присутствии КС третьего триместра и клеток линии JEG-3 согласуется с представлениями об основной роли NK-клеток матки как цитокин-секретирующих клеток с преобладанием регуляторной функции. Экспрессия лиганда NKG2D - ULPB-1 установлена для децидуальных макрофагов и Т-лимфоцитов [434], что определяет возможность взаимодействия модифицированных клетками трофобласта NK-клеток с иммунокомпетентными клетками микроокружения. Установленное нами повышение количества и интенсивности экспрессии активационного рецептора KIR2DS4 NK-клетками в присутствии КС III триместра указывает на множественность регуляции функции NK-клеток, выраженное в снижении экспрессии не всех рецепторов, отвечающих за цитотоксическую функцию.

Разделение путей дифференцировки популяций ILC во многом основано на активируемых транскрипционных факторах [629, 669]. Для установления влияния клеток трофобласта на дифференцировку NK-клеток нами проанализирована экспрессия транскрипционных факторов естественными киллерами. Нами впервые установлено, что в сокультуре с клетками трофобласта линии JEG-3 количество NK-клеток, содержащих транскрипционные факторы AhR, Eomes, ROR $\alpha$  и T-bet, а также интенсивность экспрессии этих факторов NK-клетками были снижены по сравнению с монокультурой NK-клеток. Полученные результаты частично согласуются с данными литературы. Например, по данным Park S.Y. et al, клетки трофобласта линии Sw.71 подавляли экспрессию в клетках линии NK-92 продукцию мРНК факторов Eomes и T-bet, а также фосфорилирование STAT5 и путь внутриклеточной передачи сигнала ERK/JNK [506]. Кроме того, в результате инкубации первичной культуры клеток трофобласта с dNK-клетками было продемонстрировано снижение экспрессии T-bet и Helios NK-клетками, что в свою очередь определяет снижение синтеза IFN $\gamma$  NK-клетками и может способствовать приобретению ими регуляторного фенотипа [227].

Отметим, что нами установлено снижение экспрессии транскрипционных факторов, участвующих в формировании популяций ILC1, ILC2 и LTi-клеток, в то время как ROR $\gamma$ t, участвующий в формировании ILC3 не изменялся. Показано, что ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> ILC могут дифференцироваться в ILC1 под влиянием IL-2 и IL-12 [90], что свидетельствует об участии цитокинов в регуляции формирования популяций ILC.

В целом, популяция ILC3 формируется с участием транскрипционных факторов ROR $\gamma$ t и AhR, однако особая популяция ILC3 со сниженной экспрессией рецепторов цитотоксичности (NCR-) образуется при участии только ROR $\gamma$ t [622]. Описано, что NCR- ILC3 присутствуют в слизистых, а также сходны с NK-клетками и LTi-клетками по экспрессии некоторых цитокинов

и экспрессии рецепторов [672]. Отмечено, что в децидуальной оболочке присутствует субпопуляция ILC3, не продуцирующая IL-22, но секретирующая IL-8, экспрессирующая CD127, и сходная по функциям с dNK-клетками [670, 672]. Показано, что экспрессия децидуальными ILC3 (dILC3) рецепторов NKp44, CD161 и CXCR5 выше, чем у dNK-клеток [670]. Нами установлена повышенная экспрессия NKp44 и CD161 клетками линии NK-92 после культивирования с клетками трофобласта. По данным литературы dILC3 отличаются от dNK-клеток по содержанию микроРНК [510], что указывает на эпигенетические механизмы формирования этой популяции клеток. В присутствии фидерных клеток мононуклеарной фракции и цитокинов IL-2 или IL-15 установлена повышенная пролиферативная активность dILC3, а также их дифференцировка в незрелые NK-клетки [670]. Однако, по другим данным dILC3 в высокой степени экспрессируют транскрипционный фактор AhR [293]. Кроме того, показано, что повышенная экспрессия AhR dNK-клетками коррелирует с повышением их экспрессии цитотоксических рецепторов NKp30, NKp46, NKG2D, а также содержанием GrzB и перфорины, что способствует развитию ПНБ [740]. На основании данных литературы и полученных нами данных можно отметить, что NK-клетки под влиянием клеток трофобласта изменяют экспрессию транскрипционных факторов. Однако однозначно классифицировать эти изменения, как приобретение фенотипа dNK-клеток или, например, dILC3 не представляется возможным, так как границы этих популяций носят нечеткий характер. Клетки трофобласта оказывают модулирующее действие на NK-клетки, в частности подавляя экспрессию транскрипционных факторов, участвующих в регуляции цитотоксических функций естественных киллеров.

Для оценки влияния сокультивирования с клетками трофобласта и цитокинами на дифференцировку NK-клеток нами также были использованы pNK-клетки здоровых небеременных женщин. Нами установлено, что при использовании мононуклеаров периферической крови в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3 интенсивность экспрессии CD56 pNK-клетками и относительное количество NKG2C<sup>+</sup> pNK-клеток были снижены. Изменения интенсивности экспрессии CD56 pNK-клетками в присутствии клеток трофобласта были установлены на фоне присутствия в культуральной среде цитокинов IL-15, IL-18, TGFβ. Так как при использовании клеток линии NK-92 мы детектировали повышенную экспрессию рецепторов CD56 и NKG2C в присутствии клеток трофобласта, эти различия, вероятно, связаны с присутствием в составе фракции мононуклеаров в нашей модельной системе не только pNK-клеток, но и моноцитов. В то же время нами установлено, что в присутствии клеток трофобласта и IL-18 количество NKp44<sup>+</sup> pNK-клеток и интенсивность экспрессии ими NKp44 возрастала, что соотносится с результатами, полученными нами с

использованием клеток линии NK-92. Соответственно, установленные с использованием клеток линии NK-92 результаты частично воспроизводятся на pNK-клетках.

По данным литературы в I триместре беременности макрофаги M1, присутствующие в децидуальной оболочке, участвуют в регуляции инвазии клеток трофобласта наравне с NK-клетками [302]. Децидуальные макрофаги I триместра беременности секретируют IL-12 [302]. Кроме того, описаны макрофаги, экспрессирующие  $\beta$ -цепь рецептора к IL-15 (CD122), которые присутствуют в децидуальной оболочке [253]. Под влиянием IL-15 CD122+ макрофаги продуцируют TNF $\alpha$  и IL-6 [253]. По данным литературы, макрофаги ингибируют цитотоксическую функцию NK-клеток за счет секреции TGF $\beta$  [106, 146, 490]. В составе мононуклеаров периферической крови присутствуют моноциты, которые в результате культивирования могут дифференцироваться в макрофаги. Клетки трофобласта могут усиливать секрецию цитокинов моноцитами/макрофагами. Awoyemi T. и соавторы показали, что микровезикулы синцитиотрофобласта, полученные от здоровых беременных женщин, индуцируют секрецию спектра цитокинов, в том числе TNF $\alpha$ , IL-8, IL-6, VEGF, IL-1 $\beta$ , GM-CSF, моноцитоподобными клетками линии THP-1 [75]. Совокупный ингибирующий эффект моноцитов/макрофагов и клеток трофобласта объясняет установленное снижение экспрессии CD56 и активационного рецептора NKG2C. В результате добавления к мононуклеарам IL-15 и их культивирования в присутствии клеток трофобласта моноциты могут приобретать особый секреторный профиль. В свою очередь модифицированная цитокинами активность моноцитов может стимулировать изменения фенотипа NK-клеток, в частности вызывать снижение экспрессии CD56 и количества NKG2C+ NK-клеток в присутствии клеток трофобласта.

В случае добавления TGF $\beta$  к монокультуре мононуклеаров периферической крови, а также к сокультуре мононуклеаров с клетками линии JEG-3 нами также выявлена сниженная экспрессия CD56, активационного рецептора NKp44, и сниженное количество pNK-клеток с фенотипом NKp44+. Однако, в нашей модели с клетками линии NK-92 после культивирования с TGF $\beta$  экспрессия CD56 была повышена в монокультуре. Эти различия также можно связать с влиянием моноцитов на фенотип NK-клеток в составе мононуклеарной фракции крови. Это предположение согласуется с установленными нами различиями цитотоксической активности pNK-клеток и spNK-клеток. Необходимо отметить, что снижение экспрессии рецепторов pNK-клетками в присутствии TGF $\beta$  затрагивало не только активационные, но и ингибиторный рецептор KIR2DL1. Выявленное нами снижение экспрессии KIR2DL1 может быть связано с общим подавлением экспрессии многих рецепторов NK-клеток клетками трофобласта в присутствии моноцитов.

Нами установлено, что на фоне присутствия в культуральной среде TGF $\beta$  pNK-клетки характеризовались сниженной экспрессией CD56 в сокультуре по сравнению с монокультурой.

По данным литературы, TGF $\beta$  подавляет продукцию клетками линии JEG-3 прогестерона и эстрадиола [407]. In vitro показано, что в результате воздействия гормонов беременности, в том числе прогестерона, эстрадиола и пролактина, клетки линии ТНР-1 изменяли секреторный профиль и начинали продуцировать цитокины, характерные для М2-макрофагов [448]. Таким образом, ингибирующее воздействие клеток трофобласта и моноцитов в экспериментах с мононуклеарами периферической крови, вероятно, было усилено экзогенным TGF $\beta$ .

Таким образом, рецепторы NK-клеток формируют два кластера, отражающие способность к приобретению ILC-подобного фенотипа. Отдельные цитокины способны модулировать фенотип клеток линии NK-92 в случае монокультуривирования. Так, IFN $\gamma$  приводит к повышению экспрессии KIR3DL1 клетками линии NK-92 в случае монокультуры. В монокультуре клеток линии NK-92 TNF $\alpha$  вызывает снижение экспрессии CD56. Под влиянием TGF $\beta$  повышена экспрессия CD56 и снижена экспрессия цитотоксического рецептора NKp30 в монокультуре. Длительное совместное культивирование клеток линии NK-92 с клетками трофобласта линии JEG-3 стимулирует выраженное изменение естественных киллеров, сближая их фенотип с фенотипом dNK-клеток. Цитокины микроокружения могут вносить вклад в модификацию фенотипа NK-клеток клетками трофобласта (Рисунок 9.2).

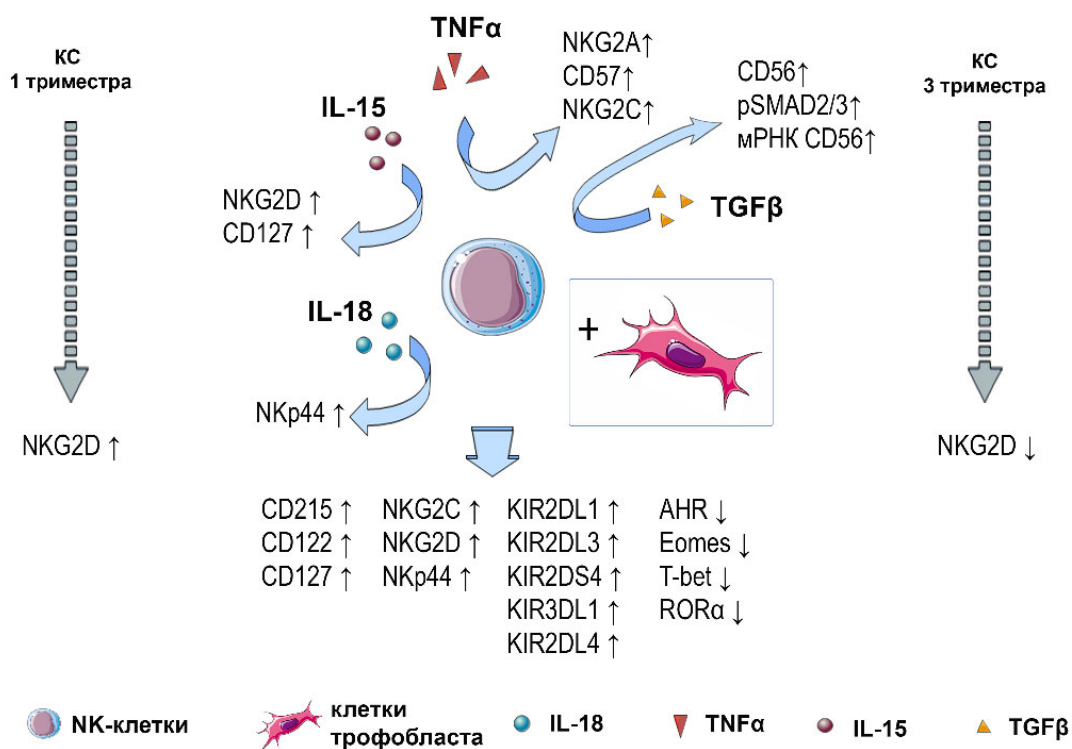


Рисунок 9.2 – Схема влияния клеток трофобласта линии JEG-3 на дифференцировку естественных киллеров линии NK-92 при длительном совместном культивировании

Клетки трофобласта линии JEG-3 продуцируют TGF $\beta$ , в результате сокультивирования с клетками линии NK-92 в последних повышается содержание фосфорилированных форм белков SMAD2/3, что подтверждает активацию SMAD-зависимой внутриклеточной передачи сигнала в NK-клетках. Однако соотношение pSMAD2/3 к SMAD2/3 не различалось между NK-клетками после моно- и сокультивирования, что может быть обусловлено восполнением пула нефосфорилированных белков SMAD2/3. Под влиянием TGF $\beta$  в условиях монокультуры в NK-клетках было повышено содержание мРНК гена *NCAM1*, кодирующего CD56. При сокультивировании как без, так и в присутствии клеток трофобласта и TGF $\beta$  экспрессия NK-клетками CD56 была повышена наряду со сниженной экспрессией NKp30, что можно расценивать как приобретение естественными киллерами регуляторного фенотипа.

Как упоминалось ранее, dNK-клетки при ПНБ характеризуются повышенной продукцией TNF $\alpha$ , что связывают с провоспалительной трансформацией NK-клеток [390]. Однако, нами показано, что в случае добавления TNF $\alpha$  к сокультуре с клетками линии JEG-3 повышается интенсивность экспрессии клетками линии NK-92 как активационного рецептора NKG2C, так и ингибиторного рецептора NKG2A. В связи с этим воздействие TNF $\alpha$  в совокупности с контактным взаимодействием с клетками трофобласта вызывает модификацию NK-клеток, но не является исключительно провоспалительным. В сокультуре с клетками трофобласта цитокин IL-15 вызывает увеличение количества NKG2D<sup>+</sup> NK-клеток и интенсивности экспрессии ими CD127, IL-18 вызывает повышение количества NKp44<sup>+</sup> NK-клеток, что свидетельствует о возможности приобретения NK-клетками ИЛС-подобного фенотипа под влиянием цитокинов IL-15 и IL-18. В присутствии КС1 и клеток трофобласта линии JEG-3 NK-клетки демонстрировали повышение интенсивности экспрессии NKG2D, что может отражать общую активацию NK-клеток в I триместре беременности, необходимую для ремоделирования стенки матки и формирования плаценты. В присутствии КС III триместра и клеток трофобласта линии JEG-3 установлено снижение экспрессии NKG2D NK-клетками, что согласуется с представлениями о секреторной регуляторной функции NK-клеток матки в III триместре беременности. В присутствии клеток трофобласта в NK-клетках снижается интенсивность экспрессии транскрипционных факторов AhR, Eomes, T-bet, ROR $\alpha$ . Установленные изменения экспрессии транскрипционных факторов NK-клетками после культивирования с клетками трофобласта указывают на влияние клеток трофобласта на дифференцировку NK-клеток. Для приближения используемой модели к ситуации *in vivo* было проанализировано влияние клеток трофобласта на NK-клетки в составе мононуклеарной фракции. Установленные изменения экспрессии рецептора NKp44 pNK-клетками частично воспроизводят результаты, полученные с использованием клеток линии NK-92. Однако, в случае сокультивирования с клетками линии JEG-3 выявлена сниженная экспрессия CD56 pNK-клетками, как без цитокинов, так и в их



присутствии. Различия модели с использованием клеток линии NK-92 и pNK-клеток можно связать с влиянием моноцитов фракции мононуклеаров.

Согласно одной из точек зрения, увеличение количества NK-клеток в эндометрии в секреторной фазе менструального цикла и в I триместре беременности происходит благодаря пролиферации уже имеющегося пула eNK-клеток [593, 759] и/или гемопоэтических клеток, также выявленных в децидуальной оболочке [137]. Другие исследователи полагают, что в децидуальной оболочке происходит пролиферация мигрировавших из периферической крови NK-клеток в ответ на сигналы от стромальных клеток слизистой оболочки матки и клеток трофобласта [115, 125, 583]. В связи с этим нами оценена эта функция естественных киллеров периферической крови женщин в разных фазах менструального цикла и в I триместре беременности, ее изменения в присутствии клеток трофобласта, а также нарушения в случае ПНБ. Для этого использовали pNK-клетки небеременных и беременных женщин и проводили совместное культивирование в присутствии клеток трофобласта в течение 144 часов.

Нами установлено, что pNK-клетки женщин как при беременности, так и вне беременности экспрессируют Ki-67, что указывает на их способность к пролиферации. У беременных женщин спонтанный уровень экспрессии Ki-67 pNK-клетками в составе мононуклеаров повышен по сравнению с показателем у небеременных женщин. Возрастающая пролиферация NK-клеток при беременности, возможно, связана с появлением в крови беременных женщин хорионического гонадотропина человека (ХГЧ), секретируемого клетками трофобласта [21]. Показано, что ХГЧ индуцирует приобретение pNK-клетками фенотипа CD56<sup>bright</sup>, угнетает экспрессию ими перфорина и стимулирует пролиферацию dNK-клеток [41, 42, 310].

В присутствии IL-2 экспрессия pNK-клетками Ki-67 повышалась, что совпадает с данными литературы [258, 440]. В составе мононуклеаров IL-2 может оказывать как прямое влияние на NK-клетки, усиливая их пролиферацию и активацию [82], так и косвенное - через стимуляцию CD4+Т-лимфоцитов к продукции IL-4 [384]. В экспериментах с использованием мышей показано, что макрофаги, стимулированные IL-4, повышают пролиферативную активность NK-клеток за счет секретируемого IL-15 [325]. Таким образом, повышение экспрессии Ki-67 pNK-клетками в использованной нами модели определяется не только непосредственным присутствием IL-2 в среде, но и эффектами других клеток в составе мононуклеаров периферической крови, активированных IL-2.

Нами впервые продемонстрировано, что экспрессия Ki-67 pNK-клетками в составе мононуклеаров была снижена в присутствии клеток трофобласта во всех обследованных группах женщин. Таким образом, клетки трофобласта линии JEG-3 ингибируют пролиферацию

pNK-клеток. Снижение пролиферации является неотъемлемой частью процесса дифференцировки клеток в целом и NK-клеток в частности [518]: по мере продвижения по пути дифференцировки клетки утрачивают способность к пролиферации. Выявленное нами подавление экспрессии Ki-67 NK-клетками фракции мононуклеаров в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3 может определяться секрецией TGF $\beta$ . Это подтверждается и нашими данными о содержании TGF $\beta$  в клетках трофобласта линии JEG-3. Описано, например, что культивирование pNK-клеток в присутствии TGF $\beta$ 1 приводит к ингибированию репликации ДНК, а также снижению продукции IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  и GM-CSF [84]. В качестве возможного механизма можно предположить, что под влиянием TGF $\beta$  в NK-клетках снижается экспрессия белка c-тус, ассоциированного с киназой Syk [367]. Этот белок в свою очередь демонстрировал высокую корреляцию с пролиферацией клеток [509].

Помимо общей тенденции ингибирования клетками трофобласта пролиферации NK-клеток, нами отмечено, что у беременных женщин этот эффект менее выражен по сравнению с небеременными женщинами как в случае культивирования только с клетками трофобласта, так и в комбинации клеток трофобласта и IL-2. По данным литературы pNK-клетки беременных женщин после активации PMA в меньшей степени синтезируют IFN $\gamma$  по сравнению с NK-клетками женщин в пролиферативной фазе менструального цикла [683]. Higuma-Myojo S. и соавторы показали, что у женщин в I триместре беременности среди pNK-клеток возрастает количество клеток, продуцирующих IL-10, по сравнению с небеременными женщинами [281]. Отметим, что по нашим данным под влиянием IFN $\gamma$  увеличивалось количество клеток трофобласта линии JEG-3, экспрессирующих рецепторы к TGF $\beta$ , а под влиянием IL-10 была повышена секреция TGF $\beta$  клетками трофобласта. Таким образом, pNK-клетки при беременности более устойчивы к влиянию клеток трофобласта. Однако по принципу усиления обратной связи профиль секреции pNK-клеток усиливает секреторную активность клеток трофобласта, что может способствовать его влиянию на естественные киллеры.

Использование в работе spNK-клеток позволило установить достоверное, но слабое повышение экспрессии Ki-67 в присутствии только IL-2 и совместно с IL-2 и клетками трофобласта по сравнению со спонтанным уровнем и с инкубацией только с клетками трофобласта. Вероятно, повышение экспрессии пролиферативного маркера Ki-67 связано непосредственно с активирующим влиянием IL-2 на NK-клетки. Нами установлено, что интенсивность экспрессии Ki-67 spNK-клетками снижена у беременных женщин в I триместре по сравнению с небеременными женщинами. Однако, в составе мононуклеаров экспрессия Ki-67 pNK-клетками беременных женщин была выше, чем у небеременных. Полученные результаты указывают на наличие при беременности дополнительного поддерживающего пролиферацию NK-клеток эффекта со стороны других мононуклеаров. В качестве

предполагаемых факторов активации пролиферации в составе мононуклеаров может выступать IL-4, секретируемый CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитами, при культивировании *in vitro* [525]. Так, показана стимуляция пролиферации CD56<sup>+</sup> NK-клеток в случае применения IL-4 в комбинации с IL-12 [477]. В модели *in vivo* IL-4 стимулировал макрофаги к продукции IL-15 и стимуляции пролиферативной активности NK-клеток [325, 768]. По данным литературы у женщин в I триместре беременности количество pNK-клеток, продуцирующих IL-10, возрастает по сравнению с небеременными женщинами [281], а также под влиянием прогестерона повышается синтез IL-4 CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитами [521]. Во фракции мононуклеаров периферической крови содержатся моноциты, которые в присутствии IL-4 и IL-10 могут дифференцироваться в макрофаги [596]. Таким образом, в поддержании пролиферации NK-клеток участвует множество стимулов, в том числе со стороны других мононуклеаров, при беременности эффект этих стимулов более выражен, чем вне беременности.

Нами установлено, что у женщин с физиологической беременностью по сравнению с небеременными женщинами в периферической крови снижено количество NK-клеток с фенотипом CD16<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> и повышено содержание CD16<sup>+</sup>CD57<sup>bright</sup> NK-клеток, что может быть связано с преимущественной миграцией NK-клеток, находящихся на промежуточных стадиях дифференцировки в зону маточно-плацентарного контакта. Следует отметить, что NK-клетки, несущие на своей поверхности CD57, при стимуляции антителами против CD16 способны продуцировать IFN $\gamma$  более эффективно, нежели клетки с фенотипом CD57<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, но не способны отвечать пролиферацией на IL-12 и IL-18 [403]. Показано, что среди популяции CD57<sup>+</sup> количество pNK-клеток, имеющих в составе своих гранул перфорины и GrzB, значительно превосходило таковое в популяции CD57<sup>-</sup>. Более того, через 5 суток под действием IL-2 *in vitro* популяция CD57<sup>-</sup> pNK-клеток способна увеличивать не только уровень поверхностного CD57, но и накапливать перфорин и гранзимы в цитолитических гранулах [403]. Вместе с тем, в ходе собственных экспериментов было показано, что в результате культивирования с IL-2 (по сравнению с отсутствием индукторов) и с IL-2 и клетками трофобласта (по сравнению с культивированием только с клетками трофобласта) количество pNK-клеток с фенотипом CD16<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup> возрастало во всех обследованных группах. В аналогичных условиях количество CD16<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup> NK-клеток было повышено только после культивирования мононуклеаров беременных женщин. Подобное изменение отчасти отражает регуляторный фенотип CD56<sup>bright</sup> NK-клеток. Однако полученные результаты могут быть связаны как с влиянием клеток трофобласта, так и с эффектом культивирования с IL-2.

Следует отметить, что CD56<sup>bright</sup> pNK-клетки несут на своей поверхности CD25, что позволяет им эффективно пролиферировать при наличии в составе микроокружения IL-2 [111]. При этом именно CD56<sup>bright</sup> NK-клетки отвечают пролиферацией на низкие - пико молярные -

концентрации IL-2, тогда как CD56<sup>dim</sup> NK-клетки, по крайней мере, в условиях *in vitro* практически не реагируют на высокие концентрации (1-10 нМ) данного цитокина в среде [80]. В ходе собственных экспериментов было показано, что культивирование мононуклеаров в присутствии IL-2 и клеток трофобласта приводило к повышению количества менее дифференцированных CD16+CD57- NK-клеток во всех группах женщин по сравнению с условиями культивирования в присутствии IL-2. Эти изменения косвенно указывают на снижение количества NK-клеток на терминальной стадии дифференцировки (CD57+) в течение культивирования. Количество CD16+CD57- NK-клеток, полученных от беременных женщин, было ниже, чем от небеременных в секреторной фазе цикла, после культивирования. Так как до культивирования у беременных женщин содержание CD16+CD57<sup>bright</sup> было больше, чем у небеременных, вероятно, влияния индукторов недостаточно для дедифференцировки этой популяции клеток и снижения экспрессии CD57. Только у небеременных женщин в секреторной фазе цикла установлено повышенное содержание CD16+CD56<sup>dim</sup> и сниженное содержание CD16+CD56<sup>bright</sup> NK-клеток после инкубации с клетками трофобласта и IL-2. Популяция CD16+CD56<sup>bright</sup> NK-клеток характеризуется повышенной цитотоксической активностью [643], разрабатываются подходы для лечения опухолей с применением адоптивной терапии с использованием CD16+CD56<sup>bright</sup> NK-клеток. Соответственно, снижение содержания CD16+CD56<sup>bright</sup> NK-клеток у небеременных женщин в секреторную фазу цикла можно интерпретировать как подготовку к имплантации бластоцисты, сопровождающуюся элиминацией цитотоксически-активных клеток.

Для определения вклада функциональной активности NK-клеток в патогенез ПНБ, нами была проанализирована пролиферативная активность и фенотип pNK-клеток женщин с этой патологией. По данным литературы в периферической крови количество CD56+ NK-клеток повышено у небеременных и беременных женщин с ПНБ по сравнению с показателями для контрольных групп - небеременных женщин и женщин с физиологической беременностью [83]. Согласно результатам мета-анализа S. Seshadri, S. K. Sunkara, количество pNK-клеток у пациенток с бесплодием было повышено по сравнению со здоровыми фертильными женщинами [584], в то время как количество NK-клеток матки не различалось у здоровых фертильных женщин и пациенток с ПНБ [584]. В мета-анализе K. Kolanska и соавторов указано, что, напротив, количество pNK-клеток было повышено у пациенток с ПНБ, однако авторы указывают на сильные различия в дизайне исследований, вошедших в их анализ [331]. Tang A.W. и соавторы в системном обзоре подвергают сомнению прогностическую ценность определения количества NK-клеток как в периферической крови, так и в децидуальной оболочке для прогнозирования невынашивания беременности [645]. В мета-анализе 2022 года авторов E. Von

Woon et al. указано, что количество НК-клеток в матке повышено при ПНБ, однако связь между количеством рНК-клеток и НК-клеток матки неочевидна [692]. Нами не выявлено различий в количестве НК-клеток у здоровых небеременных и беременных женщин и женщин с ПНБ. В связи с этим нами была предпринята попытка проанализировать не только относительное количество НК-клеток при невынашивании беременности, но также оценить экспрессию НК-клетками фенотипических маркеров CD56 и CD16.

В литературе представлены данные о связи фенотипа CD16<sup>+</sup> НК-клеток с невынашиванием беременности. Так, количество CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> НК-клеток в периферической крови было достоверно выше у женщин с неудачами ЭКО по сравнению с пациентками с успешной имплантацией после ЭКО [430]. Количество CD56<sup>bright</sup> НК-клеток в периферической крови не различалось между группами женщин, успешно проходившими процедуру ЭКО, и у которых наблюдались неудачи ЭКО [430]. По другим данным при ПНБ снижено количество CD56<sup>bright</sup> dNK-клеток, а также синтез ими цитокинов [648]. Иммуногистохимическое обследование пациенток с ПНБ показало, что в эндометрии у таких женщин достоверно больше CD16<sup>+</sup> клеток, чем у фертильных женщин, в то же время количество CD56<sup>+</sup> клеток не различалось [245]. Нами не выявлено различий в количестве рНК-клеток с фенотипами CD3-CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> и CD3-CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, а также различий в интенсивности экспрессии CD56 и CD16 между небеременными женщинами с ПНБ в пролиферативной и секреторной фазах цикла и беременными женщинами с ПНБ. Отсутствие различий в количестве популяций НК-клеток указывает на наличие локальных механизмов регуляции фенотипических и функциональных характеристик НК-клеток, которые не отражаются на системном уровне - в периферической крови. Для определения потенциала к изменению количественных и фенотипических характеристик НК-клеток мононуклеары периферической крови культивировали в течение 6 суток. Так как культивирование мононуклеаров без IL-2 приводит к высокому проценту нежизнеспособных клеток, клетки инкубировали в присутствии IL-2.

Нами установлено, что после культивирования мононуклеаров с IL-2 содержание НК-клеток среди всех мононуклеаров не отличалось от такового до эксперимента во всех группах. После культивирования с IL-2 интенсивность экспрессии CD56 НК-клетками была повышена во всех группах. Кроме того, установлено увеличенное количество CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> НК-клеток и сниженное количество CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> НК-клеток после культивирования с IL-2 по сравнению количеством до культивирования во всех группах, кроме беременных женщин с ПНБ в анамнезе. Рецептор к IL-2 состоит из трех субъединиц, По данным Fehner T.A. и соавторов для НК-клеток с фенотипом CD56<sup>bright</sup> характерна большая экспрессия  $\alpha$ -субъединицы рецептора к IL-2, обладающей наибольшей аффинностью связывания IL-2 [626], по сравнению с CD56<sup>dim</sup> НК-клетками [211]. Ранее показано, что в результате культивирования в присутствии IL-2 возрастает

экспрессия Ki-67 NK-клетками, причем преимущественно пролиферируют NK-клетки с фенотипом CD56<sup>bright</sup> [282]. NK-клетки с фенотипом CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> в присутствии IL-2 экспрессируют Ki-67 с меньшей интенсивностью [282]. Таким образом, выявленные нами изменения экспрессии CD56 могут быть связаны с преимущественным поддержанием популяции CD56<sup>+</sup> NK-клеток в присутствии IL-2 и их возможной пролиферацией.

Нами установлено, что после культивирования с IL-2 общее количество NK-клеток у женщин с ПНБ в секреторной фазе цикла было снижено, чем у женщин с ПНБ в пролиферативной фазе цикла. Группа женщин с ПНБ в пролиферативной фазе цикла также характеризовалась повышенной интенсивностью экспрессии CD56 NK-клетками по сравнению с группой фертильных женщин в пролиферативной фазе цикла и повышенным количеством CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> NK-клеток по сравнению с женщинами с ПНБ в секреторной фазе. По данным литературы CD56<sup>bright</sup> NK-клетки по сравнению с CD56<sup>dim</sup> NK-клетками в присутствии IL-2 продуцируют больше IFN $\gamma$  [211]. При анализе цитотоксической функции естественных киллеров нами показано, что в присутствии IL-2 и NK-клеток гибель клеток трофобласта повышена. Таким образом, при ПНБ в пролиферативной фазе цикла CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> NK-клетки находятся в более активированном состоянии, чем в отсутствие патологии, так как эти клетки демонстрируют большую восприимчивость к влиянию IL-2. Снижение количества этих клеток в периферической крови при ПНБ в секреторной фазе цикла может быть связано с их избирательной миграцией в матку из периферической крови.

Установленная нами сниженная интенсивность экспрессии CD56 NK-клетками после культивирования с IL-2 у беременных женщин с ПНБ по сравнению с небеременными женщинами с ПНБ может быть связана с предварительным модулированием функции NK-клеток в результате контакта с клетками трофобласта в организме женщины. Однако, нами также выявлена положительная корреляция между интенсивностью экспрессии CD56 и интенсивностью экспрессии Ki-67 в группе беременных женщин с ПНБ в анамнезе, что указывает на пролиферацию популяции NK-клеток, экспрессирующих CD56. Также нами установлено, что в группе беременных женщин с ПНБ количество CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> NK-клеток повышено по сравнению с показателем для небеременных с ПНБ в секреторной фазе цикла. Таким образом, при беременности, осложненной ПНБ, CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> pNK-клетки сохраняют способность к пролиферации в результате воздействия IL-2.

Пролиферация CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> NK-клеток также поддерживается в присутствии IL-2. Однако нами выявлена сниженная в результате культивирования с IL-2 интенсивность экспрессии CD16 по сравнению с интенсивностью экспрессии до культивирования во всех группах, кроме беременных женщин с ПНБ в анамнезе. Это изменение может быть связано с тем, что CD16<sup>+</sup> NK-клетки являются терминально дифференцированной популяцией,

пролиферативный потенциал которой сохраняется на определенном уровне, однако не является достаточным для поддержания состава этой популяции в течение длительного культивирования.

Интенсивность экспрессии CD16 NK-клетками беременных женщин с ПНБ не изменялась по сравнению с параметром до культивирования внутри группы. По-видимому, несмотря на положительную корреляцию между параметром интенсивности экспрессии CD56 и экспрессией Ki-67 популяция CD56+CD16+ NK-клеток у беременных с ПНБ пролиферирует с низкой интенсивностью. Подтверждают это предположение полученные нами данные о том, что у беременных женщин с ПНБ выявлена сниженная экспрессия Ki-67 NK-клетками с фенотипом CD56+CD16+ по сравнению с этим параметром у небеременных женщин с ПНБ в 1 фазе цикла и у женщин с физиологической беременностью. Необходимо отметить, что у фертильных женщин и беременных женщин в I триместре различий в интенсивности экспрессии CD56 и CD16, а также количества CD56+CD16- и CD56+CD16+ между группами не выявлено. В совокупности эти разнонаправленные изменения в количестве CD56+CD16- NK-клеток при ПНБ в течение менструального цикла и сниженная пролиферативная активность CD56+CD16+ NK-клеток у беременных с ПНБ в анамнезе могут указывать на недостаточность модификации NK-клеток у пациенток с ПНБ и быть отражением разбалансированной функциональной активности NK-клеток при этой патологии.

Нами впервые установлено, что клетки трофобласта подавляют экспрессию Ki-67 NK-клетками при ПНБ как в целом в популяции NK-клеток, так и в популяциях CD56+CD16- и CD56+CD16+ NK-клетках. Эта тенденция наблюдалась как в группах небеременных и беременных женщин с ПНБ, так и в группах фертильных женщин и женщин с физиологической беременностью. По-видимому, подавление пролиферации со стороны клеток трофобласта может быть реализовано за счет секреции цитокинов, например, TGF $\beta$ . Авторы Park S.Y. et al. показали, что секреторные продукты клеток трофобласта снижают экспрессию  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединиц рецептора к IL-2 на NK-клетках линии NK-92 [506], что может способствовать снижению пролиферации NK-клеток и облегчать *in vivo* его инвазию в стенку матки.

Кроме влияния на пролиферацию отмечено, что в группах небеременных и беременных женщин с ПНБ, а также в группе женщин с физиологической беременностью при культивировании в присутствии клеток трофобласта по сравнению с параметром после культивирования без клеток трофобласта снижена интенсивность экспрессии CD56. Снижение экспрессии CD56 NK-клетками в составе моноклеарной фракции под влиянием клеток трофобласта установлено после культивирования клеток в течение 6 суток. Выявленное снижение CD56 можно связать с влиянием других клеток моноклеарной фракции на рNK-клетки. Полученные результаты частично совпадают с данными, полученными на этапе работы по анализу дифференцировки NK-клеток фракции моноклеаров. Однако, сниженная

интенсивность экспрессии CD56 после 6 суток сокультивирования прослеживается не во всех группах. Нами выявлена сниженная интенсивность экспрессии CD56 NK-клетками в составе мононуклеарной фракции здоровых женщин в секреторной фазе цикла после 96 часов культивирования с клетками трофобласта, в то время как после 6 суток совместного культивирования интенсивность экспрессии CD56 в этой группе не различалась. По данным Angelo et L. S., содержание популяций NK-клеток CD56<sup>dim</sup> и CD56<sup>bright</sup> в периферической крови у здоровых доноров варьирует в течение времени, в то время как экспрессия функциональных рецепторов относительно стабильна [65]. Таким образом, различия в полученных нами результатах обусловлены пластичностью реакций клеток в процессе культивирования: вероятно, эффекты других популяций клеток на дифференцировку NK-клеток по мере увеличения времени культивирования снижаются.

Нами впервые установлено, что после культивирования с клетками трофобласта в течение 6 суток у небеременных женщин с ПНБ в секреторной фазе цикла была снижена интенсивность экспрессии CD56 pNK-клетками по сравнению с показателем у женщин с ПНБ в пролиферативной фазе цикла. Сходного изменения интенсивности экспрессии у фертильных женщин в разных фазах цикла отмечено не было. Сниженная интенсивность экспрессии CD56 NK-клетками при ПНБ в присутствии клеток трофобласта *in vitro* отражает нарушение модулирования функции естественных киллеров клетками трофобласта при ПНБ.

Таким образом, по результатам исследования пролиферативной активности NK-клеток можно заключить, что клетки трофобласта *in vitro* ингибируют как экспрессию маркера пролиферации Ki-67 NK-клеток, однако в зависимости от фазы менструального цикла ингибирующее влияние клеток трофобласта выражено в различной степени. У беременных женщин pNK-клетки обладают повышенной спонтанной и индуцированной экспрессией маркера пролиферации Ki-67 по сравнению с NK-клетками небеременных женщин. В присутствии других мононуклеаров влияние клеток трофобласта на экспрессию NK-клетками Ki-67 более выражено, нежели чем в их отсутствии. Вероятно, повышение экспрессии Ki-67 NK-клетками в использованной нами модели сокультивирования определяется не только непосредственным присутствием IL-2, но и эффектами других клеток в составе мононуклеаров периферической крови, активированных IL-2. В присутствии клеток трофобласта и IL-2 повышается количество CD16+CD57- NK-клеток, что может отражать снижение количества NK-клеток на терминальной стадии дифференцировки. Изменения фенотипа pNK-клеток небеременных и беременных женщин в сторону регуляторного (CD16-CD56<sup>bright</sup>) установлено в случае инкубации с клетками трофобласта и IL-2 и, вероятно, связано как с влиянием клеток трофобласта, так и с культивированием в присутствии других мононуклеаров и влиянием IL-2 (Рисунок 9.3).





Цитокины являются важными факторами микроокружения клеток. Помимо клеток трофобласта непосредственно dNK-клетки могут синтезировать цитокины. Показано, что CD56<sup>+</sup> pNK в I триместре беременности продуцируют IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  [135]. Часть dNK-клеток при физиологической беременности в I триместре синтезирует TNF $\alpha$  [288, 390, 637], IFN $\gamma$  [130, 303, 390], TGF $\beta$  [288] и IL-10 [288]. Нами была проанализирована секреторная активность клеток линии NK-92 после культивирования в условиях аналогичных тем, что мы применяли для оценки дифференцировки NK-клеток. В КС, полученных после культивирования интактных клеток линии NK-92, нами выявлен цитокин IFN $\gamma$ , в то время как содержания TNF $\alpha$  не было установлено. По данным литературы, NK-клетки продуцируют TNF $\alpha$  в условиях воспаления [516], поэтому его отсутствие в секреторных продуктах клеток линии NK-92, прокультивированных без индукторов, ожидаемо. Культивирование в присутствии цитокинов также не приводило к появлению TNF $\alpha$  в КС NK-клеток. Нами также установлено, что клетки линии NK-92 синтезируют RANTES и IL-10. Так как эти цитокины также характерны для NK-клеток, наши данные согласуются с данными литературы [144, 200].

Нами установлено, что в КС, полученных после культивирования клеток линии NK-92 в присутствии TGF $\beta$ , содержание IFN $\gamma$  снижено, по сравнению с его уровнем после культивирования интактных клеток линии NK-92. Эти результаты согласуются с данными литературы, так как ранее показано, что добавление экзогенного TGF $\beta$  приводит к снижению продукции IFN $\gamma$  pNK-клетками [84]. Подобное влияние TGF $\beta$  на NK-клетки согласуется с представлениями о его супрессивном действии на клетки иммунной системы [150, 179], а также о ключевой роли этого цитокина в создании иммунной толерантности при беременности.

После культивирования клеток линии NK-92 в присутствии TGF $\beta$  в КС также было снижено содержание IL-10 по сравнению с его содержанием после культивирования интактных клеток линии NK-92. При анализе цитотоксической активности NK-клеток в отношении клеток линий K-562 и JEG-3 нами установлено, что в присутствии IL-10, цитотоксичность повышена. По данным литературы IL-10 стимулирует цитотоксичность NK-клеток и выработку ими IFN $\gamma$  [706]. Соответственно, снижение продукции NK-клетками IL-10 после их инкубации в присутствии TGF $\beta$  может объясняться иммуносупрессивным влиянием последнего. В литературе также описано, что IL-10 может снижать инвазивную способность клеток трофобласта путем влияния на экспрессию MMP [558]. Кроме того, нами установлено, что содержание GrzB в клетках линии NK-92 снижено после совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3, в то время как его содержание возрастало в клетках трофобласта. В совокупности эти данные свидетельствуют о возможности взаимной регуляции NK-клеток и клеток трофобласта: NK-клетки сдерживают инвазию клеток трофобласта. В то же

время, под влиянием TGF $\beta$ , который секретируют клетки трофобласта, NK-клетки снижают секрецию IL-10, что может положительно сказываться на инвазии клеток трофобласта.

Содержание RANTES снижено после культивирования клеток линии NK-92 в присутствии TGF $\beta$  относительно концентрации RANTES, обнаруживаемой в КС интактных клеток. Ранее показано, что NK-клетки экспрессируют рецептор RANTES [321]. Установлено, что RANTES стимулирует миграцию, пролиферацию и активацию NK-клеток [399, 417, 649], а также усиливает инвазию клеток трофобласта [569]. Таким образом, под влиянием TGF $\beta$  NK-клетки изменяют секреторный профиль, регулируя инвазию клеток трофобласта, а также аутокринно сдерживая собственную численность. Кроме того, показано, что на клетках трофобласта также есть рецептор RANTES [421], что позволяет рассматривать цитокин в качестве дополнительного регулятора пролиферации и инвазии клеток трофобласта.

В качестве участников дистантного взаимодействия NK-клеток и клеток трофобласта также могут выступать МВ, в связи с чем была оценена способность NK-клеток к их образованию. С помощью атомно-силовой и трансмиссионной электронной микроскопии продемонстрировано, что клетки линии NK-92 образуют МВ. Гранулометрический анализ позволил установить размер МВ: продемонстрировано, что он находится в интервале от 169 нм до 512 нм, максимальное количество МВ имело размер 233 нм. Эти данные совпадают с данными о размерах МВ, образуемых разными типами клеток [205, 614, 678]. Нами был оценен фенотип МВ и сравнен с фенотипом клеток линии NK-92: изменения экспрессии клетками линии NK-92 адгезионных рецепторов CD11b, CD11c, CD18, CD54, а также рецептора к IFN $\gamma$  слабо отражались на фенотипе МВ, образуемых этими клетками. Рецепторный профиль МВ сильно отличался от фенотипа клеток-источников, в частности менее трети МВ несли на своей мембране CD119, другие поверхностные белки присутствовали в составе мембраны МВ в меньшем количестве. По данным литературы образование клетками МВ сопровождается перестройкой белков цитоскелета, выходом Ca<sup>2+</sup> из кальциевых депо клетки и активацией Rho-киназы [468]. В то же время, так как фенотип МВ отличался от фенотипа клеток-источников, включение в мембрану указанных белков носит случайный характер.

Под влиянием индукторов количество МВ, образуемых клеткой, и их состав может изменяться [89]. Нами впервые продемонстрировано, что как в клетках линии NK-92, так и в образуемых ими МВ содержится перфорин и GrzB, в присутствии РМА и провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  содержание этих белков в МВ и клетках различалось. Например, TNF $\alpha$  не оказывал влияния на содержание GrzB и перфорина в клетках, однако в МВ содержание GrzB повышалось, а содержание перфорина было снижено. Цитокин IL-1 $\beta$  вызывал повышение содержания GrzB и снижение перфорина в клетках, в то время как в МВ отмечено сниженное содержание GrzB, но повышенное содержание перфорина. В присутствии РМА в NK-клетках

было повышено содержание GrzB и перфорины, однако в МВ отмечено только повышенное содержание перфорины. Полученные данные о различающемся влиянии индукторов на содержание цитотоксических белков в НК-клетках и их МВ указывают на существование внутриклеточных механизмов контроля содержимого МВ. По данным литературы GrzB синтезируется как пропептид, проходит последовательно через эндоплазматическую сеть и в аппарат Гольджи, затем подвергаясь упаковке в секреторные гранулы. Описано, что гибель клеток линии K-562 была повышена в случае инкубации с МВ НК-клеток [147], в связи с чем вероятно присутствие GrzB в МВ в активной форме. При помощи флуоресцентного красителя CFSE нами установлена принципиальная возможность передачи содержимого МВ клеткам линии NK-92 клеткам трофобласта линии JEG-3. Соответственно, GrzB может передаваться от НК-клеток клеткам трофобласта посредством МВ.

Однако, нами не выявлено влияния МВ НК-клеток на экспрессию поверхностных рецепторов клеток трофобласта. Ранее нами в похожей модели, где мишенью служили эндотелиальные клетки, показана возможность как передачи белка в составе МВ, так и возможность встраивания мембраны МВ вместе с рецепторами CD45, локализованными на ней, в цитоплазматическую мембрану этих клеток [433]. В той же работе установлено, что МВ клеток линии NK-92 изменяют фенотип эндотелиальных клеток [433]. Микровезикулы клеток линии NK-92 несут на своей поверхности различные рецепторы клетки-источника, в том числе CD45 и CD56. Молекула CD45 - панлейкоцитарный маркер со сравнительно высокой плотностью экспрессии на этих клетках и их МВ [551]. Отсутствие экспрессии трофобластом рецепторов CD45 или CD56 после инкубации с МВ клеток линии NK-92 свидетельствует в пользу отсутствия феномена встраивания мембраны МВ в цитоплазматическую мембрану клеток трофобласта. Таким образом, трофобласт в отличие от эндотелиальных клеток более устойчив к трансферу рецепторов, связанных с цитоплазматической мембраной. Установленное нами отсутствие влияния МВ клеток линии NK-92 на экспрессию трофобластом рецепторов CD54, CD105, CD126, CD130, CD181, CD119, CD120a может свидетельствовать также в пользу стабильности экспрессии именно этих молекул клетками трофобласта. Несмотря на отсутствие данных о влиянии на фенотип трофобласта МВ клеток линии NK-92 снижают пролиферацию, но увеличивают миграцию клеток линии JEG-3 при сохранении их жизнеспособности. В связи с этими данными важен сам факт биологической активности МВ естественных киллеров в отношении трофобласта, дополняющий лиганд-рецепторные и цитокиновые сигналы между этими клетками.

Установленное нами влияние МВ клеток линии NK-92 в отношении пролиферации и миграции клеток трофобласта отражается и в экспрессии факторов транскрипции в этих клетках. Нами установлено, что инкубация клеток трофобласта в присутствии МВ клеток линии NK-92

приводила к активации STAT3 через pSTAT3(Ser727), но не через pSTAT3(Tyr705). Установлено также, что обработка клеток трофобласта MB не приводила к фосфорилированию STAT1 и ERK1/2. Таким образом, в составе MB клеток линии NK-92 содержатся белки, способствующие фосфорилированию STAT3 по остатку Ser727, при этом не влияющие на (либо ингибирующие) фосфорилирование STAT1 и ERK1/2, что проявляется в стимуляции миграции и ингибировании пролиферации клеток трофобласта. Активаторами фосфорилирования STAT3 является RANTES [289, 369], секреция которого нами продемонстрирована для клеток линии NK-92, а также CXCL10, CSCL11 [334, 389, 727], TGFβ1 [44]. Нельзя исключать переноса в составе MB уже фосфорилированной формы pSTAT3(Ser727), что требует дополнительных исследований. При этом ранее в составе MB клеток линии NK-92 методами масс-спектрометрии выявлены разнообразные белки [338, 339], способные активировать различные пути трансдукции, но не обнаружена фосфорилированная форма pSTAT3(Ser727). Таким образом, MB NK-клеток опосредуют дистантную коммуникацию с клетками трофобласта, стимулируя их инвазию (Рисунок 9.4). Изменение состава микровезикул NK-клеток и спектра секретируемых цитокинов может способствовать нарушению взаимодействия с клетками трофобласта и развитию ПНБ.

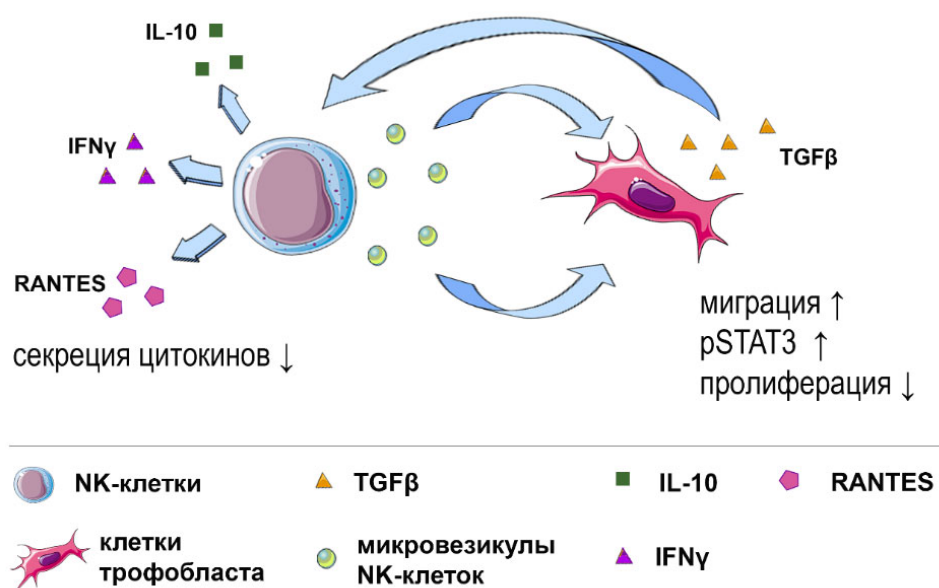


Рисунок 9.4 – Схема влияния клеток линии NK-92 на клетки трофобласта линии JEG-3 посредством растворимых факторов

Так как основной функцией NK-клеток, отражающий степень их зрелости, является цитотоксичность, затем нами была оценена непосредственно эта функция естественных киллеров в отношении клеток трофобласта. Для этого была использована стандартная модель

оценки цитотоксичности НК-клеток к клеткам-мишеням, предполагающая совместную 4-часовую инкубацию клеток. Предварительно в качестве клеток-мишеней нами были использованы клетки линии K-562 и было продемонстрировано, что клетки линии NK-92 в этой модели реализуют цитотоксичность. Увеличение количества эффекторных клеток по отношению к клеткам-мишеням приводило к интенсификации гибели последних. Аналогичные результаты были нами получены и в случае использования в качестве мишеней клеток трофобласта линии JEG-3. Кроме того, нами оценено содержание GrzB и перфорины в клетках трофобласта после контактного и дистантного культивирования с клетками линии NK-92. Установлено, что в клетках трофобласта после контактного культивирования появляется GrzB, параллельно наблюдается снижение его концентрации в клетках линии JEG-3, что подтверждает индукцию гибели клеток трофобласта НК-клетками. После дистантного сокультивирования снижения содержания GrzB и перфорины в НК-клетках не выявлено, что указывает на необходимость контактных взаимодействий для реализации гранзим-опосредованной цитотоксичности.

Помимо формирования пор в плазматической мембране с участием перфорины и последующее проникновение в цитоплазму GrzB [404, 694], возможен и другой способ доставки цитотоксических белков в клетку-мишень. Ранее предполагали, что перфорин и GrzB попадают в клетку путем эндоцитоза с последующим формированием поры в мембране эндосомы, высвобождением ее содержимого в цитоплазму и инициацией апоптоза [280, 450, 560]. Вероятно, что такой способ доставки цитотоксических белков могут обеспечивать МВ, что подтверждается экспериментальными данными о цитотоксической активности самих МВ естественных киллеров [147]. Однако на фоне общего содержания перфорины и GrzB в естественных киллерах не удается установить изменения содержания этих белков за счет предполагаемого транспорта в МВ при дистантном сокультивировании.

Затем было проанализировано содержание каспаз в случае дистантного совместного культивирования клеток линий NK-92 и JEG-3 в течение 24 часов. Нами установлено, что дистантное сокультивирование НК-клеток и клеток трофобласта не сопровождается активацией инициаторной каспазы 8 и эффекторной каспазы 3 в клетках линии JEG-3, характерной для картины развития апоптоза. Снижение исследуемых прокаспазы 8 и прокаспазы 3 в клетках трофобласта может быть обусловлено реализацией их альтернативных неапоптотических функций. Показано, что активация каспазы 8 может сопровождать слияние дифференцированных клеток цитотрофобласта и формирование синцития [239]. Например, клетки трофобласта линии JAR *in vitro* в результате добавления форскалина способны образовывать синцитий [49]. В целом, для клеток линии JAR также, как и для клеток линии JEG-3 не характерна синцитиализация, по сравнению, к примеру, с клетками линии BeWo [53, 100,

709]. Описано, что в клетках линии BeWo после индукции слияния форсколином, отмечено снижение содержания прокаспазы-3 (через 24 часа культивирования) и прокаспазы-8 (через 48 часов культивирования), сопровождавшее образование синцития. Также было отмечено снижение содержания мРНК каспазы 3 и каспазы 8 и активных фрагментов каспазы 3 и каспазы 8 [709]. Сходные изменения, а именно снижение уровня прокаспазы 8 и прокаспазы 3, и отсутствие активных фрагментов каспаз 3 и 8, отмечена нами в клетках JEG-3 после их дистантного сокультивирования с клетками NK-92. Исходя из данных литературы и полученных нами данных о сниженном содержании прокаспазы 8 и прокаспазы 3 после дистантного сокультивирования NK-клеток и клеток трофобласта линии JEG-3, в условиях дистантного сокультивирования с клетками NK-92 вероятно усиление процесса образования синцития клетками линии JEG-3. Так как показано, что МВ синцитиотрофобласта регулируют эндотелиальные клетки за счет содержащихся в них микроРНК [160, 646], нельзя исключать возможности регуляции NK-клетками процесса инвазии и образования синцития клетками трофобласта за счет МВ естественных киллеров.

Также нами проанализировано содержание каспаз в клетках трофобласта результате контактного сокультивирования с клетками линии NK-92 в течение 24 часов. Установлено повышение содержания каспазы 3 и соотношения активного фрагмента каспазы 3 к содержанию прокаспазы 3 в клетках трофобласта линии JEG-3. Расщепление каспазы 3 в клетках является признаком необратимого развития апоптотического процесса и указывает на индукцию апоптоза клеток трофобласта в результате контактного взаимодействия с NK-клетками. В то же время изменений содержания активных форм каспазы 8 не выявлено. Активация каспазы 3 может быть связана не только с воздействием каспазы 8, но и индуцироваться непосредственно белками литических гранул NK-клеток, поступающих в через иммунологический синапс [223]. Белок GrzB обладает сходной с каспазой 8 субстратной активностью в отношении аминокислотной последовательности Ile-Glu-Thr-Asp, что определяет возможность GrzB расщеплять зимогенные формы других каспаз, в частности, каспазы 3 [203, 641, 708]. Кроме того, GrzB может способствовать индукции апоптоза по митохондриальному пути, стимулируя выход цитохрома C в цитоплазму, активацию каспазы 9 и последовательное образование активной формы каспазы 3 [52].

Нами установлено, что предварительная инкубация клеток линии NK-92 в течение 24 часов в среде с цитокинами IL-18, IL-15, TNF $\alpha$  или IL-10 вызывала усиление цитотоксической активности в отношении клеток линии K-562, что согласуется с данными литературы. Так, например, цитотоксическая активность рНК-клеток, предварительно активированных IL-15 или смесью цитокинов IL-15 и IL-18, в отношении клеток линии K-562 повышена по сравнению с

нестимулированными НК-клетками [373]. Показано, что после предварительного культивирования с IL-10 рНК-клетки демонстрировали повышенную литическую активность в отношении клеток К-562 [578]. Описано, что TNF $\alpha$  в комбинации с IL-2 усиливает активирующее влияние IL-2 на НК-клетки, а также стимулирует цитотоксичность НК-клеток в отношении клеток-мишеней *in vitro* [437].

Однако в случае использования клеток трофобласта линии JEG-3 в качестве клеток-мишеней для НК-клеток нами были установлены другие данные. Так, цитотоксическая активность клеток линии НК-92 была повышена в случае предварительной инкубации в течение 24 часов с IL-18, TNF $\alpha$  или IL-10, а в течение 96 часов только с IL-18 или TGF $\beta$ . Отсутствие стимуляции IL-15 цитотоксичности НК-клеток в отношении клеток трофобласта, установленное нами, согласуется с данным литературы. Так, показано, что в присутствии супернатанов, полученных от клеток трофобласта линии Sw.71, цитотоксическая активность клеток линии НК-92, предварительно активированных IL-15, снижена [506]. IL-18 вызывает пролиферацию рНК-клеток [198], усиление цитотоксической активности dNK-клеток и рНК-клеток в отношении клеток К-562 [391, 658], стимулирует повышение секреции IFN $\gamma$  НК-клетками [109]. Кроме того, IL-18 активирует петлю обратной положительной связи, усиливая экспрессию НК-клетками  $\alpha$ -субъединицы рецептора к IL-18 [484]. В совокупности установленное нами увеличение количества NKp44+ НК-клеток в присутствии IL-18 и клеток линии JEG-3 и повышение цитотоксической активности НК-клеток в присутствии IL-18 отражает не только приобретение НК-клетками фенотипа, подобного dNK-клеткам, но и модулирование их функции.

Отсутствие изменений цитотоксичности клеток линии НК-92 в отношении клеток JEG-3 после культивирования с TNF $\alpha$  в течение 96 часов может быть связано с кратковременным эффектом активации клеток линии НК-92 и утратой активированного состояния в результате длительного культивирования. Повышенная цитотоксичность НК-клеток, прокультивированных с TGF $\beta$  в течение 96 часов, связана с ILC-подобной трансформацией НК-клеток. Как описано выше, TGF $\beta$  вызывает супрессию транскрипционного фактора Eomes в НК-клетках селезенки мыши и индуцирует приобретение ими ILC1-подобного фенотипа и экспрессию цитотоксических белков [153]. Полученные данные позволяют говорить об индукции гибели клеток трофобласта НК-клетками преимущественно в условиях их контактного взаимодействия. При этом TGF $\beta$ , секретлируемый клетками трофобласта, может усиливать цитотоксичность НК-клеток.

Так как цитокины микроокружения могут оказывать влияние на гибель клеток трофобласта, нами проведена оценка влияния цитокинов на жизнеспособность клеток трофобласта линии JEG-3 в модели реализации цитотоксической активности НК-клеток,



включающей совместную инкубацию клеток в течение 4 часов. Было установлено, что IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-4, TGF- $\beta$ , bFGF, PLGF в некоторых концентрациях повышали их гибель. Эффект IL-1 $\beta$  на клетки трофобласта связан с тем, что цитоплазматическая часть рецептора IL-1 сходна по своему строению с доменом Toll-like рецепторов (TLR) [278]. Показано, что клетки экстравиллезного трофобласта экспрессируют TLR [329] и IL-1R1 [535]. Связывание TLR2 приводит к усилению апоптоза клеток трофобласта [48], в то время как взаимодействие LPS с TLR4 стимулирует клетки трофобласта синтезировать цитокины и хемокины [48]. Связывание белков теплового шока с рецептором TLR4 приводит к усилению апоптотической гибели клеток трофобласта [201]. Однако, продемонстрировано, что в концентрации 10 Ед/мл IL-1 $\beta$  стимулирует пролиферацию клеток линии JEG-3 [612]. Нами установлено, что IL-1 $\beta$  в концентрации 10 Ед/мл не вызывал гибель клеток линии JEG-3, в то время как большие концентрации IL-1 $\beta$  стимулировали их гибель. Ранее показано, что IFN $\gamma$  также усиливает пролиферацию клеток трофобласта в концентрациях 40 и 400 Ед/мл, но не 1000 Ед/мл [612], что согласуется с полученными нами результатами: IFN $\gamma$  вызывал гибель клеток трофобласта также в концентрации 1000 Ед/мл.

Нами установлено, что IL-6 вызывал увеличение гибели клеток трофобласта. По данным литературы IL-6 стимулирует инвазию клеток трофобласта [446] и ингибирует апоптоз клеток [132, 387]. Непосредственно клетки трофобласта являются источником IL-6 в плаценте и могут стимулировать дифференцировку макрофагов в тип M2 [181]. Однако, продемонстрировано, что *in vitro* под влиянием IL-6 увеличивается количество клеток трофобласта, дезинтегрированных от эксплантатов плацент, в то же время в этих клетках трофобласта выявляли меньшее содержание каспаз 3 и 7 по сравнению с необработанными клетками [131]. Также показано, что IL-6 вызывал снижение экспрессии HLA-G клетками трофобласта линии JEG-3, однако эти изменения наблюдались после 72 часов стимуляции [515], в нашей работе инкубация составляла 4 часа. Соответственно, выявленная нами повышенная гибель клеток трофобласта в присутствии IL-6 не связана с каскадом апоптотических реакций.

Среди цитокинов маточно-плацентарного комплекса присутствует IL-4 [167]. Описано стимулирование экспрессии HLA-G клетками трофобласта линии JEG-3 под воздействием IL-4 [515], а также усиление пролиферации и инвазии клеток трофобласта линии HTR-8/SVneo [377]. Однако также показано, что IL-4 стимулирует апоптоз лимфоидных клеток, например, CD34+ клеток [425] и Т-лимфоцитов [757]. Нами установлено, что после 4-часовой инкубации IL-4 усиливает гибель клеток трофобласта, а после 24-часовой экспозиции IL-4 стимулирует экспрессию CD54 клетками трофобласта. Выявленные нами эффекты и описанные в литературе данные можно интерпретировать как стимуляцию IL-4 наиболее активированных, находящихся в фазе G2/S/M клеток трофобласта, сопровождающуюся гибелью менее активированных.

Косвенно это подтверждается тем, что клетки трофобласта в плаценте различаются по ploидности: в процессе инвазии ploидность клеток трофобласта возрастает до 4-16с [777]. Снижение ploидности клеток трофобласта ассоциировано с их старением [777].

Согласно полученным нами данным цитокины TGF $\beta$  и bFGF стимулировали гибель клеток трофобласта. Отметим, что по данным литературы распределение bFGF в плаценте неоднородно и снижается при дифференцировке цитотрофобласта в синцитиотрофобласт [123]. Несмотря на то, что TGF $\beta$  секретируют клетки трофобласта, показано усиление адгезии и снижение миграции клеток трофобласта в присутствии TGF $\beta$  [770]. Установлено также, что TGF $\beta$  вместе с IL-6 и TNF- $\alpha$  могут активировать некроптоз у клеток трофобласта [131]. В целом, показано, что отдельные цитокины, являющиеся составляющей цитокинового окружения в маточно-плацентарном комплексе, в некоторых концентрациях стимулируют гибель клеток трофобласта. Продемонстрированные эффекты могут являться изолированной частью процесса инвазии клеток трофобласта, которая сопровождается гибелью зрелых клеток и пролиферацией незрелых.

Далее нами был оценен эффект, который цитокины оказывали на цитотоксичность НК-клеток к клеткам трофобласта. Показано, что в присутствии цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN $\gamma$ , IL-8, IL-4, TGF $\beta$ , GM-CSF, bFGF и НК-клеток гибель клеток трофобласта возрастала. Однако так как непосредственно цитокины IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN $\gamma$ , IL-4, TGF $\beta$ , bFGF в некоторых концентрациях повышали гибель клеток трофобласта, невозможно оценить, на сколько указанные цитокины влияли на НК-клетки. В связи с этим нами оценены варианты эксперимента, в которых жизнеспособность клеток трофобласта на фоне присутствия цитокина отличалась до и после внесения НК-клеток: IL-1 $\beta$  (10 Ед/мл), IFN $\gamma$  (40 Ед/мл и 400 Ед/мл), IL-8 (1нг/мл, 10 нг/мл, 100нг/мл), TGF $\beta$  (1 нг/мл) и GM-CSF (1000 Ед/мл). В присутствии этих цитокинов в указанных концентрациях гибель клеток трофобласта не отличалась от базовой, однако при совместной инкубации с НК-клетками гибель клеток трофобласта была повышена. Соответственно, указанные цитокины оказывали воздействие на НК-клетки, меняя их цитотоксичность.

Данные об усилении цитотоксичности НК-клеток под влиянием IL-1 $\beta$  получены достаточно давно [279]. Продемонстрировано, что IL-1 $\beta$  стимулирует дифференцировку НК-клеток из стволовых клеток, ингибируя формирование популяции ILC3 [61]. Иммуногистохимическое окрашивание позволило установить присутствие IL-1 $\beta$  как в синцитио-, так и цитотрофобласте, а также снижение экспрессии IL-1 $\beta$  в III триместре беременности по сравнению I триместром. В отношении IFN $\gamma$  продемонстрировано, что этот цитокин стимулирует экспрессию ICAM-1 на клетках-мишенях, облегчая формирование иммунологического синапса с НК-клеткой и таким образом стимулируя цитотоксичность последних [70]. Выявленная повышенная цитотоксичность НК-клеток в отношении клеток

трофобласта в присутствии TGF $\beta$  совпадает с полученными нами результатами после предварительной инкубации NK-клеток с TGF $\beta$ . В совокупности это подтверждает необходимость присутствия популяции NK-клеток с цитотоксическим потенциалом в децидуальной оболочке I триместра для сдерживания чрезмерной инвазии клеток трофобласта. Более того, клетки трофобласта за счет секреции цитокинов, в частности IL-1 $\beta$ , стимулируют цитотоксичность NK-клеток.

Повышенная цитотоксичность NK-клеток в присутствии GM-CSF согласуется с представленными в литературе данными: например, для стимуляции противоопухолевой активности NK-клеток применяют химерный белок GM-CSF/IL-2 [511]. По некоторым данным, IL-8 и IL-6 могут секретировать отдельные виды опухолевых клеток, снижая противоопухолевую активность естественных киллеров [720]. Кроме того, IL-8 является хемокином для NK-клеток, и секретируется dNK-клетками [209]. Однако по нашим данным в присутствии IL-8 цитотоксический потенциал NK-клеток возрастал. Ранее в отделе иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «НИИ АГиР им.Д.О.Отта» было установлено, что у женщин с преэклампсией клетки плаценты секретируют IL-8 в большем количестве, чем у женщин с физиологической беременностью в I триместре [28]. Соответственно, IL-8 вносит вклад в патогенез патологии беременности, и одним из его эффектов является стимуляция цитотоксических реакций. В настоящей работе нами также установлено и описано выше, что после миграции по градиенту концентрации IL-8 повышается количество NK-клеток, экспрессирующих CD11a, CD11b, CD11c и CD18. Так как CD11a/CD18 является адгезионной молекулой, участвующей в образовании иммунологического синапса, можно предположить связь процесса миграции NK-клеток и повышенной гибели клеток-мишеней.

Сниженная цитотоксическая активность естественных киллеров выявлена только в присутствии PLGF. Авторами A. Tsiakkas et al. описано повышение концентрации PLGF в сыворотке беременных женщин в течение беременности и пиком концентрации на 30-ой неделе [663]. Цитокин PLGF усиливает действие VEGF [214, 630], который в свою очередь снижает цитотоксичность NK-клеток и таким образом стимулирует выживание клеток трофобласта [309, 697].

Таким образом, мы установили увеличение цитотоксичности NK-клеток в присутствии большинства цитокинов, за исключением PLGF. Однако наличие стимулирующего цитотоксичность эффекта наблюдалось преимущественно для высоких доз цитокинов. Так как цитокиновый профиль клеток плаценты различается в I и III триместре беременности [28, 174] нами был оценен совокупный эффект КС ворсин хориона на цитотоксичность NK-клеток. Установлено, что КС ворсин хориона I триместра усиливают цитотоксичность NK-клеток в

отношении клеток трофобласта по сравнению с неактивированными клетками. КС III триместра не вызывают повышенной цитотоксичности НК-клеток. Выявленные различия объясняются тем, что в регуляции процессов, происходящих в I триместре, участвуют цитокины, стимулирующие цитотоксичность естественных киллеров: имплантация, регулируемая в том числе IL-6 и IL-1 $\beta$  [257], пролиферация и инвазия трофобласта, регулируемая IFN $\gamma$  [355, 397]. Соответственно, можно предположить, что развитие физиологической беременности связано с модулированием функциональной активности НК-клеток, а ПНБ ассоциировано нарушением регуляции взаимодействия НК-клеток с клетками микроокружения.

Естественные киллеры могут индуцировать рецептор-опосредованный механизм индукции гибели клеток-мишеней. Для НК-клеток характерна экспрессия FasL, показана его локализация в мембранных везикулах, находящихся в цитолитических гранулах [368]. После формирования иммунологического синапса часть этих везикул перемещается в область контакта с клеткой-мишенью [368]. В модели оценки цитотоксической активности нами установлено, что клетки линии НК-92 также экспрессируют Fas, что находит подтверждение и в литературе [478]. Несмотря на то, что экспрессия Fas делает клетки уязвимыми для НК-клеток микроокружения, было показано, что связывание Fas не приводило к выраженному увеличению количества мертвых НК-клеток: менее 10% клеток экспрессировали аннексин V [478]. После связывания Fas клетки линии НК-92 оставались способны реализовывать цитотоксичность, однако в меньшей степени, чем интактные клетки [478]. Установленное нами повышенное количество Fas<sup>+</sup> НК-клеток и интенсивность экспрессии Fas в присутствии TNF $\alpha$  отражает механизм ауторегуляции НК-клеток в условиях воспаления.

По данным литературы, естественные киллеры мыши экспрессируют TRAIL, показано, что клетки линии НК-92 также несут на своей поверхности TRAIL и его рецепторы DR4 и DR5 [114]. Показано, что клетки трофобласта линии JEG-3 содержат мРНК функционального рецептора TRAIL - DR5 и рецептора-ловушки DcR1, не вызывающего активации каспаз [721]. Несмотря на то, TRAIL является лигандом, вызывающим апоптоз, описано, что TRAIL, экспрессируемый НК-клетками, связываясь со своими лигандами, также активирует сигнальный путь IL-15, задействующий фосфорилирование белков АКТ и S6, в НК-клетках. Это приводит к повышению синтеза GrzB естественными киллерами [114]. Hofle et al. показали, что экспрессия CD107a НК-клетками коррелирует с повышенной экспрессией TRAIL на мембране естественных киллеров [284]. Повышение экспрессии TRAIL связано непосредственно с процессом дегрануляции естественных киллеров, так как показано, что блокирование TRAIL ингибирует, а связывание белков DR4 и DR5 стимулирует экспрессию CD107a [284]. Взаимодействие TRAIL с рецептором-ловушкой DcR1 приводит к незначительному повышению

экспрессии CD107a NK-клетками [284]. Связывание TRAIL вызывает продукцию NK-клетками  $IFN\gamma$ , однако не влияет на адгезию к клеткам-мишеням [284]. Под влиянием препаратов  $IFN\beta$  NK-клетки повышают экспрессию TRAIL и характеризуются повышенной цитотоксичностью [420]. В случае культивирования естественных киллеров на фидерном слое клеток в присутствии IL-2 и IL-21 количество NK-клеток значительно увеличивается, а также возрастает их экспрессия TRAIL и рецепторов NKG2D и DNAM-1 [17, 255].

Нами было проанализировано влияние цитокинов на экспрессию клетками линии NK-92 TRAIL, рецепторов TRAIL, и установлено, что IL-15 вызывал снижение количества NK-клеток, экспрессирующих функциональные рецепторы DR4 и DR5. Цитокин IL-15 по своим эффектам в отношении NK-клеток является прејотропным, демонстрирующим в зависимости от условий микроокружения как стимуляцию цитотоксических функций NK-клеток, локализованных в опухолях, так и стимуляцию лимфопролиферативных заболеваний [414]. Так как нами не выявлено изменений интенсивности экспрессии DR4 или DR5 NK-клетками в присутствии IL-15, вероятно, снижение количества DR4<sup>+</sup> DR5<sup>+</sup> NK-клеток обусловлено их гибелью. Нами продемонстрировано, что количество DR5<sup>+</sup> NK-клеток и интенсивность экспрессии ими DR5 были снижены в результате инкубации клеток с TGF $\beta$ . При исследовании экспрессии рецепторов TRAIL клетками печени было показано, что в отсутствие индукторов NK-клетки экспрессируют как DR5, так и DcR1 и DcR2 [603]. Таким образом, баланс сигналов от функциональных рецепторов TRAIL и рецепторов-ловушек определяет вероятность индукции апоптоза. Естественные киллеры характеризуются экспрессией как тех, и других рецепторов TRAIL, что демонстрирует их способность к регуляции собственной численности.

В результате инкубации с клетками трофобласта линии JEG-3 нами впервые была установлена сниженная экспрессия TRAIL, DR5, DcR1, а также сниженное количество NK-клеток, экспрессирующих эти рецепторы. В целом эти изменения в совокупности с данными о цитотоксичности клеток линии NK-92 в отношении клеток линии JEG-3 объясняются тем, что NK-клетки сохраняют за собой функции эффекторных клеток, избегая апоптоза и сохраняя функциональную активность. Установленное снижение после взаимодействия с клетками трофобласта количество CD107a<sup>+</sup> NK-клеток связано, вероятно, с истощением содержания литических гранул. Тем не менее, снижение экспрессии DcR1 NK-клетками после инкубации с клетками трофобласта указывает на наличие ингибиторного действия клеток трофобласта на естественные киллеры.

Нами установлено, что под влиянием КС I триместра повышено количество FasL<sup>+</sup> NK-клеток, что согласуется с ролью NK-клеток в качестве активных регуляторов процесса инвазии бластоцисты и формирования плаценты. Однако в присутствии КС ворсин хориона I триместра нами также выявлено снижение экспрессии NK-клетками TRAIL по сравнению с интактными

клетками. Мы также оценили влияние КС на NK-клетки в присутствии клеток трофобласта. Как и в случае отсутствия индукторов, так и в присутствии КС I триместра клетки трофобласта вызывали снижение количества CD107a+ NK-клеток. Выявленное сниженное количество DR4+ и DR5+ NK-клеток в присутствии КС I триместра и клеток трофобласта также, вероятно, связано с тем, что в I триместре цитотоксическая функция NK-клеток необходима для физиологического развития плаценты. Соответственно, механизмы индукции гибели NK-клеток, в том числе посредством связывания TRAIL его рецепторами, ингибированы. Однако в присутствии КС III триместра и клеток трофобласта экспрессия DR4 и DR5 также была снижена. По-видимому, сохранение некоторого количества функционально активных NK-клеток важно на протяжении всей беременности. В присутствии клеток трофобласта под влиянием КС III триместра снижено количество NK-клеток, экспрессирующих DcR1, по сравнению с уровнем экспрессии только в присутствии клеток трофобласта. Так как DcR1 является рецептором-ловушкой, «защищающей» NK-клетки от сигналов индукции апоптоза, снижение количества NK-клеток, экспрессирующих его, ассоциировано со снижением значимости NK-клеток для пролонгирования беременности в III триместре.

Так как нами установлено, что после длительного контактного сокультивирования с клетками трофобласта линии JEG-3 NK-клетки изменяли фенотип и экспрессию транскрипционных факторов, мы также оценили их цитотоксическую функцию. Установлено, что после 96 часов сокультивирования NK-клетки характеризовались сниженной цитотоксичностью. Для того, чтобы определить механизмы регуляции клетками трофобласта цитотоксической активности естественных киллеров было проанализировано содержание гранзима А, гранзима В, а также серпинов В9 и В6 в NK-клетках после сокультивирования с клетками трофобласта.

Серпины являются ингибиторами протеаз, семейство которых насчитывает более 1000 видов, разделенных на 16 подгрупп. Описано, что серпины ингибируют различные протеазы, в том числе связанные с воспалительными реакциями, активацией системы комплемента и свертыванием крови [704]. Одним из белков семейства серпинов является серпин В9 (proteinase inhibitor-9 (PI-9)) [704], этот белок участвует в регуляции цитотоксичности NK-клеток [95, 429]. Взаимодействие GrzB с PI-9 необратимо и ведет к образованию стабильного неактивного комплекса [560]. В случае выхода из лизосомальной гранулы GrzB может вызвать апоптоз клетки-источника. По мере увеличения стимуляции NK-клеток и повторного связывания с клетками-мишенями (в процессе серийного убийства) в NK-клетках повышается содержание GrzB, в том числе из-за выхода из гранул. В результате баланс GrzB и серпина В9 смещается, что вызывает апоптоз NK-клеток и препятствует их чрезмерной цитотоксичности [95].

Поврежденные лизосомы выявлены в НК-клетках, формирующих конъюгаты с клетками-мишенями [95]. Показано, что пермеабиллизация лизосомальных гранул может также происходить в результате повторного связывания CD16 или CD2 на НК-клетке [95].

Клетки линии K-562 экспрессируют серпин В9 с низкой интенсивностью [223]. При использовании клеток линии K-562, трансфецированных серпином В9, НК-клетки образовывали с ними конъюгаты, время полужизни которых было больше, чем в случае с немодифицированными клетками-мишенями [64]. На основании этих данных делают вывод о более продолжительном контакте НК-клетки с клеткой-мишенью в случае невозможности НК-клетки реализовать цитотоксичность [64]. Также показано, что в случае замедленной диссоциации НК-клеток из конъюгата с клеткой-мишенью естественные киллеры продуцируют больше цитокинов TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  [64]. Связывание НК-клеткой клетки-мишени сопровождается образованием в НК-клетке активных радикалов кислорода, под влиянием которых серпин В9 инактивируется, что усиливает апоптоз НК-клеток [428]. Показано, что экспрессия серпина В9 связана с созреванием НК-клеток, у мышей с нарушенным синтезом серпина В9 повышалась GrzB-зависимая апоптотическая гибель НК-клеток [429]. Для dNK-клеток показана экспрессия PEDF, который является эндогенным гликопротеином семейства серпинов и кодируется геном *SERPINF1* [771]. Рецептор к PEDF выявлен на децидуальных стромальных клетках, что указывает на участие PEDF в регуляции клеточных взаимодействий децидуальной оболочки. В то же время pNK-клетки характеризуются сниженным синтезом PEDF. Снижение экспрессии PEDF в dNK-клетках ассоциировано с ПНБ [771]. Под влиянием клеток трофобласта линии HTR-8 и децидуальных стромальных клеток количество PEDF+ НК-клеток среди pNK-клеток возрастало. На основании этих результатов предполагают возможность формирования пула dNK-клеток в результате влияния клеточного микроокружения матки [771].

Иммуногистохимическое исследование плацент разных сроков гестации показало, что клетки экстравиллезного цитотрофобласта и ворсинчатого цитотрофобласта экспрессируют серпин В9 в течение всей беременности, в то время как синцитиотрофобласт начинает экспрессировать этот белок только в конце III триместра [108]. Также установлено, что клетки трофобласта линий BeWo и JAR экспрессируют серпин В9 [108]. Кроме того, в клетках экстравиллезного трофобласта установлено наличие mPNC серпина 2, описана активация его экспрессии под влиянием фактора BMP2, и участие в регуляции инвазивной активности клеток [745]. На мышах продемонстрирована экспрессия серпина В6b в децидуальной оболочке, а также влияние серпина В6b на децидуализацию за счет стимуляции MMP2 и MMP9 [750].

Нами впервые продемонстрировано, что клетки линии NK-92 содержат GrzA, GrzB, перфорин, а также серпин В9. Экспрессии серпина В6 выявлено не было. Также нами впервые установлено, что после длительного совместного культивирования НК-клеток и клеток

трофобласта линии JEG-3 интенсивность экспрессии NK-клетками GrzA, GrzB и перфорины была снижена. Эти результаты также согласуются с полученными нами данными о снижении цитотоксической активности NK-клеток в результате длительного сокультивирования. Описано, что dNK-клетки содержат GrzA [685]. Так как по данным литературы содержание GrzB и перфорины в dNK-клетках снижено по сравнению с pNK-клетками [293], полученные нами результаты подтверждают предположение о вкладе клеток трофобласта в приобретение естественными киллерами характеристик dNK-клеток.

Факторы микроокружения могут влиять на взаимодействие NK-клеток и клеток трофобласта. Например, нами установлено, что в случае совместного культивирования клеток линии NK-92 и клеток трофобласта в присутствии TNF $\alpha$  и IL-15 интенсивность экспрессии NK-клетками GrzA была повышена по сравнению с совместным культивированием клеток в отсутствие цитокинов. Подобное усиление экспрессии цитотоксических белков NK-клетками согласуется с данными литературы о стимуляции IL-15 цитотоксического ответа NK-клеток [194, 414], а также с установленным нами снижением интенсивности экспрессии CD56 NK-клетками в присутствии TNF $\alpha$ . Кроме того, в литературе описано, что при ПНБ dNK-клетки характеризуются повышенной экспрессией GrzB, перфорины, и гранулизина, с чем связывают их повышенную цитотоксическую активность [375, 475, 620]. При ПНБ также установлена повышенная секреция dNK-клетками TNF $\alpha$  [390]. Таким образом, установленное нами повышение содержания GrzA в клетках линии NK-92 под влиянием TNF $\alpha$  дополняет данные литературы и позволяет предполагать усиление синтеза GrzA в NK-клетках при ПНБ. Кроме того, в используемой модельной системе нами установлено, что в присутствии естественных киллеров линии NK-92 и TNF $\alpha$  экспрессия HLA-G клетками трофобласта усиливается. Экстраполируя полученные данные на систему *in vivo*, можно предположить, что клетки трофобласта в провоспалительном цитокиновом окружении могут активировать защитные механизмы, препятствующие их гибели в условиях воспаления.

В случае сокультивирования клеток линии NK-92 и клеток трофобласта в присутствии IFN $\gamma$  экспрессия GrzA и GrzB также, как и без цитокинов, была снижена в NK-клетках, однако количество NK-клеток, экспрессирующих перфорин и интенсивность его экспрессии не изменялись. Также не выявлено изменений количества NK-клеток, экспрессирующих серпин B9 и его интенсивности экспрессии в присутствии IFN $\gamma$ . В то же время содержание GrzB и перфорины было повышено в клетках трофобласта в случае инкубации с NK-клетками и IFN $\gamma$ . Так как по нашим данным клетки линии NK-92 экспрессируют рецептор к IFN $\gamma$  (CD119), NK-клетки под влиянием IFN $\gamma$  могут усиливать свои цитотоксические характеристики. Так как серпин B9 в клетках-мишенях блокирует GrzB-зависимое образование активной каспазы 3 [223],



отсутствие изменений его экспрессии НК-клетками подтверждает их жизнеспособность и повышенный в присутствии IFN $\gamma$  цитотоксический потенциал.

Нами продемонстрировано, что в присутствии IL-15 снижено количество серпин B9+ клеток трофобласта и их интенсивность экспрессии серпина B9. Также установлено, что в IL-15 вызывал повышение интенсивности экспрессии GrzA в НК-клетках и повышение количества GrzA+ клеток трофобласта после сокультивирования. При анализе фенотипических характеристик НК-клеток в присутствии клеток трофобласта нами установлено, что IL-15 вызывает ИЛС-подобное изменение фенотипа естественных киллеров. Кроме того, по данным литературы среди dNK-клеток можно выделить субпопуляции, различающиеся по интенсивности экспрессии гранзимов и перфорина [685]. В совокупности эти данные подтверждают предположение о возможности НК-клеток к трансформации в другие ИЛС в присутствии клеток трофобласта и IL-15.

Нами установлено, что IL-10 вызывал снижение количества клеток трофобласта, экспрессирующих серпин B9, а также интенсивность его экспрессии, в случае монокультуры. Ранее упоминалось, что IL-10 является фактором, снижающим инвазию клеток трофобласта [558]. Кроме того, описано, что макрофаги, предварительно обработанные IL-10, вызывали снижение секреции серпина B1 клетками трофобласта [547]. Как уже упоминалось, IL-18 усиливает продукцию IFN $\gamma$  и цитотоксическую активность НК-клеток [660]. Нами установлено, что взаимодействие НК-клеток и клеток трофобласта в присутствии IL-18 в использованной модельной системе сопровождалось снижением экспрессии клетками трофобласта серпина B9. Таким образом, IL-10 и IL-18 могут способствовать сдерживанию инвазии клеток трофобласта, в том числе повышая их чувствительность к цитотоксическому действию НК-клеток.

Так как ранее мы установили, что TGF $\beta$  регулирует секрецию цитокинов и фенотип клеток трофобласта, ожидаемо было установленное повышение экспрессии HLA-G клетками трофобласта в его присутствии. Для НК-клеток характерна экспрессия рецепторов ИЛТ и KIR2DL4, связывающих молекулы локуса HLA-G, экспрессируемые клетками трофобласта. Взаимодействие этих рецепторов с молекулами локуса HLA-G препятствует активации цитотоксической функции НК-клеток [656]. Однако в случае взаимодействия с НК-клетками нами не было выявлено влияния TGF $\beta$  на клетки трофобласта за исключением повышения содержания GrzA. Кроме того, по нашим данным в присутствии TGF $\beta$  НК-клетки сохраняли экспрессию перфорина, не снижая ее при контактных взаимодействиях с клетками трофобласта, как это установлено в отсутствие цитокинов и в присутствии IL-15, IL-18, IL-10, TNF $\alpha$ . Кроме того, выше описано, что после предварительной инкубации НК-клеток с TGF $\beta$  они демонстрировали повышенную цитотоксичность в отношении клеток трофобласта. Таким образом, TGF $\beta$  усиливает защитные механизмы клеток трофобласта, однако также

поддерживает реализацию цитотоксичности НК-клеток. В случае контактных взаимодействий естественные киллеры передают цитотоксические белки в клетки трофобласта.

В целом, дистантные механизмы влияния НК-клеток на клетки трофобласта, а именно секретируемые цитокины и образуемые НК-клетками МВ, вносят вклад в регуляцию функционального состояния клеток трофобласта, но не приводят к индукции апоптоза. Контактные механизмы взаимодействия НК-клеток и клеток трофобласта, опосредуемые рецепторами, приводят к индукции апоптоза клеток трофобласта. Факторы, секретируемые клетками плаценты в I триместре беременности, усиливают цитотоксическую активность НК-клеток, что отражает участие этих клеток в регуляции формирования плаценты. Под влиянием КС III триместра количество НК-клеток, экспрессирующих рецептор-ловушку DcR1, снижено, что делает их более чувствительными к индукции рецептор-опосредованного апоптоза. Клетки трофобласта обладают механизмом защиты от индукции апоптоза естественными киллерами, который связан с экспрессией серпина B9. В зависимости от цитокинов микроокружения баланс взаимодействия НК-клеток и клеток трофобласта может меняться как в сторону усиления цитотоксических реакций, так и индукции регуляторной кооперации (Рисунок 9.5).

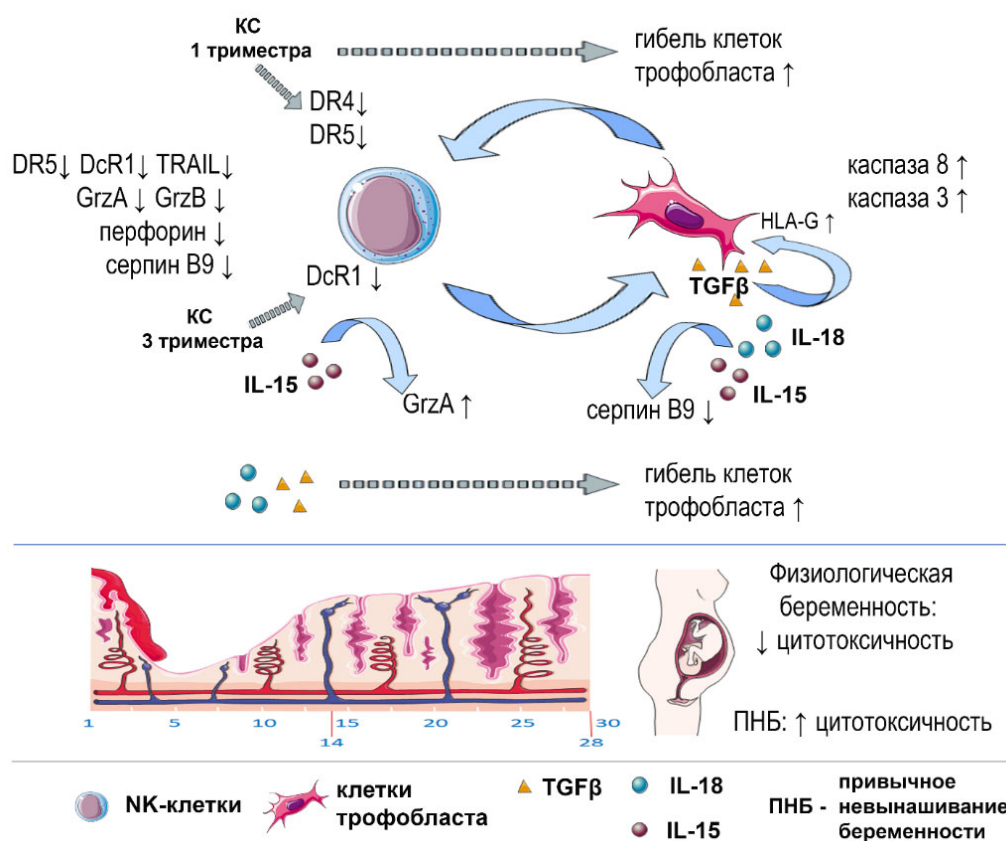


Рисунок 9.5 - Схема цитотоксического влияния клеток линии NK-92 и pNK-клеток женщин с физиологической беременностью и женщин с ПНБ на клетки трофобласта линии JEG-3

Для проверки результатов, полученных с использованием клеточной линии NK-92, нами была оценена цитотоксическая активность рNK-клеток и spNK-клеток. Так как функциональную активность NK-клеток важно оценивать в том числе в ходе беременности, использование dNK-клеток невозможно. Кроме того, получение dNK-клеток инвазивно, так как предполагает проведение биопсии [645]. По данным литературы, функциональное состояние рNK-клеток в целом отражает функциональное состояние NK-клеток матки [504]. Однако согласно полученным нами данным длительное контактное культивирование рNK-клеток с клетками трофобласта сопряжено со снижением пролиферации в отсутствие других мононуклеарных клеток. В то же время изменения фенотипа рNK-клеток в составе мононуклеарной фракции в присутствии клеток трофобласта частично отличались от изменений, выявленных для клеток линии NK-92. При анализе цитотоксической активности установлено, что гибель клеток трофобласта возростала как в случае использования рNK-клеток, так и spNK-клеток. В присутствии IL-2 цитотоксичность NK-клеток, реализуемая к клеткам трофобласта, была повышена по сравнению с активностью без IL-2, как в случае использования рNK-клеток, так и spNK-клеток. Также нами показано, что цитотоксичность рNK-клеток в отношении клеток трофобласта не различалась между группами здоровых мужчин и здоровых небеременных женщин. Полученные данные свидетельствуют об одинаковом базисном функциональном состоянии NK-клеток вне зависимости от пола.

Цитотоксичность проинкубированных без IL-2 NK-клеток в отношении клеток трофобласта во всех группах обследованных женщин не различалась для рNK-клеток, так и spNK-клеток. Таким образом, рNK-клетки реализуют цитотоксичность в отношении клеток трофобласта линии JEG-3. По данным литературы, IL-2 вызывает повышение цитотоксической активности NK-клеток [335]. Однако, присутствие экзогенного IL-2 и клеток трофобласта способствует не просто активации NK-клеток, но моделированию их функционального состояния. В работе нами установлено, что в случае использования прокультивированных с IL-2 мононуклеаров, полученных от беременных женщин в I триместре цитотоксичность NK-клеток в отношении клеток трофобласта была снижена по сравнению с группами небеременных женщин. Установленные различия, вероятно, связаны с модуляцией цитотоксичности NK-клеток при беременности.

Для полноценной модуляции функций NK-клеток необходимо присутствие и других мононуклеаров периферической крови, а также секретируемых ими цитокинов. Так, помимо клеток трофобласта источником TGF $\beta$  являются T-регуляторные клетки [517]. Макрофаги децидуальной оболочки также секретируют TGF $\beta$  [146], что дополнительно влияет на цитотоксичность NK-клеток в составе мононуклеаров и создает условия для модуляции их функционального состояния. В случае использования spNK-клеток, их цитотоксичность в

присутствии IL-2 не различалась у небеременных и беременных женщин. Вероятно, это связано с отсутствием дополнительного ингибиторного сигнала со стороны Т-лимфоцитов и макрофагов. Однако, нами установлено, что у фертильных женщин цитотоксичность spNK-клеток снижена по сравнению с группой небеременных женщин. Описано, что NK-клетки, подобные клеткам памяти, могут формироваться под влиянием клеток трофобласта [237], и пул этих клеток могут образовывать как CD56<sup>bright</sup>, так и CD56<sup>dim</sup> NK-клетки [555]. Измененное функциональное состояние NK-клеток у женщин, которые ранее были беременны, может являться следствием контактных взаимодействий NK-клеток и клеток трофобласта при предшествовавших беременностях. Поскольку как Т-лимфоциты, так и макрофаги присутствуют в децидуальной оболочке при беременности [249, 616], в дальнейших экспериментах по оценке цитотоксичности NK-клеток нами использована модельная система с применением моноклеарной фракции.

Для определения вклада функциональных характеристик NK-клеток в развитие ПНБ далее нами была оценена цитотоксичность pNK-клеток у женщин с этой патологией. Для этого были сформированы группы женщин с учетом фазы менструального цикла. Установлено, что цитотоксический эффект NK-клеток в отношении клеток трофобласта был выше в присутствии IL-2 во всех обследованных группах пациентов. Установлено, что цитотоксическая активность NK-клеток была снижена у небеременных женщин без акушерского анамнеза, а также у небеременных фертильных женщин в секреторной фазе менструального цикла, и не отличалась от цитотоксичности NK-клеток у женщин с физиологической беременностью. Учитывая возможность образования NK-клеток матки за счет миграции из периферической крови, данные различия могут быть следствием подготовки эндометрия к имплантации бластоцисты, происходящей через 6-7 дней после овуляции и оплодотворения яйцеклетки [487]. В этот период происходит увеличение количества NK-клеток в матке [370, 680], изменение секреции цитокинов NK-клетками и макрофагами, изменение экспрессии адгезионных молекул эндометриальными клетками [680]. Вероятно, происходящие в ходе менструального цикла изменения гормонального фона влияют не только на представительство клеточных популяций в матке [370, 487], но и на функциональные характеристики pNK-клеток.

Установлено, что у небеременных женщин с ПНБ цитотоксичность NK-клеток по отношению к клеткам трофобласта была повышена в секреторной фазе цикла по сравнению с пролиферативной фазой и по сравнению с соответствующим показателем для группы небеременных фертильных женщин в секреторной фазе цикла. Таким образом, у небеременных фертильных женщин наблюдается снижение цитотоксической активности NK-клеток в секреторной фазе цикла, а в группе небеременных женщин с ПНБ цитотоксичность возрастает.

У беременных женщин с ПНБ в анамнезе цитотоксичность естественных киллеров по отношению к клеткам трофобласта снижена по сравнению с соответствующим показателем у

небеременных женщин с ПНБ в секреторной фазе менструального цикла. По-видимому, данные различия являются следствием наступления беременности и регуляторных воздействий со стороны клеток децидуальной оболочки (макрофагов, Т-регуляторных клеток [615, 616]), способствующих имплантации и плацентации, а также прогестерона, секретируемого желтым телом и хорионом [487, 501].

На основании результатов исследования функциональной активности НК-клеток при ПНБ можно предположить, что у здоровых женщин в ходе менструального цикла цитотоксическая активность НК-клеток в отношении трофобласта изменяется, в пролиферативной фазе она повышена, в секреторной фазе - снижена (Рисунок 9.5). Данные изменения могут определять успешность имплантации бластоцисты и наступления беременности. Повышенные показатели цитотоксической активности НК-клеток у женщин с ПНБ секреторной фазе цикла могут способствовать повторному невынашиванию беременности. Необходимо отметить, что в настоящее время по данным литературы исследование содержания НК-клеток и их цитотоксической активности не рассматривается, как первоочередное при ведении пациенток с привычным невынашиванием беременности [350, 461, 652]. На основании полученных данных рекомендуется ввести диагностику иммунологических нарушений, в том числе мониторинг цитотоксической активности НК-клеток в отношении клеток трофобласта в практику ведения пациенток с ПНБ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие беременности сопровождается модуляцией реакций иммунной системы матери, способствующей успешной имплантации и инвазии бластоцисты в матку. В эндометрии и децидуальной оболочке присутствует популяция естественных киллеров [166, 190, 240, 393, 698, 734], актуально определение механизмов формирования пула dNK-клеток. Полученные в настоящем исследовании данные позволяют утверждать, что миграция NK-клеток в матку может быть опосредована клетками трофобласта, присутствующими в кровеносных и лимфатических сосудах децидуальной оболочки, за счет экспрессии трофобластом адгезионных рецепторов, характерных для эндотелиальных клеток. Так, впервые с использованием клеточных линий NK-92 и JEG-3 установлена экспрессия адгезионного рецептора CD54 клетками трофобласта и различия в экспрессии NK-клетками лигандов этого рецептора - молекул адгезии CD11/CD18 до и после контакта с клетками трофобласта. Проведены функциональные тесты адгезии и трансмиграции естественных киллеров, подтверждающие обеспечение миграции NK-клеток через монослой клеток трофобласта.

Впервые установлено, что совокупное влияние факторов, секретируемых клетками плаценты, вызывало повышение экспрессии клетками трофобласта рецепторов адгезии к внеклеточному матриксу, что свидетельствует о возможности регуляции инвазии клеток трофобласта посредством цитокинов маточно-плацентарного комплекса. В работе продемонстрировано, что ростовые факторы VEGF и PLGF, характерные для маточно-плацентарного комплекса, стимулировали экспрессию адгезионных рецепторов клетками трофобласта. Впервые показано, что КС ворсин хориона как I, так и III триместров стимулируют экспрессию клетками трофобласта адгезионных рецепторов CD106 и CD31, а также их лигандов CD29/CD49d и CD31 NK-клетками (Рисунок 9.6). Таким образом, можно предположить, что секреторные факторы клеток ворсин хориона могут стимулировать миграцию NK-клеток в децидуальную оболочку через трофобластический барьер, образуемый экстравиллезным трофобластом, встраивающимся в спиральные артерии матки. В присутствии КС ворсин хориона I триместра установлена повышенная трансмиграция естественных киллеров через монослой клеток трофобласта, что согласуется с представлениями о формировании в I триместре беременности пула dNK-клеток за счет их масштабной миграции в матку (Рисунок 9.6).

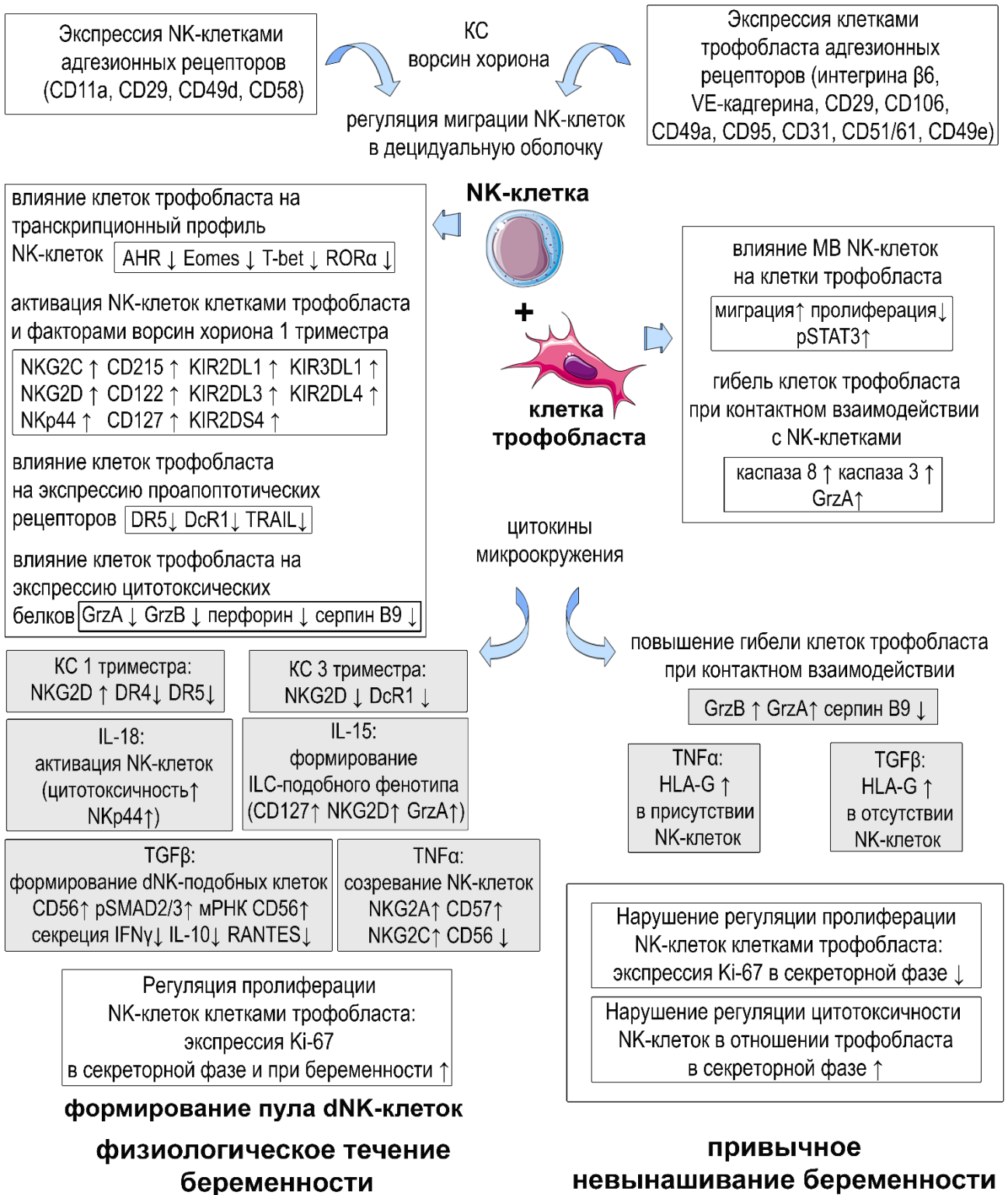


Рисунок 9.6 – Предполагаемая схема взаимодействия NK-клеток с клетками трофобласта при беременности

Традиционно увеличение представительства NK-клеток в матке рассматривают в качестве прогностического признака нарушения имплантации и инвазии, что в свою очередь может приводить к развитию ПНБ [245, 388, 648, 692]. В связи с этим актуально исследование функций NK-клеток матки и их роли в развитии репродуктивных патологий, в том числе ПНБ.

Полученные в настоящей работе результаты указывают на необходимость привлечения НК-клеток в матку для регуляции функциональной активности клеток трофобласта. Установленное нами повышение адгезии НК-клеток к клеткам трофобласта в присутствии TNF $\alpha$  и повышение экспрессии CD11a НК-клетками после трансмиграции через трофобласт может приводить к неадекватному взаимодействию с клетками трофобласта в условиях провоспалительного микроокружения и способствовать развитию невынашивания беременности.

Учитывая то, что контактное взаимодействие естественных киллеров децидуальной оболочки с клетками трофобласта носит продолжительный характер, в настоящей работе оценивали рецепторный профиль НК-клеток, включавший активационные и ингибиторные рецепторы и рецепторы, связанные с дифференцировкой НК-клеток, используя клетки линии NK-92. Впервые экспериментально установлено, что в случае длительного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3 фенотип НК-клеток значительно изменялся, частично сближаясь с фенотипом dNK-клеток. Таким образом, на основании результатов работы можно предполагать, что клетки трофобласта могут контролировать формирование пула dNK-клеток из pNK-клеток после их миграции в децидуальную оболочку.

По результатам работы в фенотипическом профиле естественных киллеров выделены три кластера белков, два из которых включают рецепторы, характерные для ILC. По данным литературы dNK-клетки не являются гомогенной популяцией [293, 563, 714], а в децидуальной оболочке выявлены разные популяции ILC [293, 510, 669]. Полученные в настоящем исследовании данные указывают на то, что клетки трофобласта могут стимулировать трансформацию НК-клеток и сближать их с другими популяциями ILC.

В работе продемонстрировано, что TGF $\beta$  является цитокином, секретлируемым клетками трофобласта, а также оказывающим влияние на клетки трофобласта. Кроме того установлено, что в присутствии TGF $\beta$  естественные киллеры повышают экспрессию CD56 как на белковом уровне, так и на транскрипционном уровне, а также снижают секрецию IFN $\gamma$ , IL-10 и RANTES. Перечисленные цитокины секретлируют dNK-клетки и pNK-клетки при беременности [135, 190, 281, 288, 390], эти цитокины влияют не только на клетки трофобласта, но и на активность НК-клеток [189, 399, 417, 589, 649]. Соответственно, снижение их секреции отражает возможный механизм регуляции количества НК-клеток в децидуальной оболочке и их функционального состояния под влиянием цитокинов клеток трофобласта.

Взаимодействие НК-клеток с клетками трофобласта приводит не только к изменениям фенотипа НК-клеток, но затрагивает и активацию каскадов внутриклеточной передачи сигнала. Впервые в настоящей работе экспериментально продемонстрировано, что в НК-клетках после сокультивирования с клетками трофобласта повышено содержание фосфорилированных форм SMAD2/3, что подтверждает активацию цитокином TGF $\beta$ , синтезируемым клетками



трофобласта, SMAD-зависимого пути передачи сигнала. В настоящем исследовании оценено содержание транскрипционных факторов в естественных киллерах линии NK-92 и впервые определено влияние клеток трофобласта на него в использованной модельной системе длительного сокультивирования. Впервые установлено, что в присутствии клеток трофобласта в естественных киллерах снижена экспрессия транскрипционных факторов, регулирующих формирование цитотоксических NK-клеток - Eomes, T-bet, но также снижена экспрессия AhR, участвующего в дифференцировке NCR+ ILC3, и ROR $\alpha$ , регулирующего формирование популяции ILC2 (Рисунок 9.6). Полученные данные указывают на влияние клеток трофобласта на процесс дифференцировки NK-клеток. Однако так как границы популяции dNK-клеток и ILC четко не определены, можно предположить существование спектра возможных субпопуляций лимфоидных клеток врожденного иммунитета в децидуальной оболочке. В целом, влияние клеток трофобласта является определяющим для успешного модулирования характеристик естественных киллеров.

Цитокины влияют на регуляторные эффекты клеток трофобласта в отношении естественных киллеров, среди факторов, секретируемых клетками плаценты, выявлены IL-15 и IL-18. В настоящей работе показано, что в присутствии клеток трофобласта IL-15 повышал экспрессию клетками линии NK-92 рецепторов NKG2D и CD127, что указывает на формирование ILC-подобного фенотипа. В присутствии клеток трофобласта цитокин IL-18 стимулировал экспрессию клетками линии NK-92 рецептора NKp44, который по данным литературы также присутствует на dNK-клетках и других ILC [597, 602, 644]. Так как нами установлено, что в присутствии IL-15 или IL-18 содержание мРНК гена *NCAM1*, кодирующего CD56, в NK-клетках не изменялось, был сделан вывод о необходимости контактного взаимодействия с клетками трофобласта для ILC-трансформации.

В работе продемонстрировано, что провоспалительный цитокин TNF $\alpha$  в случае воздействия на NK-клетки вызывал снижение содержания в них мРНК гена *NCAM1*, кодирующего CD56, а также стимулировал цитотоксичность NK-клеток. При ПНБ NK-клетки секретируют TNF $\alpha$  [390]. Полученные нами данные согласуются с представлением о провоспалительной трансформации NK-клеток при ПНБ. Однако в присутствии клеток трофобласта TNF $\alpha$  стимулировал экспрессию NK-клетками как рецептора активации NKG2C, так и ингибиторного рецептора NKG2A (Рисунок 9.6). Соответственно, в присутствии клеток трофобласта даже в условиях воспаления естественные киллеры не подвергаются неконтролируемой активации, повышая экспрессию отдельных ингибиторных рецепторов.

В работе оценен совокупный эффект растворимых факторов, секретируемых клетками ворсин хориона, на фенотип клеток линии NK-92. Продemonстрировано, что КС I триместра стимулируют экспрессию активационного рецептора NKG2D NK-клетками в присутствии

клеток трофобласта, в то время как в присутствии растворимых факторов плацент III триместра экспрессия NK-клетками этого рецептора снижена (Рисунок 9.6). Выявленная динамика экспрессии рецептора активации NKG2D свидетельствует о стимуляции активации NK-клеток гуморальными факторами в начале беременности. Это предположение подкрепляется установленной повышенной цитотоксической активностью клеток линии NK-92 в отношении клеток трофобласта в модели *in vitro* в присутствии КС ворсин хориона I триместра беременности.

Для проверки результатов, полученных на клеточной линии NK-92, в настоящей работе был проанализирован фенотипический профиль рNK-клеток. Нам удалось установить, что изменения фенотипа рNK-клеток частично воспроизводят изменения, показанные для клеток линии NK-92. Так, в присутствии клеток трофобласта и IL-18, секреция которого установлена для клеток плаценты, экспрессия активационного рецептора NKp44 рNK-клетками фракций мононуклеаров здоровых небеременных женщин была повышена, что было продемонстрировано и для клеток линии NK-92. В то же время, в присутствии TGF $\beta$  клетки трофобласта вызывали снижение экспрессии активационных рецепторов NKp44 и KIR2DS4 и экспрессии CD56 рNK-клетками. Различия экспрессии поверхностных рецепторов, вероятно, связаны с влиянием моноцитов, присутствующих в мононуклеарной фракции на фенотип NK-клеток в присутствии клеток трофобласта, что подкрепляется данными литературы о секреции цитокинов макрофагами, образующимися под действием факторов клеток трофобласта [181].

После миграции NK-клеток в децидуальную оболочку возможна пролиферация этих клеток. В настоящем исследовании была оценена регуляция пролиферативной активности естественных киллеров клетками трофобласта, для чего использовали рNK-клетки здоровых небеременных и беременных женщин, а также женщин с ПНБ. Впервые установлено, что клетки трофобласта подавляют пролиферацию рNK-клеток, причем более выраженные изменения установлены в случае использования мононуклеарной фракции, что подчеркивает необходимость стимуляции со стороны других мононуклеаров, в том числе моноцитов/макрофагов. Естественные киллеры беременных женщин обладали большим пролиферативным потенциалом, так как в присутствии клеток трофобласта экспрессия ими белка Ki-67 была выше, чем у небеременных женщин (Рисунок 9.6).

В настоящем исследовании впервые продемонстрировано, что в присутствии клеток трофобласта рNK-клетки женщин с ПНБ в секреторной фазе цикла в меньшей степени экспрессируют CD56, чем рNK-клетки женщин с ПНБ в пролиферативной фазе цикла. Эти изменения отражают нарушения приобретения NK-клетками регуляторного фенотипа у женщин с ПНБ. В работе не было выявлено различий в экспрессии белка Ki-67 рNK-клетками здоровых женщин и пациенток с ПНБ в присутствии клеток трофобласта. Соответственно, подавление

пролиферации популяций НК-клеток со стороны клеток трофобласта может являться универсальным свойством клеток трофобласта, которое облегчает *in vivo* его инвазию в стенку матки. Нарушение этой регуляции может приводить к развитию патологий репродукции.

В настоящей работе нами также оценены эффекты контактного и дистантного взаимодействия естественных киллеров и клеток трофобласта в модельной системе *in vitro*. Установлено, что контактное культивирование способствует передаче цитотоксических белков от НК-клеток клеткам трофобласта. Неотъемлемым фрагментом дистантного взаимодействия клеток являются МВ. В работе продемонстрировано, что клетки линии НК-92 образуют МВ, содержащие GrzB и перфорин. Однако дистантное взаимодействие естественных киллеров и клеток трофобласта не приводит к активации каспазы 3, что указывает на необходимость клеточных контактов для реализации НК-клетками цитотоксической активности. Продемонстрировано, что МВ НК-клеток стимулируют миграцию клеток трофобласта с участием фактора STAT3 (Рисунок 9.6). Экстраполируя полученные данные на физиологические процессы, можно предполагать, что помимо регуляции клетками трофобласта формирования пула dNK-клеток, непосредственно НК-клетки могут контролировать инвазию трофобласта с участием МВ.

В проведенном исследовании впервые разработана и апробирована модель оценки цитотоксической активности НК-клеток, предполагающая использование в качестве мишеней клеток, сходных по происхождению с потенциальными клетками-мишенями маточно-плацентарного комплекса *in vivo*. По результатам оценки цитотоксической активности естественных киллеров с использованием клеток линии НК-92 и рНК-клеток можно предположить, что взаимодействие НК-клеток с клетками трофобласта не приводит к полной утрате естественными киллерами цитотоксических свойств. Кроме того, цитокины преимущественно стимулировали цитотоксическую активность НК-клеток в отношении клеток трофобласта, лишь PLGF вызывал ее снижение. Установленное снижение гибели клеток трофобласта связано, по-видимому, с тем, что PLGF потенцирует эффекты VEGF в отношении клеток трофобласта [214, 630], который в свою очередь снижает цитотоксичность НК-клеток [309, 697].

Продемонстрировано, что естественные киллеры линии НК-92 экспрессируют как функциональные рецепторы к TRAIL - DR4, DR5, так и рецепторы-ловушки - DcR1, а также FasL и Fas. Впервые установленное в работе снижение экспрессии TRAIL и DcR1 клетками линии НК-92 в случае контактного взаимодействия с клетками трофобласта может отражать способность клеток трофобласта ингибировать отдельные пути реализации цитотоксичности НК-клеток и снижение устойчивости самих естественных киллеров к реализации апоптоза. В то же время в случае добавления КС ворсин хориона экспрессия DR4 и DR5 клетками линии НК-

92 в присутствии клеток трофобласта была снижена. В совокупности с повышенной трансмиграцией NK-клеток через трофобластический барьер под влиянием КС ворсин хориона I триместра была выявлена повышенная цитотоксичность клеток линии NK-92 в отношении клеток трофобласта в присутствии КС I триместра (Рисунок 9.6). В целом, полученные результаты отражают устойчивость NK-клеток к рецептор-опосредованному апоптозу в присутствии КС ворсин хориона и подтверждают, что цитотоксическая активность естественных киллеров является важным фрагментом формирования плаценты в I триместре.

В настоящем исследовании впервые установлено, что в случае продолжительной экспозиции клеток линии NK-92 клеткам трофобласта в NK-клетках снижалось содержание цитотоксических белков GrzA, GrzB и перфорины, параллельно наблюдалось повышение содержания этих белков в клетках трофобласта. Кроме того, в NK-клетках было снижено содержание серпина B9 после продолжительного взаимодействия с клетками трофобласта, при этом способность к индукции гибели клеток-мишеней у NK-клеток сохранялась, однако в меньшей степени, чем у интактных NK-клеток. В совокупности эти результаты подтверждают способность NK-клеток претерпевать функциональную трансформацию в присутствии клеток микроокружения, в частности клеток трофобласта.

Продемонстрировано, что в присутствии провоспалительного цитокина TNF $\alpha$  в естественных киллерах повышено содержание GrzA. Так как ПНБ ассоциировано с повышенной продукцией TNF $\alpha$  dNK-клетками [390], можно предположить, что провоспалительное цитокиновое микроокружение стимулирует синтез NK-клетками цитотоксических белков при ПНБ. Нами отмечено, что клетки трофобласта в присутствии TNF $\alpha$  повышали экспрессию HLA-G, что отражает активацию их защитных механизмов в условиях воспаления. Кроме того, в диссертационной работе продемонстрировано, что клетки трофобласта экспрессируют серпин B9, блокирующий активацию гранзимов (Рисунок 9.6). Полученные данные отражают определенную способность клеток трофобласта к защите от активности естественных киллеров.

В диссертационном исследовании оценена цитотоксическая активность pNK-клеток женщин с ПНБ в разных фазах менструального цикла и в I триместре беременности в случае ее наступления. Впервые установлено, что у небеременных фертильных женщин цитотоксичность pNK-клеток в отношении клеток трофобласта *in vitro* была снижена в секреторной фазе менструального цикла, в то время как у пациенток с ПНБ в секреторной фазе цитотоксичность pNK-клеток была повышена. Таким образом, в работе экспериментально продемонстрировано, что ПНБ ассоциировано с нарушением функциональных взаимодействий NK-клеток с клетками трофобласта (Рисунок 9.6).

В целом, на основании результатов работы сформулировано новое представление о взаимодействии естественных киллеров с клетками трофобласта, как о процессе двусторонней

регуляции. Клетки трофобласта определяют миграцию NK-клеток в матку, а также вызывают изменения рецепторного профиля NK-клеток и экспрессию ими транскрипционных факторов, сближая их с dNK-клетками и другими ИЛС, выявляемыми в децидуальной оболочке. Несмотря на ингибирующее влияние клеток трофобласта, естественные киллеры способны пролиферировать в I триместре беременности и стимулировать гибель клеток трофобласта, задействуя такие механизмы, как контактный и рецептор-опосредованный цитолиз, и продуцируя МВ, содержащие цитотоксические белки. Секретируемые клетками плаценты гуморальные факторы усиливают миграцию NK-клеток через трофобластический барьер и стимулируют их цитотоксическую активность. Можно предположить, что сохранение цитотоксичности NK-клеток после контакта с клетками трофобласта отражает вклад естественных киллеров в контроль инвазии трофобласта. ПНБ ассоциировано с изменением пролиферативной и цитотоксической активности естественных киллеров, а также их потенциала к дифференцировке в регуляторные NK-клетки. Результаты диссертационной работы позволяют говорить о более сложном взаимодействии NK-клеток и клеток трофобласта, нежели чем традиционное представление о клетках-эффекторах и клетках-мишенях. В совокупности полученные в диссертационном исследовании данные указывают на ключевую роль «диалога» NK-клеток с клетками трофобласта, в котором NK-клетки, подвергаясь модулирующему влиянию клеток трофобласта, выполняют задачи, необходимые для успешного развития беременности, что выражается в реализации как регуляторных, так и цитотоксических свойств. Нарушение взаимодействия естественных киллеров и клеток трофобласта является важной составляющей патогенеза ПНБ.

**Перспективы дальнейшей разработки темы.** Результаты диссертационной работы свидетельствуют о непосредственном участии потенциальных клеток-мишеней, а именно клеток трофобласта, в регуляции функциональной активности NK-клеток. В связи с этим представляет интерес исследование молекулярных и эпигенетических механизмов взаимодействия NK-клеток с клетками-мишенями различного происхождения, а также оценка роли этих механизмов в регуляции эффекторных функций естественных киллеров. В диссертационной работе продемонстрировано, что клетки трофобласта в присутствии растворимых факторов микроокружения могут стимулировать приобретение NK-клетками характеристик клеток смежных линий дифференцировки лимфоцитов врожденного иммунитета. Перспективно рассмотрение механизмов, обеспечивающих трансдифференцировку NK-клеток в другие лимфоидные клетки врожденного иммунитета, и влияния тканевого микроокружения на этот процесс. В дальнейшем возможно исследование роли моноцитов и макрофагов в регуляции взаимодействия NK-клеток с клетками трофобласта, так как макрофаги представлены в децидуальной оболочке, а, согласно полученным в

диссертационной работе данным, присутствие моноцитов в клеточном микроокружении НК-клеток может изменять их цитотоксическую активность. Полученные данные о роли взаимодействия НК-клеток с клетками трофобласта в формировании dNK-клеток и использование разработанной модели для оценки функциональной активности НК-клеток в отношении клеток трофобласта могут иметь значение для выбора тактики ведения пациенток с ПНБ. Дальнейшая разработка темы в части *in vitro* оценки эффективности планируемой к применению медикаментозной терапии ПНБ и других репродуктивных патологий позволит реализовать персонифицированный патогенетически обоснованный подход к лечению пациенток.

## ВЫВОДЫ

1. Цитокины и растворимые факторы ворсин хориона стимулируют экспрессию адгезионных рецепторов НК-клетками (CD11a, CD29, CD49d, CD58) и клетками трофобласта (интегрин  $\beta 6$ , VE-кадгерин, CD54, CD29, CD106, CD49a, CD95, CD31, CD51/61, CD49e), что сопровождается изменением адгезии и увеличением трансмиграции клеток линии НК-92 через трофобласт.

2. Взаимодействие клеток линии НК-92 с клетками трофобласта приводит к активации в НК-клетках TGF $\beta$ -зависимого сигнального пути и приобретению ими фенотипа, подобного фенотипу децидуальных НК-клеток, что выражалось в повышении экспрессии CD56, NKG2A, NKG2C, CD57, NKp44, изменении экспрессии активационных и ингибиторных рецепторов группы KIR и снижении содержания транскрипционных факторов Eomes, AhR, ROR $\alpha$ , T-bet. Установленные изменения фенотипа клеток линии НК-92 в присутствии клеток трофобласта частично воспроизводятся в модели с использованием НК-клеток периферической крови.

3. Влияние клеток трофобласта на клетки линии НК-92 в условиях контактного взаимодействия модифицируется в присутствии цитокинов и растворимых факторов ворсин хориона: IL-15 и IL-18 стимулируют приобретение НК-клетками фенотипа CD127+ NKp44+ NKG2D+, характерного для популяций лимфоидных клеток врожденного иммунитета, TNF $\alpha$  повышает экспрессию рецепторов цитотоксичности NKG2C и NKG2A НК-клетками, факторы ворсин хориона III триместра снижают экспрессию рецептора NKG2D НК-клетками по сравнению с экспрессией в присутствии факторов ворсин хориона I триместра.

4. Клетки трофобласта подавляют пролиферацию НК-клеток периферической крови. У женщин с физиологической беременностью ингибирование пролиферации НК-клеток периферической крови клетками трофобласта линии JEG-3 менее выражено, чем у небеременных женщин.

5. При ПНБ в секреторной фазе менструального цикла экспрессия CD56 НК-клетками периферической крови снижена в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3. Как у женщин с ПНБ, так и у здоровых небеременных и беременных женщин пролиферация популяций CD56+CD16- и CD56+CD16+ НК-клеток периферической крови снижена в присутствии клеток трофобласта, что отражает универсальный ингибирующий эффект клеток трофобласта в отношении НК-клеток.

6. Клетки линии НК-92 секретируют цитокины IFN $\gamma$ , IL-10 и RANTES и образуют микровезикулы, содержащие цитотоксические белки GrzB и перфорин. Микровезикулы клеток линии НК-92 стимулируют миграцию и подавляют пролиферацию клеток трофобласта, что

сопровождается фосфорилированием белка STAT3 и отражает способность НК-клеток осуществлять дистантную регуляцию функций клеток трофобласта.

7. Клетки линии NK-92 и NK-клетки периферической крови индуцируют гибель клеток трофобласта в случае контактного взаимодействия. Установлена сниженная экспрессия TRAIL клетками линии NK-92 в присутствии клеток трофобласта, что отражает ингибирование трофобластом отдельных способов реализации цитотоксичности НК-клеток. Цитокины IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-8, TGF- $\beta$ , GM-CSF и факторы, секретируемые клетками ворсин хориона в I триместре, стимулируют цитотоксическую активность клеток линии NK-92 в отношении клеток трофобласта.

8. Длительное взаимодействие клеток линии NK-92 с клетками трофобласта приводит к снижению их цитотоксической активности, сопровождающееся сниженной интенсивностью экспрессии белков GrzA, GrzB, перфорина и серпина B9.

9. Цитотоксическая активность НК-клеток периферической крови в отношении клеток трофобласта линии JEG-3 снижена у женщин с физиологической беременностью, а также у небеременных фертильных женщин в секреторной фазе менструального цикла по сравнению с цитотоксичностью НК-клеток в пролиферативной фазе цикла. При ПНБ цитотоксичность НК-клеток периферической крови в отношении клеток трофобласта линии JEG-3 повышена в секреторной фазе менструального цикла по сравнению с цитотоксичностью НК-клеток в пролиферативной фазе цикла.

10. Комплекс проведенных исследований расширяет представления о взаимодействии естественных киллеров и клеток трофобласта, и позволяет утверждать, что клетки трофобласта регулируют миграционную, секреторную и пролиферативную активность НК-клеток, а также определяют изменения ими фенотипических характеристик. Взаимодействие НК-клеток с клетками трофобласта не приводит к полной утрате естественными киллерами цитотоксических свойств, реализуемых ими посредством контактного цитолиза, продукции микровезикул и экспрессии рецепторов смерти.



## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При исследовании патогенетических механизмов реализации функциональной активности НК-клеток рекомендуется проводить подбор клеток-мишеней, используемых в моделях *in vitro*, приближенных по своим характеристикам к клеткам, выступающим в качестве мишеней для НК-клеток *in vivo*. Для определения функционального статуса НК-клеток рекомендуется дополнять оценку непосредственно цитотоксической активности НК-клеток определением их секреторной активности и формирования ими микровезикул, а также определением пролиферативной активности в присутствии клеток-мишеней.

2. Рекомендуется оценивать цитотоксическую активность НК-клеток периферической крови в отношении клеток трофобласта для определения выраженности иммунной составляющей патогенеза ПНБ у конкретной пациентки и прогнозирования успешности пролонгирования беременности.

3. Для реализации персонифицированного подхода в лечении ПНБ и оценки эффективности планируемой к применению медикаментозной терапии рекомендуется оценивать цитотоксическую активность НК-клеток периферической крови в отношении клеток трофобласта в присутствии препаратов *in vitro*.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- $\beta$ HcG - бета-субъединица хорионического гонадотропина
- АЗКЦ - антитело-зависимая клеточная цитотоксичность
- АПК - антиген-презентирующие клетки
- Буфер RIPA - буфер для анализа радиоиммунопреципитации
- ИС - иммунологический синапс
- КС - кондиционированные среды
- МВ - микровезикулы
- мРНК - матричная РНК
- НГЭ - наружный генитальный эндометриоз
- ПНБ - привычное невынашивание беременности
- УЗИ - ультразвуковое исследование
- ЭКО - экстракорпоральное оплодотворение
- ЭТС - эмбриональная телячья сыворотка
- ADAM - семейство металлоэндопептидаз
- Bcl - белок-регулятор апоптоза
- bFGF (basic fibroblast growth factor) - фактор роста фибробластов
- CAM - молекулы клеточной адгезии (Cell Adhesion Molecules)
- CD - кластеры дифференцировки
- CFSE - (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) интернализуемая флуоресцентная метка сукцинимидиловый эфир карбоксифлуоресцеина
- СILP - общий предшественник ILC (Common ILC progenitor)
- CLP - общий лимфоидный предшественник (Common Lymphoid Progenitor)
- DAP10 - активирующий белок-адаптер DNAX массой 10 кДа
- DcR - рецептор-ловушка, связывающий TRAIL (Death decoy Receptor)
- DMEM - (Dulbecco's Modified Eagle Medium) модифицированная по способу Дульбекко культуральная среда Игла
- dNK-клетки – децидуальные NK-клетки (decidual Natural Killer cells)
- DR - рецептор смерти
- EGF –эпидермальный ростовой фактор (Epidermal Growth Factor)
- EILC - ранний предшественник ILC (Early ILC progenitor)
- eNK-клетки – эндометриальные NK-клетки (endometrial Natural Killer cells)
- ERK - внеклеточная сигнально-регулируемая киназа
- FADD - Fas-ассоциированный домен смерти (Fas-Associated Death Domain)

- Fas - рецептор суперсемейства TNF $\alpha$
- FasL - лиганд для рецептора Fas, экспрессируемый на поверхности клетки
- Fc $\gamma$ R - низкоаффинный рецептор IgG
- FGF - фактор роста фибробластов (Fibroblast Growth Factor)
- FIGO - Международная федерация акушерства и гинекологии (The International Federation of Gynecology and Obstetrics)
- FLICE - белковый комплекс FADD и прокаспазы 8 (FADD-like interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme)
- FLIP - FLICE-подобный ингибирующий протеин (FLICE-like Inhibitory Protein)
- Flt-3 - fms-подобная тирозинкиназа 3
- GAPDH - глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа
- GLYCAM-1 –адгезионная молекула, зависящая от гликозилирования - 1 (Glycosylation-dependent Cell Adhesion Molecule 1)
- GM-CSF - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor)
- Grz - гранзим
- NCAM – нейрональная адгезионная молекула (Neuronal-Cell Adhesion Molecule)
- NCR - рецепторы естественной цитотоксичности (Natural Cytotoxicity Receptors)
- NK-клетки –естественные киллеры (Natural Killer cells)
- NKG2 - группа C-лектиноподобных рецепторов, определяющих цитотоксичность NK-клеток
- dNK-клетки - децидуальные NK-клетки (decidual Natural Killer cells)
- HLA –человеческий лейкоцитарный антиген (Human Leukocyte Antigen)
- HRP - пероксидаза хрена (Horseradish peroxidase)
- HSP90 – референсный ген, кодирующий шаперон - белок теплового шока 90 (Heat Shock Protein)
- ICAM - молекула межклеточной адгезии (Intercellular Adhesion Molecules)
- IDO (indoleamine-2,3-dioxygenase) - индоламин-2,3-диоксигеназа
- IFN $\gamma$  - интерферон гамма
- I-TAC - интерферон-индуцибельный хемоаттрактант Т-лимфоцитов (Interferon inducible T-cell alpha Chemoattractant)
- IL - интерлейкин (interleukin)
- IL-18BP - IL-18-связывающий белок
- ILC - лимфоциты врожденного иммунитета (Innate Lymphoid Cells)
- ILT - Рецепторы иммуноглобулиноподобные транскрипты (Immunoglobulin-like Transcript)
- iNK - незрелые NK-клетки (immature NK cells)
- IP-10 -интерферон-индуцибельный протеин 10 (Interferon inducible Protein 10)

- IRF - фактор, регулируемый интерфероном гамма (IFN-regulatory factor)
- ITIM - иммунорегуляторный ингибиторный мотив на основе тирозина (tyrosine-based inhibition motif)
- ЯК - Янус-киназа
- JAM - соединительная адгезионная молекула (Junctional Adhesion Molecule)
- KIR - группа иммуноглобулиноподобных рецепторов NK-клеток (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor)
- LAMP-1 - Лизосомально-ассоциированный мембранный белок 1
- LFA - гетеродимерный интегрин подсемейства  $\beta 2$ -интегринов, состоящий из альфа цепи  $\alpha L$  и бета цепи  $\beta 2$  (Lymphocyte Function-associated Antigen)
- LIF – фактор, ингибирующий лейкемию (Leukemia Inhibitory Factor)
- LTi - индуцирующие лимфоидную ткань клетки
- Mac-1 - мембранный белок, гетеродимерный интегрин подсемейства  $\beta 2$ -интегринов, состоящий из альфа цепи  $\alpha M$  (CD11b) и бета цепи  $\beta 2$  (CD18) (Macrophage-1 antigen)
- MAdCAM-1 - адгезионная молекула к адресинам слизистых оболочек - (Mucosal addressin Cell Adhesion Molecule)-1
- МАРК - Митоген-активируемая протеинкиназа
- MCP - моноцитарный хемотактический протеин (Monocyte Chemotactic Protein)
- M-CSF - макрофагальный колониестимулирующий фактор (Macrophage Colony Stimulating Factor)
- MCMV - цитомегаловирус мышей
- MFI - средняя интенсивность флуоресценции (Mean Fluorescence Intensity)
- MHC - молекулы главного комплекса гистосовместимости (Major Histocompatibility Complex)
- MIC - белок, родственник полипептиду MHC класса I (MHC class I-related Chain molecules)
- MIP - воспалительный протеин макрофагов (Macrophage Inflammatory Protein)
- miR - микроРНК
- MMP - матриксная металлопротеиназа (Matrix MetalloProteinase)
- mNK - зрелые NK-клетки (mature NK cells)
- mTNF $\alpha$  - мембран-связанная форма TNF $\alpha$
- mTOR - серин-треониновая протеинкиназа (mammalian Target of Rapamycin)
- mTORC - комплекс регуляторных белков и белка mTOR
- NCAM - нейрональная молекула межклеточной адгезии (Neural Cell Adhesion Molecule)
- NF $\kappa$ B - ядерный фактор «каппа-би»
- PECAM-1 - тромбоцитарно-эндотелиальная адгезионная молекула-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1)
- PI3K - фосфатидилинозитол-3-киназа

- PLGF - плацентарный фактор роста (Placental Growth Factor)
- PMA - форбол 12-миристат 13-ацетат (Phorbol 12 Myristate 13 Acetate)
- pNK-клетки – NK-клетки периферической крови (peripheral Natural Killer cells)
- RAET1 - ранний транскрипт ретиноевой кислоты (Retinoic Acid Early Transcript 1)
- RANTES - цитокин, регулируемый при активации, экспрессируемый и секретируемый нормальными Т-лимфоцитами (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted)
- SCF - фактор стволовых клеток (Stem Cell Factor)
- SDF-1 - стромальный клеточный фактор (Stromal cell-Derived Factor-1)
- SDS - Додецилсульфат натрия (Sodium Dodecyl Sulfate)
- SLAM - сигнальная активационная молекула лимфоцитов (Signaling Lymphocytic Activation Molecule)
- SLC - хемокин вторичной лимфоидной ткани (Secondary Lymphoid tissue Chemokine)
- SMAC - надмолекулярный кластер активации (Supramolecular Activation Cluster)
- SMAD - белки внутриклеточной передачи сигнала от TGF $\beta$  (Sma and MAD-related protein)
- SNARE - белки, регулирующие везикулярный транспорт группы SNAP RЕсептор
- spNK - отсортированные NK-клетки периферической крови (sorted pNK cells)
- STAT - сигнальный белок и активатор транскрипции (Signal Transducer and Activator of Transcription)
- sVEGF-R - секреторный вариант рецептора VEGF
- TACE - TNF $\alpha$ -образующий фермент (TNF- $\alpha$ -Converting Enzyme)
- TGF $\beta$  - Трансформирующий фактор роста бета (Transforming Growth Factor beta)
- TIGIT - иммунорецептор Т-клеток с иммуноглобулиновыми и ингибиторными доменами
- Tim - костимуляционный рецептор Т-клеток (T-cell Immunoglobulin and Mucin-containing domain)
- TLR - группа рецепторов врожденного иммунитета, подобная рецепторам Toll (Toll-like Receptor)
- TNF - фактор некроза опухоли (Tumor Necrosis Factor)
- TRAIL - цитокин семейства факторов некроза опухоли, лиганд, вызывающий апоптоз (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand)
- TRAIL-R - рецептор TRAIL
- TRPS - метод оценки изменений сопротивления потока через микропоры (Tunable Resistive Pulse Sensing)
- VCAM-1 - сосудистая молекула клеточной адгезии 1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1)
- VE-кадгерин - кадгерин эндотелия сосудов (Vascular Endothelial Cadherin)
- VEGF –фактор роста эндотелия сосудов (Vascular Endothelial Growth Factor)
- VLA- поздний антиген активации (Very Late activation Antigen)

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абакушина, Е.В. Метод проточной цитометрии для оценки НК-клеток и их активности / Е.В. Абакушина // Клиническая лабораторная диагностика. - 2015. - Т.60, №11. - С. 37-44.
2. Абакушина, Е.В. Основные свойства и функции НК-клеток человека / Е.В. Абакушина, Е.Г. Кузьмина, Е.И. Коваленко // Иммунология. - 2012. - Т.33, №4. - С. 220-224.
3. Абакушина, Е.В. Ингибирование экспрессии активирующего рецептора NKG2D на НК-клетках рекомбинантным белком MICA / Е.В. Абакушина, Е.Ю. Лысюк, А.В. Посвятенко, А.В. Кибардин // Медицинская иммунология. - 2017. - Т.19, №1. - С. 81-88.
4. Агнаева, А.О. Роль естественных киллеров (НК-клеток) в репродуктивных потерях / А.О. Агнаева, О.Н. Беспалова, С.С.А. Соколов Д.И., И.Ю. Коган // Журнал акушерства и женских болезней. - 2017. - Т.66, №3. - С. 143-156.
5. Айламазян, Э.К. Клетки иммунной системы матери и клетки трофобласта: «конструктивное сотрудничество» ради достижения совместной цели / Э.К. Айламазян, О.И. Степанова, С.А. Сельков, Д.И. Соколов // Вестник РАМН. - 2013. - Т.11. - С. 12-21.
6. Амчиславский, Е.И. Пролиферативная активность эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926 и ее модуляция / Е.И. Амчиславский, Д.И. Соколов, С.А. Сельков, И.С. Фрейдлин // Цитология. - 2005. - Т.47, №5. - С. 393-403.
7. Амян, Т.С. Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с цитотоксической, киллерной и регуляторной функцией у женщин с повторными неудачами имплантации в программах вспомогательных репродуктивных технологий / Т.С. Амян, Л.В. Кречетова, С.Г. Перминова, В.В. Вторушина // Акушерство и гинекология. - 2017. - Т.12. - С. 78-83.
8. Аржанова, О.Н. Невынашивание беременности: профилактика и лечение / О.Н. Аржанова, С.А. Сельков, А.М. Савичева, Е.К. Комаров, О.Н. Беспалова, Т.А. Плужникова, Р.В. Капустин, Е.А. Корнюшина. - Санкт-Петербург: Эко-Вектор, 2019. - 94 с.
9. Афанасьев, Ю.И. Гистология, эмбриология, цитологи / Ю.И. Афанасьев, Н.А. Юрина, Е.Ф. Котовский. - М.: Издательская группа "ГЭОТАР-Медиа", 2012. - 800 с.
10. Баклейчева, М.О. Особенности экспрессии HLA-G при неразвивающейся беременности с нормальным кариотипом плода / М.О. Баклейчева, О.Н. Беспалова, Т.Э. Иващенко, Т.Г. Траль, Г.Х. Толибова, А.В. Тихонов, Л.И. Петрова, Дудкина В.С // Акушерство и гинекология. - 2021. - Т.12. - С. 77-86.

11. Батрак, Н.В. Факторы риска привычного невынашивания беременности / Н.В. Батрак, А.И. Малышкина // Вестник Ивановской медицинской академии. - 2016. - Т.21, №4. - С. 37-41.
12. Батрак, Н.В. Факторы риска и иммунологические механизмы угрозы прерывания беременности ранних сроков и привычного невынашивания / Н.В. Батрак, А.И. Малышкина, Н.Ю. Сотникова, Н.В. Кропкина. - Иваново: Акционерное общество «Ивановский издательский дом», 2020. - 120 с.
13. Беспалова, О.Н. Генетика невынашивания беременности / О.Н. Беспалова // Журнал акушерства и женских болезней. - 2007. - Т.LVI, №1. - С. 81-95.
14. Бубнова, Л.Н. Особенности распределения групп аллелей HLA-A \*, B\*, DRB1\* среди лиц, перенесших COVID-19 / Л.Н. Бубнова, И.Е. Павлова, А.С. Беркос, М.А. Терентьева, Т.В. Глазанова, Л.В. Ерохина, Е.В. Беляева, А.В. Чечеткин, Н.С. Башкетова, И.Г. Чхинджерия, М.А. Кожемякина, Д.В. Азаров, Р.Н. Кузнецова, А.А. Тотолян // Медицинская иммунология. - 2021. - Т.23, №3. - С. 523-532.
15. Гельм, Ю.В. Опыт культивирования НК-клеток человека с фидерными клетками *in vitro* / Ю.В. Гельм, И.А. Пасов, Л.Ю. Гривцова, Т.В. Константинова, Н.В. Михайловский, В.А. Рыбачук, Е.В. Абакушина, С.А. Иванов, А.Д. Каприн // Медицинская иммунология. - 2022. - Т.24, №3. - С. 481-490.
16. Должиков, А.А. Прикладная морфология для студентов и врачей: морфология последа человека / А.А. Должиков, С.В. Заболотная. - Белгород, 2005. - 41 с.
17. Ерохина, С.А. Применение фидерных клеток, экспрессирующих мембраносвязанный IL-21, для активации и пролиферации НК-клеток человека / С.А. Ерохина, М.А. Стрельцова, Л.М. Каневский, Е.И. Коваленко // Медицинская иммунология. - 2015. - Т.17, №S. - С. 26.
18. Загайнова, В.А. Роль периферических и эндометриальных НК-клеток при повторных репродуктивных потерях / В.А. Загайнова, И.Ю. Коган, О.Н. Беспалова, С.А. Сельков, Д.И. Соколов // Акушерство и гинекология. - 2021. - Т.7. - С. 19-27.
19. Кобызева, П.А. Свойства субпопуляций натуральных киллеров человека, обладающих маркера адаптивных клеток / П.А. Кобызева, М.А. Стрельцова, С.А. Ерохина, Е.И. Коваленко // Российский иммунологический журнал. – 2019. – Т.13, №22. – С.795-797.
20. Коваленко, Е.И. Адаптивные свойства натуральных киллеров - лимфоцитов врожденного иммунитета / Е.И. Коваленко, М.А. Стрельцова // Биоорганическая химия. - 2016. - Т.42, №6. - С. 649-667.
21. Колобов, А.В. Плацента человека. Морфофункциональные основы / А.В. Колобов, В.А. Цинзерлинг, Е.А. Смирнова, И.А. Рошупкина. - СПб: ЭЛБИ-СПб, 2011. - 92 с.

22. Кречетова, Л.В. Значимость оценки экспрессии CD69 лимфоцитами периферической крови для прогноза исходов беременности у женщин с привычным невынашиванием / Л.В. Кречетова, В.В. Вторушина, В.Л. Ванько, М.А. Николаева, Е.В. Инвиева, Н.К. Тетрашвили // Биомедицинская химия. - 2020. - Т.66, №6. - С. 477-484.
23. Кречетова, Л.В. Экспрессия раннего активационного маркера CD69 лимфоцитами периферической крови при аллоиммунизации женщин в I триместре беременности / Л.В. Кречетова, В.В. Вторушина, М.А. Николаева, Е.Л. Голубева, В.Л. Ванько, В.А. Сарибегова, Н.К. Тетрашвили // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2016. - Т.161, №4. - С. 519-522.
24. Кречетова, Л.В. Особенности фенотипа лимфоцитов периферической крови женщин с идиопатическим привычным выкидышем в зависимости от исхода беременности на фоне иммуцитотерапии / Л.В. Кречетова, Н.К. Тетрашвили, В.В. Вторушина, М.А. Николаева, Н.А. Хачатрян, А.А. Агаджанова, В.Л. Ванько, Т.Ю. Иванец, Г.Т. Сухих // Акушерство и гинекология. - 2017. - Т.7. - С. 52-60.
25. Лахтин, М.В. Распознающие гликопаттерны НК-клетки против опухолей на фоне эпидемически значимых вирусных инфекций / М.В. Лахтин, В.М. Лахтин, В.А. Алеёшкин, С.С. Афанасьев // Анализ риска здоровью. - 2019. - Т.1. - С. 144-153.
26. Михайлова, В.А. Экспрессия адгезионных молекул и хемокиновых рецепторов НК-клетками периферической крови при беременности / В.А. Михайлова, Я.С. Онохина, С.А. Сельков, Д.И. Соколов // Иммунология. - 2011. - Т.2. - С. 78-81.
27. Селедцова, Н.В. Характеристика естественных цитотоксических клеток и регуляторных Т-лимфоцитов у беременных с надпочечниковой гиперандрогенией / Н.В. Селедцова, Н.А. Хонина, А.В. Дударева, М.А. Тихонова, А.А. Останин, Н.М. Пасман, Е.Р. Черных // Иммунология. - 2007. - Т.28, №3. - С. 151-155.
28. Соколов, Д.И. Иммунологический контроль формирования сосудистой сети плаценты / Д.И. Соколов, С.А. Сельков. - СПб: ООО "Издательство Н-Л", 2012. - 208 с.
29. Сотникова, Н.Ю. Роль децидуальных CD56<sup>+</sup> естественных киллеров в регуляции локального иммунного ответа в ранние сроки беременности / Н.Ю. Сотникова, Д.Н. Воронин, Ю.С. Анциферова // Вестник Уральской медицинской академической науки. - 2011. - Т.2-1 (35). - С. 68-69.
30. Столбовая, А.Ю. Стресс-индуцированные молекулы MICA и MICB в онкологии / А.Ю. Столбовая, И.В. Смирнов, М.П. Самойлович // Медицинская иммунология. - 2022. - Т.24, №3. - С. 433-454.
31. Стрельцова, М.А. Субпопуляционная гетерогенность НК-клеток при их генетической модификации с целью последующего применения в таргетной терапии / М.А.



- Стрельцова, А.А. Бойко, М.О. Устюжанина, А.И. Паламарчук, Н.А. Алексеева, Р.А. Величинский, Ю.Д. Вавилова, М.В. Гречихина, А.М. Сапожников, С.М. Деев, Е.И. Коваленко // Доклады Российской академии наук. - 2023. - Т.508, №1. - С. 41-44.
32. Тетруашвили, Н.К. Привычный выкидыш / Н.К. Тетруашвили // Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение. - 2017. - Т.№4. - С. 1-18.
33. Тетруашвили, Н.К. Клинические рекомендации. Привычный выкидыш. / Н.К. Тетруашвили, Н.В. Долгушина, И.И. Баранов, З.С. Ходжаева, Ш. Е.Л., Л.В. Адамян, Н.В. Артымук, Н.В. Башмакова, В.Ф. Беженарь, Т.Е. Белокриницкая, К. А.С., В.А. Крутова, А.И. Малышкина, А.В. Михайлов, И.В. Моисеева, С.А. Нередько, А.С. Оленев, В.А. Петрухин, В.Е. Радзинский, Г.М. Савельева, В.Н. Серов, И.Ф. Фаткуллин, О.С. Филиппов. М: 2022. - 52 с.
34. Тетруашвили, Н.К. Динамика субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у пациенток с привычным выкидышем аллоиммунного генеза в течение беременности / Н.К. Тетруашвили, Л.В. Кречетова, В.А. Сарибегова, В.В. Вторушина, Е.Л. Голубева, Н.А. Хачатрян, А.А. Агаджанова // Акушерство и гинекология. Новости. Мнения. Обучение. - 2017. - Т.4, №18. - С. 28-36.
35. Торчинов, А.М. Этиологические факторы привычного невынашивания беременности / А.М. Торчинов, С.Г. Цахилова, А.М. Бегизова, Е.В. Полухова, М.Е. Иолкина // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. - 2017. - Т.16, №6. - С. 59-63.
36. Траль, Т.Г. Структурно-функциональные и молекулярные механизмы трансформации эндометрия при привычном невынашивании беременности / Т.Г. Траль, В.В. Хобец, Г.Х. Толибова, И.Ю. Коган // Уральский медицинский журнал. - 2022. - Т.21, №5. - С. 18-25.
37. Унанян, А.Л. Привычное невынашивание беременности в современном мире (обзор литературы) / А.Л. Унанян, Л.Г. Пивазян, А.А. Закарян, О.Ф. Пойманова, Е.Н. Бондаренко, А.И. Ищенко // Архив акушерства и гинекологии им.В.Ф.Снегирева. - 2021. - Т.8, №1. - С. 12-19.
38. Хамаганова, Е.Г. Проблема неоднозначности при HLA-типировании с высоким разрешением для трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток от неродственного донора / Е.Г. Хамаганова, Б.В. Бидерман, И.А. Якутик, Е.П. Кузьмина, А.А. Юшкова, Л.А. Кузьмина, Е.Н. Паровичникова, А.Б. Судариков, В.Г. Савченко // Гематология и трансфузиология. - 2014. - Т.59, №2. - С. 4-9.
39. Хаматова, А.А. Тканерезидентные натуральные киллеры: особенности функционирования в матке и децидуальной оболочке / А.А. Хаматова, Т.А. Чеботарева, И.П. Балмасова // Иммунология. - 2021. - Т.42, №5. - С. 574-580.

40. Шевченко, Ю.А. Клеточные механизмы поддержания фетоматеринской толерантности во время беременности / Ю.А. Шевченко, К.В. Назаров, С.В. Сенников // Медицинская иммунология. - 2023. - Т.25, №2. – С. 253-270.
41. Ширшев, С.В. Влияние хорионического гонадотропина и эстрадиола на фенотип и функциональную активность НК-клеток / С.В. Ширшев, И.В. Некрасова, О.Л. Горбунова, Е.Г. Орлова // Физиология человека. - 2016. - Т.42, №5. - С. 102-107.
42. Ширшев, С.В. Регуляция функциональной активности НК-клеток гормонами репродукции / С.В. Ширшев, И.В. Некрасова, О.Л. Горбунова, Е.Г. Орлова, И.Л. Масленникова // Российский иммунологический журнал. - 2017. - Т.11 (20), №3. - С. 572-574.
43. Ширшев, С.В. Регуляция лептином и грелином экспрессии мембранных молекул и продукции цитокинов НК-клетками периферической крови / С.В. Ширшев, И.В. Некрасова, Е.Г. Орлова, О.Л. Горбунова // Биологические мембраны. - 2017. - Т.34, №1. - С. 47-55.
44. Aashaq, S. TGF-beta signaling: A recap of SMAD-independent and SMAD-dependent pathways / S. Aashaq, A. Batool, S.A. Mir, M.A. Beigh, K.I. Andrabi, Z.A. Shah // J Cell Physiol. - 2022. - Vol.237, №1. - P. 59-85.
45. Abbas, Y. Investigation of human trophoblast invasion in vitro / Y. Abbas, M.Y. Turco, G.J. Burton, A. Moffett // Hum Reprod Update. - 2020. - Vol.26, №4. - P. 501-513.
46. Abdi, K. Bone Marrow-Derived Dendritic Cell Cultures from RAG(-/-) Mice Include IFN-gamma-Producing NK Cells / K. Abdi, L.M. Thomas, K. Laky, M. Abshari, P. Matzinger, E.O. Long // Immunohorizons. - 2020. - Vol.4, №7. - P. 415-419.
47. Abel, A.M. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization / A.M. Abel, C. Yang, M.S. Thakar, S. Malarkannan // Front Immunol. - 2018. - Vol.9. - P. 1869.
48. Abrahams, V.M. Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs / V.M. Abrahams, P. Bole-Aldo, Y.M. Kim, S.L. Straszewski-Chavez, T. Chaiworapongsa, R. Romero, G. Mor // J Immunol. - 2004. - Vol.173, №7. - P. 4286-4296.
49. Adler, R.R. Monoclonal antiphosphatidylserine antibody inhibits intercellular fusion of the choriocarcinoma line, JAR / R.R. Adler, A.K. Ng, N.S. Rote // Biol Reprod. - 1995. - Vol.53, №4. - P. 905-910.
50. Adu-Gyamfi, E.A. The Involvement of Cell Adhesion Molecules, Tight Junctions, and Gap Junctions in Human Placentation / E.A. Adu-Gyamfi, A. Czika, P.N. Gorleku, A. Ullah, Z. Panhwar, L.L. Ruan, Y.B. Ding, Y.X. Wang // Reprod Sci. - 2021. - Vol.28, №2. - P. 305-320.

51. Adu-Gyamfi, E.A. Regulation of placentation by the transforming growth factor beta superfamily dagger / E.A. Adu-Gyamfi, Y.B. Ding, Y.X. Wang // *Biol Reprod.* - 2020. - Vol.102, №1. - P. 18-26.
52. Afonina, I.S. Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B / I.S. Afonina, S.P. Cullen, S.J. Martin // *Immunol Rev.* - 2010. - Vol.235, №1. - P. 105-116.
53. Al-Nasiry, S. Differential effects of inducers of syncytialization and apoptosis on BeWo and JEG-3 choriocarcinoma cells / S. Al-Nasiry, B. Spitz, M. Hanssens, C. Luyten, R. Pijnenborg // *Hum Reprod.* - 2006. - Vol.21, №1. - P. 193-201.
54. Aldo, P.B. A novel three-dimensional in vitro system to study trophoblast-endothelium cell interactions / P.B. Aldo, G. Krikun, I. Visintin, C. Lockwood, R. Romero, G. Mor // *Am J Reprod Immunol.* - 2007. - Vol.58, №2. - P. 98-110.
55. Aldo, P.B. Trophoblast induces monocyte differentiation into CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> macrophages / P.B. Aldo, K. Racicot, V. Craviero, S. Guller, R. Romero, G. Mor // *Am J Reprod Immunol.* - 2014. - Vol.72, №3. - P. 270-284.
56. Ali, A.K. NK Cell-Specific Gata3 Ablation Identifies the Maturation Program Required for Bone Marrow Exit and Control of Proliferation / A.K. Ali, J.S. Oh, E. Vivier, M. Busslinger, S.H. Lee // *J Immunol.* - 2016. - Vol.196, №4. - P. 1753-1767.
57. Ali, S.B. The role of immunological testing and intervention in reproductive medicine: A fertile collaboration? / S.B. Ali, Y. Jeelall, C.E. Pennell, R. Hart, A. McLean-Tooke, M. Lucas // *Am J Reprod Immunol.* - 2018. - Vol.79, №3. - P. e12784.
58. Allan, D.S. TGF-beta affects development and differentiation of human natural killer cell subsets / D.S. Allan, B. Rybalov, G. Awong, J.C. Zuniga-Pflucker, H.D. Kopcow, J.R. Carlyle, J.L. Strominger // *Eur J Immunol.* - 2010. - Vol.40, №8. - P. 2289-2295.
59. Allan, D.S.J. Transcriptome analysis reveals similarities between human blood CD3(-) CD56(bright) cells and mouse CD127(+) innate lymphoid cells / D.S.J. Allan, A.S. Cerdeira, A. Ranjan, C.L. Kirkham, O.A. Aguilar, M. Tanaka, R.W. Childs, C.E. Dunbar, J.L. Strominger, H.D. Kopcow, J.R. Carlyle // *Sci Rep.* - 2017. - Vol.7, №1. - P. 3501.
60. Almishri, W. TNFalpha Augments Cytokine-Induced NK Cell IFNgamma Production through TNFR2 / W. Almishri, T. Santodomingo-Garzon, T. Le, D. Stack, C.H. Mody, M.G. Swain // *J Innate Immun.* - 2016. - Vol.8, №6. - P. 617-629.
61. Ambrosini, P. IL-1beta inhibits ILC3 while favoring NK-cell maturation of umbilical cord blood CD34(+) precursors / P. Ambrosini, F. Loiacono, R. Conte, L. Moretta, C. Vitale, M.C. Mingari // *Eur J Immunol.* - 2015. - Vol.45, №7. - P. 2061-2071.

62. Anacker, J. Human decidua and invasive trophoblasts are rich sources of nearly all human matrix metalloproteinases / J. Anacker, S.E. Segerer, C. Hagemann, S. Feix, M. Kapp, R. Bausch, U. Kammerer // *Mol Hum Reprod.* - 2011. - Vol.17, №10. - P. 637-652.
63. Ander, S.E. Immune responses at the maternal-fetal interface / S.E. Ander, M.S. Diamond, C.B. Coyne // *Sci Immunol.* - 2019. - Vol.4, №31. - P. eaat6114.
64. Anft, M. NK cell detachment from target cells is regulated by successful cytotoxicity and influences cytokine production / M. Anft, P. Netter, D. Urlaub, I. Prager, S. Schaffner, C. Watzl // *Cell Mol Immunol.* - 2020. - Vol.17, №4. - P. 347-355.
65. Angelo, L.S. Practical NK cell phenotyping and variability in healthy adults / L.S. Angelo, P.P. Banerjee, L. Monaco-Shawver, J.B. Rosen, G. Makedonas, L.R. Forbes, E.M. Mace, J.S. Orange // *Immunol Res.* - 2015. - Vol.62, №3. - P. 341-356.
66. Anton, O.M. NK Cell Proliferation Induced by IL-15 Transpresentation Is Negatively Regulated by Inhibitory Receptors / O.M. Anton, S. Vielkind, M.E. Peterson, Y. Tagaya, E.O. Long // *J Immunol.* - 2015. - Vol.195, №10. - P. 4810-4821.
67. Aplin, J.D. Adhesion molecules in human trophoblast - a review. I. Villous trophoblast / J.D. Aplin, C.J. Jones, L.K. Harris // *Placenta.* - 2009. - Vol.30, №4. - P. 293-298.
68. Aporta, A. Granulysin induces apoptotic cell death and cleavage of the autophagy regulator Atg5 in human hematological tumors / A. Aporta, E. Catalan, P. Galan-Malo, A. Ramirez-Labrada, M. Perez, G. Azaceta, L. Palomera, J. Naval, I. Marzo, J. Pardo, A. Anel // *Biochem Pharmacol.* - 2014. - Vol.87, №3. - P. 410-423.
69. Apps, R. Natural-killer cell ligands at the maternal-fetal interface: UL-16 binding proteins, MHC class-I chain related molecules, HLA-F and CD48 / R. Apps, L. Gardner, J. Traherne, V. Male, A. Moffett // *Hum Reprod.* - 2008. - Vol.23, №11. - P. 2535-2548.
70. Aquino-Lopez, A. Interferon Gamma Induces Changes in Natural Killer (NK) Cell Ligand Expression and Alters NK Cell-Mediated Lysis of Pediatric Cancer Cell Lines / A. Aquino-Lopez, V.V. Senyukov, Z. Vlasic, E.S. Kleinerman, D.A. Lee // *Front Immunol.* - 2017. - Vol.8. - P. 391.
71. Ardoin, S.P. The role of microparticles in inflammation and thrombosis / S.P. Ardoin, J.C. Shanahan, D.S. Pisetsky // *Scand J Immunol.* - 2007. - Vol.66, №2-3. - P. 159-165.
72. Arutyunyan, A. Spatial multiomics map of trophoblast development in early pregnancy / A. Arutyunyan, K. Roberts, K. Troule, F.C.K. Wong, M.A. Sheridan, I. Kats, L. Garcia-Alonso, B. Velten, R. Hoo, E.R. Ruiz-Morales, C. Sancho-Serra, J. Shilts, L.F. Handfield, L. Marconato, E. Tuck, L. Gardner, C.I. Mazzeo, Q. Li, I. Kelava, G.J. Wright, E. Prigmore, S.A. Teichmann, O.A. Bayraktar, A. Moffett, O. Stegle, M.Y. Turco, R. Vento-Tormo // *Nature.* - 2023. - Vol.616, №7955. - P. 143-151.

73. Ashkar, A.A. Assessment of requirements for IL-15 and IFN regulatory factors in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy / A.A. Ashkar, G.P. Black, Q. Wei, H. He, L. Liang, J.R. Head, B.A. Croy // *J Immunol.* - 2003. - Vol.171, №6. - P. 2937-2944.
74. Ataya, M. Pretransplant adaptive NKG2C<sup>+</sup> NK cells protect against cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients / M. Ataya, D. Redondo-Pachon, L. Llinas-Mallol, J. Yelamos, G. Heredia, M.J. Perez-Saez, J. Vila, M. Costa-Garcia, D. Raich-Regue, C. Vilches, J. Pascual, M. Crespo, M. Lopez-Botet // *Am J Transplant.* - 2020. - Vol.20, №3. - P. 663-676.
75. Awoyemi, T. Syncytiotrophoblast Extracellular Vesicles From Late-Onset Preeclampsia Placentae Suppress Pro-Inflammatory Immune Response in THP-1 Macrophages / T. Awoyemi, C. Motta-Mejia, W. Zhang, L. Kouser, K. White, N. Kandzija, F.S. Alhamlan, A.P. Cribbs, D. Tannetta, E. Mazey, C. Redman, U. Kishore, M. Vatish // *Front Immunol.* - 2021. - Vol.12. - P. 676056.
76. Azar, C. RNA-Seq identifies genes whose proteins are transformative in the differentiation of cytotrophoblast to syncytiotrophoblast, in human primary villous and BeWo trophoblasts / C. Azar, M. Valentine, J. Trausch-Azar, T. Druley, D.M. Nelson, A.L. Schwartz // *Sci Rep.* - 2018. - Vol.8, №1. - P. 5142.
77. Banerjee, P.P. Cdc42-interacting protein-4 functionally links actin and microtubule networks at the cytolytic NK cell immunological synapse / P.P. Banerjee, R. Pandey, R. Zheng, M.M. Suhoski, L. Monaco-Shawver, J.S. Orange // *J Exp Med.* - 2007. - Vol.204, №10. - P. 2305-2320.
78. Bao, S.H. Increased expression of Toll-like receptor 3 in decidual natural killer cells of patients with unexplained recurrent spontaneous miscarriage / S.H. Bao, W. Shuai, J. Tong, L. Wang, P. Chen, J. Sun // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* - 2012. - Vol.165, №2. - P. 326-330.
79. Barrow, A.D. The Natural Cytotoxicity Receptors in Health and Disease / A.D. Barrow, C.J. Martin, M. Colonna // *Front Immunol.* - 2019. - Vol.10. - P. 909.
80. Baume, D.M. Differential responses to interleukin 2 define functionally distinct subsets of human natural killer cells / D.M. Baume, M.J. Robertson, H. Levine, T.J. Manley, P.W. Schow, J. Ritz // *Eur J Immunol.* - 1992. - Vol.22, №1. - P. 1-6.
81. Bearfield, C. The secretion and effect of inhibin A, activin A and follistatin on first-trimester trophoblasts in vitro / C. Bearfield, E. Jauniaux, N. Groome, I.L. Sargent, S. Muttukrishna // *Eur J Endocrinol.* - 2005. - Vol.152, №6. - P. 909-916.
82. Becknell, B. Interleukin-2, Interleukin-15, and Their Roles in Human Natural Killer Cells / B. Becknell, M.A. Caligiuri // *Advances in Immunology.* - 2005. - Vol.86. - P. 209-239.
83. Beer, A.E. Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple failed in vitro fertilization

- cycles / A.E. Beer, J.Y. Kwak, J.E. Ruiz // *Am J Reprod Immunol.* - 1996. - Vol.35, №4. - P. 376-382.
84. Bellone, G. Regulation of NK cell functions by TGF-beta 1 / G. Bellone, M. Aste-Amezaga, G. Trinchieri, U. Rodeck // *J Immunol.* - 1995. - Vol.155, №3. - P. 1066-1073.
85. Berahovich, R.D. Evidence for NK cell subsets based on chemokine receptor expression / R.D. Berahovich, N.L. Lai, Z. Wei, L.L. Lanier, T.J. Schall // *J Immunol.* - 2006. - Vol.177, №11. - P. 7833-7840.
86. Berchem, G. Hypoxic tumor-derived microvesicles negatively regulate NK cell function by a mechanism involving TGF-beta and miR23a transfer / G. Berchem, M.Z. Noman, M. Bosseler, J. Paggetti, S. Baconnais, E. Le Cam, A. Nanbakhsh, E. Moussay, F. Mami-Chouaib, B. Janji, S. Chouaib // *Oncoimmunology.* - 2016. - Vol.5, №4. - P. e1062968.
87. Bernardini, G. Dysregulation of Chemokine/Chemokine Receptor Axes and NK Cell Tissue Localization during Diseases / G. Bernardini, F. Antonangeli, V. Bonanni, A. Santoni // *Front Immunol.* - 2016. - Vol.7. - P. 402.
88. Bernardini, G. Chemokines and NK cells: regulators of development, trafficking and functions / G. Bernardini, A. Gismondi, A. Santoni // *Immunol Lett.* - 2012. - Vol.145, №1-2. - P. 39-46.
89. Bernimoulin, M. Differential stimulation of monocytic cells results in distinct populations of microparticles / M. Bernimoulin, E.K. Waters, M. Foy, B.M. Steele, M. Sullivan, H. Falet, M.T. Walsh, N. Barteneva, J.G. Geng, J.H. Hartwig, P.B. Maguire, D.D. Wagner // *J Thromb Haemost.* - 2009. - Vol.7, №6. - P. 1019-1028.
90. Bernink, J.H. Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues / J.H. Bernink, C.P. Peters, M. Munneke, A.A. te Velde, S.L. Meijer, K. Weijer, H.S. Hreggvidsdottir, S.E. Heinsbroek, N. Legrand, C.J. Buskens, W.A. Bemelman, J.M. Mjosberg, H. Spits // *Nat Immunol.* - 2013. - Vol.14, №3. - P. 221-229.
91. Berrien-Elliott, M.M. Hematopoietic cell transplantation donor-derived memory-like NK cells functionally persist after transfer into patients with leukemia / M.M. Berrien-Elliott, J.A. Foltz, D.A. Russler-Germain, C.C. Neal, J. Tran, M. Gang, P. Wong, B. Fisk, C.C. Cubitt, N.D. Marin, A.Y. Zhou, M.T. Jacobs, M. Foster, T. Schappe, E. McClain, S. Kersting-Schadek, S. Desai, P. Pence, M. Becker-Hapak, J. Eisele, M. Mosior, L. Marsala, O.L. Griffith, M. Griffith, S.M. Khan, D.H. Spencer, J.F. DiPersio, R. Romee, G.L. Uy, C.N. Abboud, A. Ghobadi, P. Westervelt, K. Stockerl-Goldstein, M.A. Schroeder, F. Wan, W.R. Lie, P. Soon-Shiong, A.A. Petti, A.F. Cashen, T.A. Fehniger // *Sci Transl Med.* - 2022. - Vol.14, №633. - P. eabm1375.
92. Beziat, V. NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs / V. Beziat, L.L. Liu, J.A. Malmberg, M.A. Ivarsson, E. Sohlberg, A.T. Bjorklund, C. Retiere, E. Sverre-remark-Ekstrom, J. Traherne, P. Ljungman, M.

- Schaffer, D.A. Price, J. Trowsdale, J. Michaelsson, H.G. Ljunggren, K.J. Malmberg // *Blood*. - 2013. - Vol.121, №14. - P. 2678-2688.
93. Bhat, R. Serial killing of tumor cells by human natural killer cells--enhancement by therapeutic antibodies / R. Bhat, C. Watzl // *PLoS One*. - 2007. - Vol.2, №3. - P. e326.
94. Billot, K. Differential aiolos expression in human hematopoietic subpopulations / K. Billot, C. Parizot, I. Arrouss, D. Mazier, P. Debre, U.C. Rogner, A. Rebollo // *Leuk Res*. - 2010. - Vol.34, №3. - P. 289-293.
95. Bird, C.H. The granzyme B-Serpinb9 axis controls the fate of lymphocytes after lysosomal stress / C.H. Bird, M.E. Christensen, M.S. Mangan, M.D. Prakash, K.A. Sedelies, M.J. Smyth, I. Harper, N.J. Waterhouse, P.I. Bird // *Cell Death Differ*. - 2014. - Vol.21, №6. - P. 876-887.
96. Bjorklund, A.K. The heterogeneity of human CD127(+) innate lymphoid cells revealed by single-cell RNA sequencing / A.K. Bjorklund, M. Forkel, S. Picelli, V. Konya, J. Theorell, D. Friberg, R. Sandberg, J. Mjosberg // *Nat Immunol*. - 2016. - Vol.17, №4. - P. 451-460.
97. Blois, S.M. NK cell-derived IL-10 is critical for DC-NK cell dialogue at the maternal-fetal interface / S.M. Blois, N. Freitag, I. Tirado-Gonzalez, S.B. Cheng, M.M. Heimesaat, S. Bereswill, M. Rose, M.L. Conrad, G. Barrientos, S. Sharma // *Sci Rep*. - 2017. - Vol.7, №1. - P. 2189.
98. Bonanni, V. Bone Marrow NK Cells: Origin, Distinctive Features, and Requirements for Tissue Localization / V. Bonanni, G. Sciume, A. Santoni, G. Bernardini // *Front Immunol*. - 2019. - Vol.10. - P. 1569.
99. Bonanno, G. Interleukin-21 induces the differentiation of human umbilical cord blood CD34-lineage- cells into pseudomature lytic NK cells / G. Bonanno, A. Mariotti, A. Procoli, M. Corallo, G. Scambia, L. Pierelli, S. Rutella // *BMC Immunol*. - 2009. - Vol.10. - P. 46.
100. Borges, M. A two-colour fluorescence assay for the measurement of syncytial fusion between trophoblast-derived cell lines / M. Borges, P. Bose, H.G. Frank, P. Kaufmann, A.J. Potgens // *Placenta*. - 2003. - Vol.24, №10. - P. 959-964.
101. Bottger, E. Expression of interleukin-6 family receptors in NK92 cells is regulated by cytokines and not through direct interaction with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes / E. Bottger, E. Grangeiro de Carvalho, S. Meese, J.F. Kun, M. Esen // *J Interferon Cytokine Res*. - 2013. - Vol.33, №2. - P. 65-71.
102. Bottino, C. Inhibitory axes impacting on the activity and fate of Innate Lymphoid Cells / C. Bottino, A. Dondero, R. Castriconi // *Mol Aspects Med*. - 2021. - Vol.80. - P. 100985.
103. Boulenouar, S. The Residual Innate Lymphoid Cells in NFIL3-Deficient Mice Support Suboptimal Maternal Adaptations to Pregnancy / S. Boulenouar, J.M. Doisne, A. Sferruzzi-Perri, L.M. Gaynor, J. Kieckbusch, E. Balmas, H.W. Yung, S. Javadzadeh, L. Volmer, D.A.

- Hawkes, K. Phillips, H.J. Brady, A.L. Fowden, G.J. Burton, A. Moffett, F. Colucci // *Front Immunol.* - 2016. - Vol.7. - P. 43.
104. Bozzano, F. NK Cell Precursors in Human Bone Marrow in Health and Inflammation / F. Bozzano, C. Perrone, L. Moretta, A. De Maria // *Front Immunol.* - 2019. - Vol.10. - P. 2045.
105. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Anal Biochem.* - 1976. - Vol.72. - P. 248-254.
106. Brownlie, D. Metastasis-associated macrophages constrain antitumor capability of natural killer cells in the metastatic site at least partially by membrane bound transforming growth factor beta / D. Brownlie, D. Doughty-Shenton, D. Yh Soong, C. Nixon, O.C. N, M.C. L, T. Kitamura // *J Immunother Cancer.* - 2021. - Vol.9, №1. - P. e001740.
107. Burrows, T.D. Expression of adhesion molecules by endovascular trophoblast and decidual endothelial cells: implications for vascular invasion during implantation / T.D. Burrows, A. King, Y.W. Loke // *Placenta.* - 1994. - Vol.15, №1. - P. 21-33.
108. Buzza, M.S. The granzyme B inhibitor, PI-9, is differentially expressed during placental development and up-regulated in hydatidiform moles / M.S. Buzza, P. Hosking, P.I. Bird // *Placenta.* - 2006. - Vol.27, №1. - P. 62-69.
109. Cai, G. IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN-gamma when combined with IL-18 / G. Cai, R.A. Kastelein, C.A. Hunter // *Eur J Immunol.* - 1999. - Vol.29, №9. - P. 2658-2665.
110. Calatayud, S. Expression of a NK cell-restricted epitope on decidual large granular lymphocytes / S. Calatayud, E. Vivier, J. Bernaud, Y. Merieux, D. Rigal // *Int Immunol.* - 1996. - Vol.8, №10. - P. 1637-1642.
111. Caligiuri, M.A. Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors / M.A. Caligiuri, A. Zmuidzinas, T.J. Manley, H. Levine, K.A. Smith, J. Ritz // *J Exp Med.* - 1990. - Vol.171, №5. - P. 1509-1526.
112. Campbell, K.S. Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations / K.S. Campbell, A.K. Purdy // *Immunology.* - 2011. - Vol.132, №3. - P. 315-325.
113. Camussi, G. Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells / G. Camussi, M.C. Deregibus, S. Bruno, C. Grange, V. Fonsato, C. Tetta // *Am J Cancer Res.* - 2011. - Vol.1, №1. - P. 98-110.



114. Cardoso Alves, L. Non-apoptotic TRAIL function modulates NK cell activity during viral infection / L. Cardoso Alves, M.D. Berger, T. Koutsandreas, N. Kirschke, C. Lauer, R. Sporri, A. Chatziioannou, N. Corazza, P. Krebs // *EMBO Rep.* - 2020. - Vol.21, №1. - P. e48789.
115. Carlino, C. Recruitment of circulating NK cells through decidual tissues: a possible mechanism controlling NK cell accumulation in the uterus during early pregnancy / C. Carlino, H. Stabile, S. Morrone, R. Bulla, A. Soriani, C. Agostinis, F. Bossi, C. Mocci, F. Sarazani, F. Tedesco, A. Santoni, A. Gismondi // *Blood.* - 2008. - Vol.111, №6. - P. 3108-3115.
116. Carlino, C. Chemerin regulates NK cell accumulation and endothelial cell morphogenesis in the decidua during early pregnancy / C. Carlino, E. Trotta, H. Stabile, S. Morrone, R. Bulla, A. Soriani, M.L. Iannitto, C. Agostinis, C. Mocci, M. Minozzi, C. Aragona, G. Perniola, F. Tedesco, S. Sozzani, A. Santoni, A. Gismondi // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2012. - Vol.97, №10. - P. 3603-3612.
117. Carrega, P. Natural killer cell distribution and trafficking in human tissues / P. Carrega, G. Ferlazzo // *Front Immunol.* - 2012. - Vol.3. - P. 347.
118. Cartwright, J.E. Trophoblast interactions with endothelial cells are increased by interleukin-1beta and tumour necrosis factor alpha and involve vascular cell adhesion molecule-1 and alpha4beta1 / J.E. Cartwright, G. Balarajah // *Exp Cell Res.* - 2005. - Vol.304, №1. - P. 328-336.
119. Cartwright, J.E. Remodelling at the maternal-fetal interface: relevance to human pregnancy disorders / J.E. Cartwright, R. Fraser, K. Leslie, A.E. Wallace, J.L. James // *Reproduction.* - 2010. - Vol.140, №6. - P. 803-813.
120. Castellucci, M. Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion / M. Castellucci, R. De Matteis, A. Meisser, R. Canello, V. Monsurro, D. Islami, R. Sarzani, D. Marzoni, S. Cinti, P. Bischof // *Mol Hum Reprod.* - 2000. - Vol.6, №10. - P. 951-958.
121. Castriconi, R. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells / R. Castriconi, C. Cantoni, M. Della Chiesa, M. Vitale, E. Marcenaro, R. Conte, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta, A. Moretta // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2003. - Vol.100, №7. - P. 4120-4125.
122. Casu, B. Novel Immunoregulatory Functions of IL-18, an Accomplice of TGF-beta1 / B. Casu, A. Dondero, S. Regis, F. Caliendo, A. Petretto, M. Bartolucci, F. Bellora, C. Bottino, R. Castriconi // *Cancers (Basel).* - 2019. - Vol.11, №1. - P. 75.
123. Cattini, P.A. Immunolocalization of basic fibroblast growth factor (bFGF) in growing and growth-inhibited placental cells: a possible role for bFGF in placental cell development / P.A. Cattini, B. Nickel, M. Bock, E. Kardami // *Placenta.* - 1991. - Vol.12, №4. - P. 341-352.

124. Cepero-Donates, Y. Homeostasis of IL-15 dependent lymphocyte subsets in the liver / Y. Cepero-Donates, V. Rakotoarivelo, M. Mayhue, A. Ma, Y.G. Chen, S. Ramanathan // *Cytokine*. - 2016. - Vol.82. - P. 95-101.
125. Cerdeira, A.S. Conversion of peripheral blood NK cells to a decidual NK-like phenotype by a cocktail of defined factors / A.S. Cerdeira, A. Rajakumar, C.M. Royle, A. Lo, Z. Husain, R.I. Thadhani, V.P. Sukhatme, S.A. Karumanchi, H.D. Kopcow // *J Immunol*. - 2013. - Vol.190, №8. - P. 3939-3948.
126. Chang, W.L. PLAC8, a new marker for human interstitial extravillous trophoblast cells, promotes their invasion and migration / W.L. Chang, Y.W. Liu, Y.L. Dang, X.X. Jiang, H. Xu, X. Huang, Y.L. Wang, H. Wang, C. Zhu, L.Q. Xue, H.Y. Lin, W. Meng, H. Wang // *Development*. - 2018. - Vol.145, №2. - P. dev148932.
127. Charnock-Jones, D.S. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation / D.S. Charnock-Jones, P. Kaufmann, T.M. Mayhew // *Placenta*. - 2004. - Vol.25, №2-3. - P. 103-113.
128. Chatterjee, P. Regulation of the Anti-Inflammatory Cytokines Interleukin-4 and Interleukin-10 during Pregnancy / P. Chatterjee, V.L. Chiasson, K.R. Bounds, B.M. Mitchell // *Front Immunol*. - 2014. - Vol.5. - P. 253.
129. Chau, K. Effect of Placental Growth Factor on Trophoblast-Endothelial Cell Interactions In Vitro / K. Chau, B. Xu, A. Hennessy, A. Makris // *Reprod Sci*. - 2020. - Vol.27, №6. - P. 1285-1292.
130. Chen, C.P. Expression of Interferon gamma by Decidual Cells and Natural Killer Cells at the Human Implantation Site: Implications for Preeclampsia, Spontaneous Abortion, and Intrauterine Growth Restriction / C.P. Chen, L. Piao, X. Chen, J. Yu, R. Masch, F. Schatz, C.J. Lockwood, S.J. Huang // *Reprod Sci*. - 2015. - Vol.22, №11. - P. 1461-1467.
131. Chen, L.M. IL-6, TNFalpha and TGFbeta promote nonapoptotic trophoblast deportation and subsequently causes endothelial cell activation / L.M. Chen, B. Liu, H.B. Zhao, P. Stone, Q. Chen, L. Chamley // *Placenta*. - 2010. - Vol.31, №1. - P. 75-80.
132. Chen, R.H. Interleukin-6 inhibits transforming growth factor-beta-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and signal transducers and activators of transcription 3 pathways / R.H. Chen, M.C. Chang, Y.H. Su, Y.T. Tsai, M.L. Kuo // *J Biol Chem*. - 1999. - Vol.274, №33. - P. 23013-23019.
133. Chen, Y. The depletion of MARVELD1 leads to murine placenta accreta via integrin beta4-dependent trophoblast cell invasion / Y. Chen, H. Zhang, F. Han, L. Yue, C. Qiao, Y. Zhang, P. Dou, W. Liu, Y. Li // *J Cell Physiol*. - 2018. - Vol.233, №3. - P. 2257-2269.

134. Cheng, J.C. Transforming growth factor-beta1 inhibits trophoblast cell invasion by inducing Snail-mediated down-regulation of vascular endothelial-cadherin protein / J.C. Cheng, H.M. Chang, P.C. Leung // *J Biol Chem.* - 2013. - Vol.288, №46. - P. 33181-33192.
135. Chiba, H. Expression of Natural Cytotoxicity Receptors on and Intracellular Cytokine Production by NK Cells in Women with Gestational Diabetes Mellitus / H. Chiba, A. Fukui, K. Fuchinoue, A. Funamizu, K. Tanaka, H. Mizunuma // *Am J Reprod Immunol.* - 2016. - Vol.75, №5. - P. 529-538.
136. Chiossone, L. Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program / L. Chiossone, J. Chaix, N. Fuseri, C. Roth, E. Vivier, T. Walzer // *Blood.* - 2009. - Vol.113, №22. - P. 5488-5496.
137. Chiossone, L. In vivo generation of decidual natural killer cells from resident hematopoietic progenitors / L. Chiossone, P. Vacca, P. Orecchia, D. Croxatto, P. Damonte, S. Astigiano, O. Barbieri, C. Bottino, L. Moretta, M.C. Mingari // *Haematologica.* - 2014. - Vol.99, №3. - P. 448-457.
138. Chitadze, G. Generation of soluble NKG2D ligands: proteolytic cleavage, exosome secretion and functional implications / G. Chitadze, J. Bhat, M. Lettau, O. Janssen, D. Kabelitz // *Scand J Immunol.* - 2013. - Vol.78, №2. - P. 120-129.
139. Chiva-Blanch, G. CD142+/CD61+, CD146+ and CD45+ microparticles predict cardiovascular events in high risk patients following a Mediterranean diet supplemented with nuts / G. Chiva-Blanch, J. Crespo, R. Suades, G. Arderiu, T. Padro, G. Vilahur, J. Cubedo, D. Corella, J. Salas-Salvado, F. Aros, M.A. Martinez-Gonzalez, E. Ros, M. Fito, R. Estruch, L. Badimon // *Thromb Haemost.* - 2016. - Vol.116, №1. - P. 103-114.
140. Choudhury, R.H. Extravillous Trophoblast and Endothelial Cell Crosstalk Mediates Leukocyte Infiltration to the Early Remodeling Decidual Spiral Arteriole Wall / R.H. Choudhury, C.E. Dunk, S.J. Lye, J.D. Aplin, L.K. Harris, R.L. Jones // *J Immunol.* - 2017. - Vol.198, №10. - P. 4115-4128.
141. Choudhury, R.H. Decidual leucocytes infiltrating human spiral arterioles are rich source of matrix metalloproteinases and degrade extracellular matrix in vitro and in situ / R.H. Choudhury, C.E. Dunk, S.J. Lye, L.K. Harris, J.D. Aplin, R.L. Jones // *Am J Reprod Immunol.* - 2019. - Vol.81, №1. - P. e13054.
142. Chuntharapai, A. Monoclonal antibodies detect different distribution patterns of IL-8 receptor A and IL-8 receptor B on human peripheral blood leukocytes / A. Chuntharapai, J. Lee, C.A. Hebert, K.J. Kim // *J Immunol.* - 1994. - Vol.153, №12. - P. 5682-5688.

143. Clancy, J.W. Tumor-derived microvesicles in the tumor microenvironment: How vesicle heterogeneity can shape the future of a rapidly expanding field / J.W. Clancy, C.J. Tricarico, C. D'Souza-Schorey // *Bioessays*. - 2015. - Vol.37, №12. - P. 1309-1316.
144. Clark, S.E. NK Cell IL-10 Production Requires IL-15 and IL-10 Driven STAT3 Activation / S.E. Clark, K.S. Burrack, S.C. Jameson, S.E. Hamilton, L.L. Lenz // *Front Immunol*. - 2019. - Vol.10. - P. 2087.
145. Clark, S.E. A Batf3/Nlrp3/IL-18 Axis Promotes Natural Killer Cell IL-10 Production during *Listeria monocytogenes* Infection / S.E. Clark, R.L. Schmidt, D.S. McDermott, L.L. Lenz // *Cell Rep*. - 2018. - Vol.23, №9. - P. 2582-2594.
146. Co, E.C. Maternal decidual macrophages inhibit NK cell killing of invasive cytotrophoblasts during human pregnancy / E.C. Co, M. Gormley, M. Kapidzic, D.B. Rosen, M.A. Scott, H.A. Stolp, M. McMaster, L.L. Lanier, A. Barcena, S.J. Fisher // *Biol Reprod*. - 2013. - Vol.88, №6. - P. 155.
147. Cochran, A.M. Extracellular Vesicles From the Human Natural Killer Cell Line NK3.3 Have Broad and Potent Anti-Tumor Activity / A.M. Cochran, J. Kornbluth // *Front Cell Dev Biol*. - 2021. - Vol.9. - P. 698639.
148. Comins-Boo, A. Functional NK surrogate biomarkers for inflammatory recurrent pregnancy loss and recurrent implantation failure / A. Comins-Boo, I. Cristobal, M. Fernandez-Arquero, E. Rodriguez de Frias, M. Calvo Urrutia, L. Pilar Suarez, P. Gasca Escorial, M. Angel Herraiz, S. Sanchez-Ramon // *Am J Reprod Immunol*. - 2021. - Vol.86, №2. - P. e13426.
149. Conlon, K.C. Redistribution, hyperproliferation, activation of natural killer cells and CD8 T cells, and cytokine production during first-in-human clinical trial of recombinant human interleukin-15 in patients with cancer / K.C. Conlon, E. Lugli, H.C. Welles, S.A. Rosenberg, A.T. Fojo, J.C. Morris, T.A. Fleisher, S.P. Dubois, L.P. Perera, D.M. Stewart, C.K. Goldman, B.R. Bryant, J.M. Decker, J. Chen, T.A. Worthy, W.D. Figg, Sr., C.J. Peer, M.C. Sneller, H.C. Lane, J.L. Yovandich, S.P. Creekmore, M. Roederer, T.A. Waldmann // *J Clin Oncol*. - 2015. - Vol.33, №1. - P. 74-82.
150. Cools, N. Immunosuppression induced by immature dendritic cells is mediated by TGF-beta/IL-10 double-positive CD4+ regulatory T cells / N. Cools, V.F. Van Tendeloo, E.L. Smits, M. Lenjou, G. Nijs, D.R. Van Bockstaele, Z.N. Berneman, P. Ponsaerts // *J Cell Mol Med*. - 2008. - Vol.12, №2. - P. 690-700.
151. Cooper, M.A. In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells / M.A. Cooper, J.E. Bush, T.A. Fehniger, J.B. VanDeusen, R.E. Waite, Y. Liu, H.L. Aguila, M.A. Caligiuri // *Blood*. - 2002. - Vol.100, №10. - P. 3633-3638.

152. Cooper, M.A. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset / M.A. Cooper, T.A. Fehniger, S.C. Turner, K.S. Chen, B.A. Ghaheri, T. Ghayur, W.E. Carson, M.A. Caligiuri // *Blood*. - 2001. - Vol.97, №10. - P. 3146-3151.
153. Cortez, V.S. Transforming Growth Factor-beta Signaling Guides the Differentiation of Innate Lymphoid Cells in Salivary Glands / V.S. Cortez, L. Cervantes-Barragan, M.L. Robinette, J.K. Bando, Y. Wang, T.L. Geiger, S. Gilfillan, A. Fuchs, E. Vivier, J.C. Sun, M. Cella, M. Colonna // *Immunity*. - 2016. - Vol.44, №5. - P. 1127-1139.
154. Cortez, V.S. SMAD4 impedes the conversion of NK cells into ILC1-like cells by curtailing non-canonical TGF-beta signaling / V.S. Cortez, T.K. Ulland, L. Cervantes-Barragan, J.K. Bando, M.L. Robinette, Q. Wang, A.J. White, S. Gilfillan, M. Cella, M. Colonna // *Nat Immunol.* - 2017. - Vol.18, №9. - P. 995-1003.
155. Couch, Y. A brief history of nearly EV-erything - The rise and rise of extracellular vesicles / Y. Couch, E.I. Buzas, D. Di Vizio, Y.S. Gho, P. Harrison, A.F. Hill, J. Lotvall, G. Raposo, P.D. Stahl, C. Thery, K.W. Witwer, D.R.F. Carter // *J Extracell Vesicles*. - 2021. - Vol.10, №14. - P. e12144.
156. Coulomb-L'Hermine, A. Expression of interleukin-27 by human trophoblast cells / A. Coulomb-L'Hermine, F. Larousserie, S. Pflanz, E. Bardel, R.A. Kastelein, O. Devergne // *Placenta*. - 2007. - Vol.28, №11-12. - P. 1133-1140.
157. Crinier, A. Helper-like innate lymphoid cells and cancer immunotherapy / A. Crinier, E. Vivier, M. Blery // *Semin Immunol.* - 2019. - Vol.41. - P. 101274.
158. Crocker, I.P. Vascular endothelial growth factor but not placental growth factor promotes trophoblast syncytialization in vitro / I.P. Crocker, B.K. Strachan, G.E. Lash, S. Cooper, A.Y. Warren, P.N. Baker // *J Soc Gynecol Investig.* - 2001. - Vol.8, №6. - P. 341-346.
159. Cronk, J.M. Licensing Natural Killers for Antiviral Immunity / J.M. Cronk, E. Fafoutis, M.G. Brown // *Pathogens*. - 2021. - Vol.10, №7. - P. 908.
160. Cronqvist, T. Syncytiotrophoblast derived extracellular vesicles transfer functional placental miRNAs to primary human endothelial cells / T. Cronqvist, D. Tannetta, M. Morgelin, M. Belting, I. Sargent, M. Familiar, S.R. Hansson // *Sci Rep*. - 2017. - Vol.7, №1. - P. 4558.
161. Croxatto, D. Stromal cells from human decidua exert a strong inhibitory effect on NK cell function and dendritic cell differentiation / D. Croxatto, P. Vacca, F. Canegallo, R. Conte, P.L. Venturini, L. Moretta, M.C. Mingari // *PLoS One*. - 2014. - Vol.9, №2. - P. e89006.
162. Croy, B.A. Transplantation into genetically alymphoid mice as an approach to dissect the roles of uterine natural killer cells during pregnancy--a review / B.A. Croy, J.P. Di Santo, J.D. Greenwood, S. Chantakru, A.A. Ashkar // *Placenta*. - 2000. - Vol.21 Suppl A. - P. S77-80.

163. Cui, F. NK cell-produced IFN-gamma regulates cell growth and apoptosis of colorectal cancer by regulating IL-15 / F. Cui, D. Qu, R. Sun, M. Zhang, K. Nan // *Exp Ther Med.* - 2020. - Vol.19, №2. - P. 1400-1406.
164. Damele, L. Effect of Tyrosin Kinase Inhibitors on NK Cell and ILC3 Development and Function / L. Damele, E. Montaldo, L. Moretta, C. Vitale, M.C. Mingari // *Front Immunol.* - 2018. - Vol.9. - P. 2433.
165. DaSilva-Arnold, S. Differentiation of first trimester cytotrophoblast to extravillous trophoblast involves an epithelial-mesenchymal transition / S. DaSilva-Arnold, J.L. James, A. Al-Khan, S. Zamudio, N.P. Illsley // *Placenta.* - 2015. - Vol.36, №12. - P. 1412-1418.
166. de Mendonca Vieira, R. Human Term Pregnancy Decidual NK Cells Generate Distinct Cytotoxic Responses / R. de Mendonca Vieira, A. Meagher, A.C. Crespo, S.K. Kshirsagar, V. Iyer, E.R. Norwitz, J.L. Strominger, T. Tilburgs // *J Immunol.* - 2020. - Vol.204, №12. - P. 3149-3159.
167. de Moraes-Pinto, M.I. Localization of IL-4 and IL-4 receptors in the human term placenta, decidua and amniochorionic membranes / M.I. de Moraes-Pinto, G.S. Vince, B.F. Flanagan, C.A. Hart, P.M. Johnson // *Immunology.* - 1997. - Vol.90, №1. - P. 87-94.
168. De Oliveira, L.G. Role of interleukin 8 in uterine natural killer cell regulation of extravillous trophoblast cell invasion / L.G. De Oliveira, G.E. Lash, C. Murray-Dunning, J.N. Bulmer, B.A. Innes, R.F. Searle, N. Sass, S.C. Robson // *Placenta.* - 2010. - Vol.31, №7. - P. 595-601.
169. Dean, J.W. Innate inflammation drives NK cell activation to impair Treg activity / J.W. Dean, L.D. Peters, C.A. Fuhrman, H.R. Seay, A.L. Posgai, S.E. Stimpson, M.A. Brusko, D.J. Perry, W.I. Yeh, B.N. Newby, M.J. Haller, A.B. Muir, M.A. Atkinson, C.E. Mathews, T.M. Brusko // *J Autoimmun.* - 2020. - Vol.108. - P. 102417.
170. Del Zotto, G. Markers and function of human NK cells in normal and pathological conditions / G. Del Zotto, E. Marcenaro, P. Vacca, S. Sivori, D. Pende, M. Della Chiesa, F. Moretta, T. Ingegnere, M.C. Mingari, A. Moretta, L. Moretta // *Cytometry B Clin Cytom.* - 2017. - Vol.92, №2. - P. 100-114.
171. Delconte, R.B. The Helix-Loop-Helix Protein ID2 Governs NK Cell Fate by Tuning Their Sensitivity to Interleukin-15 / R.B. Delconte, W. Shi, P. Sathe, T. Ushiki, C. Seillet, M. Minnich, T.B. Kolesnik, L.C. Rankin, L.A. Mielke, J.G. Zhang, M. Busslinger, M.J. Smyth, D.S. Hutchinson, S.L. Nutt, S.E. Nicholson, W.S. Alexander, L.M. Corcoran, E. Vivier, G.T. Belz, S. Carotta, N.D. Huntington // *Immunity.* - 2016. - Vol.44, №1. - P. 103-115.
172. Demina, A.B. HLA-B27-associated uveitis: From pathogenesis to therapy / A.B. Demina, T.V. Dubinina, S.F. Erdes // *Modern Rheumatology Journal.* - 2015. - Vol.9, №4. - P. 98-105.

173. Deng, M. Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B: therapeutic targets in cancer / M. Deng, H. Chen, X. Liu, R. Huang, Y. He, B. Yoo, J. Xie, S. John, N. Zhang, Z. An, C.C. Zhang // *Antib Ther.* - 2021. - Vol.4, №1. - P. 16-33.
174. Denney, J.M. Longitudinal modulation of immune system cytokine profile during pregnancy / J.M. Denney, E.L. Nelson, P.D. Wadhwa, T.P. Waters, L. Mathew, E.K. Chung, R.L. Goldenberg, J.F. Culhane // *Cytokine.* - 2011. - Vol.53, №2. - P. 170-177.
175. Diefenbach, A. Development, differentiation, and diversity of innate lymphoid cells / A. Diefenbach, M. Colonna, S. Koyasu // *Immunity.* - 2014. - Vol.41, №3. - P. 354-365.
176. Diefenbach, A. The ILC World Revisited / A. Diefenbach, M. Colonna, C. Romagnani // *Immunity.* - 2017. - Vol.46, №3. - P. 327-332.
177. Dietrich, B. 3-Dimensional JEG-3 choriocarcinoma cell organoids as a model for trophoblast expansion and differentiation / B. Dietrich, V. Kunihs, S. Haider, J. Pollheimer, M. Knofler // *Placenta.* - 2021. - Vol.104. - P. 243-246.
178. Dimberg, L.Y. Stat1 activation attenuates IL-6 induced Stat3 activity but does not alter apoptosis sensitivity in multiple myeloma / L.Y. Dimberg, A. Dimberg, K. Ivarsson, M. Fryknas, L. Rickardson, G. Tobin, S. Ekman, R. Larsson, U. Gullberg, K. Nilsson, F. Oberg, H.J. Wiklund // *BMC Cancer.* - 2012. - Vol.12. - P. 318.
179. Dimeloe, S. Tumor-derived TGF-beta inhibits mitochondrial respiration to suppress IFN-gamma production by human CD4(+) T cells / S. Dimeloe, P. Gubser, J. Loeliger, C. Frick, L. Develioglu, M. Fischer, F. Marquardsen, G.R. Bantug, D. Thommen, Y. Lecoultre, A. Zippelius, A. Langenkamp, C. Hess // *Sci Signal.* - 2019. - Vol.12, №599. - P. eaav3334.
180. Dinarello, C.A. Interleukin-18 and IL-18 binding protein / C.A. Dinarello, D. Novick, S. Kim, G. Kaplanski // *Front Immunol.* - 2013. - Vol.4. - P. 289.
181. Ding, J. Trophoblast-derived IL-6 serves as an important factor for normal pregnancy by activating Stat3-mediated M2 macrophages polarization / J. Ding, C. Yang, Y. Cheng, J. Wang, S. Zhang, S. Yan, F. He, T. Yin, J. Yang // *Int Immunopharmacol.* - 2021. - Vol.90. - P. 106788.
182. Ding, L. IL-36 cytokines in autoimmunity and inflammatory disease / L. Ding, X. Wang, X. Hong, L. Lu, D. Liu // *Oncotarget.* - 2018. - Vol.9, №2. - P. 2895-2901.
183. Djaoud, Z. HLAs, TCRs, and KIRs, a Triumvirate of Human Cell-Mediated Immunity / Z. Djaoud, P. Parham // *Annu Rev Biochem.* - 2020. - Vol.89. - P. 717-739.
184. Dogra, P. Tissue Determinants of Human NK Cell Development, Function, and Residence / P. Dogra, C. Rancan, W. Ma, M. Toth, T. Senda, D.J. Carpenter, M. Kubota, R. Matsumoto, P. Thapa, P.A. Szabo, M.M. Li Poon, J. Li, J. Arakawa-Hoyt, Y. Shen, L. Fong, L.L. Lanier, D.L. Farber // *Cell.* - 2020. - Vol.180, №4. - P. 749-763 e713.

185. Doisne, J.M. Composition, Development, and Function of Uterine Innate Lymphoid Cells / J.M. Doisne, E. Balmas, S. Boulenouar, L.M. Gaynor, J. Kieckbusch, L. Gardner, D.A. Hawkes, C.F. Barbara, A.M. Sharkey, H.J. Brady, J.J. Brosens, A. Moffett, F. Colucci // *J Immunol.* - 2015. - Vol.195, №8. - P. 3937-3945.
186. Dominguez, F. CXCL10 and IL-6 induce chemotaxis in human trophoblast cell lines / F. Dominguez, S. Martinez, A. Quinonero, F. Loro, J.A. Horcajadas, A. Pellicer, C. Simon // *Mol Hum Reprod.* - 2008. - Vol.14, №7. - P. 423-430.
187. Donadi, E.A. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association / E.A. Donadi, E.C. Castelli, A. Arnaiz-Villena, M. Roger, D. Rey, P. Moreau // *Cell Mol Life Sci.* - 2011. - Vol.68, №3. - P. 369-395.
188. Dragovic, R.A. Isolation of syncytiotrophoblast microvesicles and exosomes and their characterisation by multicolour flow cytometry and fluorescence Nanoparticle Tracking Analysis / R.A. Dragovic, G.P. Collett, P. Hole, D.J. Ferguson, C.W. Redman, I.L. Sargent, D.S. Tannetta // *Methods.* - 2015. - Vol.87. - P. 64-74.
189. Driessler, F. Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF-kappaB activity: a role for p50 / F. Driessler, K. Venstrom, R. Sabat, K. Asadullah, A.J. Schottelius // *Clin Exp Immunol.* - 2004. - Vol.135, №1. - P. 64-73.
190. Du, M. Natural killer cells in the pathogenesis of preeclampsia: a double-edged sword / M. Du, W. Wang, L. Huang, X. Guan, W. Lin, J. Yao, L. Li // *J Matern Fetal Neonatal Med.* - 2022. - Vol.35, №6. - P. 1028-1035.
191. Dubois, S. IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells / S. Dubois, J. Mariner, T.A. Waldmann, Y. Tagaya // *Immunity.* - 2002. - Vol.17, №5. - P. 537-547.
192. Dunn, C.L. IL-15 regulation in human endometrial stromal cells / C.L. Dunn, H.O. Critchley, R.W. Kelly // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2002. - Vol.87, №4. - P. 1898-1901.
193. Dustin, M.L. Cytotoxic immunological synapses / M.L. Dustin, E.O. Long // *Immunol Rev.* - 2010. - Vol.235, №1. - P. 24-34.
194. Easom, N.J.W. IL-15 Overcomes Hepatocellular Carcinoma-Induced NK Cell Dysfunction / N.J.W. Easom, K.A. Stegmann, L. Swadling, L.J. Pallett, A.R. Burton, D. Odera, N. Schmidt, W.C. Huang, G. Fusai, B. Davidson, M.K. Maini // *Front Immunol.* - 2018. - Vol.9. - P. 1009.
195. Eikmans, M. Primary Trophoblast Cultures: Characterization of HLA Profiles and Immune Cell Interactions / M. Eikmans, C. van der Keur, J.D.H. Anholts, J.J.M. Drabbels, E. van Beelen, S.M.C. de Sousa Lopes, M.L. van der Hoorn // *Front Immunol.* - 2022. - Vol.13. - P. 814019.
196. El-Badawy, O. Cross-Talk between Mucosal-Associated Invariant T, Natural Killer, and Natural Killer T Cell Populations is Implicated in the Pathogenesis of Placenta Accreta



- Spectrum / O. El-Badawy, A.M. Abbas, E. Radwan, R. Makboul, A.A. Khamis, M. Ali, M.M. Elkabsh, M.H. Bakr, A.M. Zahran // *Inflammation*. - 2023. - P. 1-17.
197. El-Badawy, O. Concordance between peripheral and decidual NK cell subsets and killer immunoglobulin-like receptors in women with recurrent spontaneous miscarriages / O. El-Badawy, A.S. Helmy, A.M. Abbas, A.M. Zahran, N.A. Afifi, M.H. Abdel-Rahim // *J Reprod Immunol*. - 2020. - Vol.140. - P. 103-130.
198. El-Darawish, Y. Frontline Science: IL-18 primes murine NK cells for proliferation by promoting protein synthesis, survival, and autophagy / Y. El-Darawish, W. Li, K. Yamanishi, M. Pencheva, N. Oka, H. Yamanishi, T. Matsuyama, Y. Tanaka, N. Minato, H. Okamura // *J Leukoc Biol*. - 2018. - Vol.104, №2. - P. 253-264.
199. El Hachem, H. Recurrent pregnancy loss: current perspectives / H. El Hachem, V. Crepaux, P. May-Panloup, P. Descamps, G. Legendre, P.E. Bouet // *Int J Womens Health*. - 2017. - Vol.9. - P. 331-345.
200. Elemam, N.M. Role of Chemokines and Chemokine Receptors in Rheumatoid Arthritis / N.M. Elemam, S. Hannawi, A.A. Maghazachi // *Immunotargets Ther*. - 2020. - Vol.9. - P. 43-56.
201. Equils, O. Chlamydia heat shock protein 60 induces trophoblast apoptosis through TLR4 / O. Equils, D. Lu, M. Gatter, S.S. Witkin, C. Bertolotto, M. Arditi, J.A. McGregor, C.F. Simmons, C.J. Hobel // *J Immunol*. - 2006. - Vol.177, №2. - P. 1257-1263.
202. Eriksson, M. Unique phenotype of human uterine NK cells and their regulation by endogenous TGF-beta / M. Eriksson, S.K. Meadows, C.R. Wira, C.L. Sentman // *J Leukoc Biol*. - 2004. - Vol.76, №3. - P. 667-675.
203. Estebanez-Perpina, E. Crystal structure of the caspase activator human granzyme B, a proteinase highly specific for an Asp-P1 residue / E. Estebanez-Perpina, P. Fuentes-Prior, D. Belorgey, M. Braun, R. Kiefersauer, K. Maskos, R. Huber, H. Rubin, W. Bode // *Biol Chem*. - 2000. - Vol.381, №12. - P. 1203-1214.
204. Euchner, J. Natural Killer Cells Generated From Human Induced Pluripotent Stem Cells Mature to CD56(bright)CD16(+)NKp80(+/-)In-Vitro and Express KIR2DL2/DL3 and KIR3DL1 / J. Euchner, J. Sprissler, T. Cathomen, D. Furst, H. Schrezenmeier, K.M. Debatin, K. Schwarz, K. Felgentreff // *Front Immunol*. - 2021. - Vol.12. - P. 640672.
205. Evans-Osses, I. Exosomes or microvesicles? Two kinds of extracellular vesicles with different routes to modify protozoan-host cell interaction / I. Evans-Osses, L.H. Reichembach, M.I. Ramirez // *Parasitol Res*. - 2015. - Vol.114, №10. - P. 3567-3575.
206. Fan, D.X. Trophoblast-Derived CXCL16 Decreased Granzyme B Production of Decidual gamma delta T Cells and Promoted Bcl-xL Expression of Trophoblasts / D.X. Fan, W.J. Zhou, L.P. Jin, M.Q. Li, X.H. Xu, C.J. Xu // *Reprod Sci*. - 2019. - Vol.26, №4. - P. 532-542.

207. Fan, J. Expression of leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B expression on immune cells in hepatocellular carcinoma / J. Fan, J. Li, J. Han, Y. Zhang, A. Gu, F. Song, J. Duan, D. Yin, L. Wang, Y. Yi // *Mol Immunol.* - 2021. - Vol.136. - P. 82-97.
208. Fang, L. TGF-beta1 inhibits human trophoblast cell invasion by upregulating kisspeptin expression through ERK1/2 but not SMAD signaling pathway / L. Fang, Y. Yan, Y. Gao, Z. Wu, Z. Wang, S. Yang, J.C. Cheng, Y.P. Sun // *Reprod Biol Endocrinol.* - 2022. - Vol.20, №1. - P. 22.
209. Fauriat, C. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition / C. Fauriat, E.O. Long, H.G. Ljunggren, Y.T. Bryceson // *Blood.* - 2010. - Vol.115, №11. - P. 2167-2176.
210. Faustman, D.L. TNF Receptor 2 and Disease: Autoimmunity and Regenerative Medicine / D.L. Faustman, M. Davis // *Front Immunol.* - 2013. - Vol.4. - P. 478.
211. Fehniger, T.A. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity / T.A. Fehniger, M.A. Cooper, G.J. Nuovo, M. Cella, F. Facchetti, M. Colonna, M.A. Caligiuri // *Blood.* - 2003. - Vol.101, №8. - P. 3052-3057.
212. Felker, A.M. Uterine natural killer cell partnerships in early mouse decidua basalis / A.M. Felker, B.A. Croy. // *J Leukoc Biol.* - 2016. - Vol.100, №4. - P. 645-655.
213. Ferrari de Andrade, L. Antibody-mediated inhibition of MICA and MICB shedding promotes NK cell-driven tumor immunity / L. Ferrari de Andrade, R.E. Tay, D. Pan, A.M. Luoma, Y. Ito, S. Badrinath, D. Tsoucas, B. Franz, K.F. May, Jr., C.J. Harvey, S. Kobold, J.W. Pyrdol, C. Yoon, G.C. Yuan, F.S. Hodi, G. Dranoff, K.W. Wucherpfennig // *Science.* - 2018. - Vol.359, №6383. - P. 1537-1542.
214. Ferretti, C. Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts / C. Ferretti, L. Bruni, V. Dangles-Marie, A.P. Pecking, D. Bellet // *Hum Reprod Update.* - 2007. - Vol.13, №2. - P. 121-141.
215. Feyaerts, D. Endometrial natural killer (NK) cells reveal a tissue-specific receptor repertoire / D. Feyaerts, T. Kuret, B. van Cranenbroek, S. van der Zeeuw-Hingrez, O.W.H. van der Heijden, A. van der Meer, I. Joosten, R.G. van der Molen // *Hum Reprod.* - 2018. - Vol.33, №3. - P. 441-451.
216. Foley, B. The biology of NK cells and their receptors affects clinical outcomes after hematopoietic cell transplantation (HCT) / B. Foley, M. Felices, F. Cichocki, S. Cooley, M.R. Verneris, J.S. Miller // *Immunol Rev.* - 2014. - Vol.258, №1. - P. 45-63.

217. Forslund, E. Microchip-Based Single-Cell Imaging Reveals That CD56dimCD57-KIR-NKG2A+ NK Cells Have More Dynamic Migration Associated with Increased Target Cell Conjugation and Probability of Killing Compared to CD56dimCD57-KIR-NKG2A- NK Cells / E. Forslund, E. Sohlberg, M. Enqvist, P.E. Olofsson, K.J. Malmberg, B. Onfelt // *J Immunol.* - 2015. - Vol.195, №7. - P. 3374-3381.
218. Fossati, G. Differential role of neutrophil Fcγ receptor IIIB (CD16) in phagocytosis, bacterial killing, and responses to immune complexes / G. Fossati, R.J. Moots, R.C. Bucknall, S.W. Edwards // *Arthritis Rheum.* - 2002. - Vol.46, №5. - P. 1351-1361.
219. Franitza, S. Differential usage of VLA-4 and CXCR4 by CD3+CD56+ NKT cells and CD56+CD16+ NK cells regulates their interaction with endothelial cells / S. Franitza, V. Grabovsky, O. Wald, I. Weiss, K. Beider, M. Dagan, M. Darash-Yahana, A. Nagler, S. Brocke, E. Galun, R. Alon, A. Peled // *Eur J Immunol.* - 2004. - Vol.34, №5. - P. 1333-1341.
220. Freud, A.G. A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells / A.G. Freud, B. Becknell, S. Roychowdhury, H.C. Mao, A.K. Ferketich, G.J. Nuovo, T.L. Hughes, T.B. Marburger, J. Sung, R.A. Baiocchi, M. Guimond, M.A. Caligiuri // *Immunity.* - 2005. - Vol.22, №3. - P. 295-304.
221. Friedland, J.C. α6β4 integrin activates Rac-dependent p21-activated kinase 1 to drive NF-κB-dependent resistance to apoptosis in 3D mammary acini / J.C. Friedland, J.N. Lakins, M.G. Kazanietz, J. Chernoff, D. Boettiger, V.M. Weaver // *J Cell Sci.* - 2007. - Vol.120, №Pt 20. - P. 3700-3712.
222. Friedman, D. Natural killer cell immune synapse formation and cytotoxicity are controlled by tension of the target interface / D. Friedman, P. Simmonds, A. Hale, L. Bere, N.W. Hodson, M.R.H. White, D.M. Davis // *J Cell Sci.* - 2021. - Vol.134, №7. - P. jcs258570.
223. Fritsch, K. Suppression of granzyme B activity and caspase-3 activation in leukaemia cells constitutively expressing the protease inhibitor 9 / K. Fritsch, J. Finke, C. Grulich // *Ann Hematol.* - 2013. - Vol.92, №12. - P. 1603-1609.
224. Fu, B. CD11b and CD27 reflect distinct population and functional specialization in human natural killer cells / B. Fu, F. Wang, R. Sun, B. Ling, Z. Tian, H. Wei // *Immunology.* - 2011. - Vol.133, №3. - P. 350-359.
225. Fu, B. Natural Killer Cells Promote Fetal Development through the Secretion of Growth-Promoting Factors / B. Fu, Y. Zhou, X. Ni, X. Tong, X. Xu, Z. Dong, R. Sun, Z. Tian, H. Wei // *Immunity.* - 2017. - Vol.47, №6. - P. 1100-1113 e1106.
226. Fu, M. Phenotypic and functional alteration of CD45+ immune cells in the decidua of preeclampsia patients analyzed by mass cytometry (CyTOF) / M. Fu, X. Zhang, C. Liu, J. Lyu,

- X. Liu, S. Zhong, Y. Liang, P. Liu, L. Huang, Z. Xiao, X. Wang, X. Liang, H. Wang, S. Fan // *Front Immunol.* - 2022. - Vol.13. - P. 1047986.
227. Fu, Q. Involvement of the JAK-STAT pathway in collagen regulation of decidual NK cells / Q. Fu, Y. Sun, Y. Tao, H. Piao, X. Wang, X. Luan, M. Du, D. Li // *Am J Reprod Immunol.* - 2017. - Vol.78, №6. - P. 1-8.
228. Fujii, R. An IL-15 superagonist/IL-15 $\alpha$  fusion complex protects and rescues NK cell-cytotoxic function from TGF- $\beta$ 1-mediated immunosuppression / R. Fujii, C. Jochems, S.R. Tritsch, H.C. Wong, J. Schlom, J.W. Hodge // *Cancer Immunol Immunother.* - 2018. - Vol.67, №4. - P. 675-689.
229. Fujiwara, H. Regulation of human extravillous trophoblast function by membrane-bound peptidases / H. Fujiwara, T. Higuchi, Y. Sato, Y. Nishioka, B.X. Zeng, S. Yoshioka, K. Tatsumi, M. Ueda, M. Maeda // *Biochim Biophys Acta.* - 2005. - Vol.1751, №1. - P. 26-32.
230. Fukui, A. Natural killer cell subpopulations and cytotoxicity for infertile patients undergoing in vitro fertilization / A. Fukui, S. Fujii, E. Yamaguchi, H. Kimura, S. Sato, Y. Saito // *Am J Reprod Immunol.* - 1999. - Vol.41, №6. - P. 413-422.
231. Fukui, A. Expression of natural cytotoxicity receptors and cytokine production on endometrial natural killer cells in women with recurrent pregnancy loss or implantation failure, and the expression of natural cytotoxicity receptors on peripheral blood natural killer cells in pregnant women with a history of recurrent pregnancy loss / A. Fukui, A. Funamizu, R. Fukuhara, H. Shibahara // *J Obstet Gynaecol Res.* - 2017. - Vol.43, №11. - P. 1678-1686.
232. Fukui, A. NK cell abnormality and its treatment in women with reproductive failures such as recurrent pregnancy loss, implantation failures, preeclampsia, and pelvic endometriosis / A. Fukui, M. Kamoi, A. Funamizu, K. Fuchinoue, H. Chiba, M. Yokota, R. Fukuhara, H. Mizunuma // *Reprod Med Biol.* - 2015. - Vol.14, №4. - P. 151-157.
233. Furmento, V.A. The granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) upregulates metalloproteinase-2 and VEGF through PI3K/Akt and Erk1/2 activation in human trophoblast Swan 71 cells / V.A. Furmento, J. Marino, V.C. Blank, L.P. Roguin // *Placenta.* - 2014. - Vol.35, №11. - P. 937-946.
234. Gabrielli, S. The Memories of NK Cells: Innate-Adaptive Immune Intrinsic Crosstalk / S. Gabrielli, C. Ortolani, G. Del Zotto, F. Luchetti, B. Canonico, F. Buccella, M. Artico, S. Papa, L. Zamai // *J Immunol Res.* - 2016. - Vol.2016. - P. 1376595.
235. Gallois, A. Reversal of natural killer cell exhaustion by TIM-3 blockade / A. Gallois, I. Silva, I. Osman, N. Bhardwaj // *Oncoimmunology.* - 2014. - Vol.3, №12. - P. e946365.
236. Gamache, A. Ly49R activation receptor drives self-MHC-educated NK cell immunity against cytomegalovirus infection / A. Gamache, J.M. Cronk, W.T. Nash, P. Puchalski, A. Gillespie, H.

- Wei, L. Gray, M.L. Hammarskjold, W. Xu, M.G. Brown // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2019. - Vol.116, №52. - P. 26768-26778.
237. Gamliel, M. Trained Memory of Human Uterine NK Cells Enhances Their Function in Subsequent Pregnancies / M. Gamliel, D. Goldman-Wohl, B. Isaacson, C. Gur, N. Stein, R. Yamin, M. Berger, M. Grunewald, E. Keshet, Y. Rais, C. Bornstein, E. David, A. Jelinski, I. Eisenberg, C. Greenfield, A. Ben-David, T. Imbar, R. Gilad, R. Haimov-Kochman, D. Mankuta, M. Elami-Suzin, I. Amit, J.H. Hanna, S. Yagel, O. Mandelboim // *Immunity.* - 2018. - Vol.48, №5. - P. 951-962 e955.
238. Gandoglia, I. In vitro VLA-4 blockade results in an impaired NK cell-mediated immune surveillance against melanoma / I. Gandoglia, F. Ivaldi, P. Carrega, E. Armentani, G. Ferlazzo, G. Mancardi, N. Kerlero de Rosbo, A. Uccelli, A. Laroni // *Immunol Lett.* - 2017. - Vol.181. - P. 109-115.
239. Gauster, M. The paradox of caspase 8 in human villous trophoblast fusion / M. Gauster, B. Huppertz // *Placenta.* - 2010. - Vol.31, №2. - P. 82-88.
240. Gaynor, L.M. Uterine Natural Killer Cells: Functional Distinctions and Influence on Pregnancy in Humans and Mice / L.M. Gaynor, F. Colucci. // *Front Immunol.* - 2017. - Vol.8. - P. 467.
241. Gays, F. Multiple cytokines regulate the NK gene complex-encoded receptor repertoire of mature NK cells and T cells / F. Gays, K. Martin, R. Kenefeck, J.G. Aust, C.G. Brooks // *J Immunol.* - 2005. - Vol.175, №5. - P. 2938-2947.
242. Ge, H. Interleukin-27 Inhibits Trophoblast Cell Invasion and Migration by Affecting the Epithelial-Mesenchymal Transition in Preeclampsia / H. Ge, N. Yin, T.L. Han, D. Huang, X. Chen, P. Xu, C. He, C. Tong, H. Qi // *Reprod Sci.* - 2019. - Vol.26, №7. - P. 928-938.
243. Ghafourian, M. Increase of CD69, CD161 and CD94 on NK cells in women with recurrent spontaneous abortion and in vitro fertilization failure / M. Ghafourian, N. Karami, A. Khodadadi, R. Nikbakht // *Iran J Immunol.* - 2014. - Vol.11, №2. - P. 84-96.
244. Gharesi-Fard, B. Proteome differences in the first- and third-trimester human placentas / B. Gharesi-Fard, J. Zolghadri, E. Kamali-Sarvestani // *Reprod Sci.* - 2015. - Vol.22, №4. - P. 462-468.
245. Giuliani, E. Characterization of uterine NK cells in women with infertility or recurrent pregnancy loss and associated endometriosis / E. Giuliani, K.L. Parkin, B.A. Lessey, S.L. Young, A.T. Fazleabas // *Am J Reprod Immunol.* - 2014. - Vol.72, №3. - P. 262-269.
246. Goda, S. Matrix metalloproteinase-1 produced by human CXCL12-stimulated natural killer cells / S. Goda, H. Inoue, H. Umehara, M. Miyaji, Y. Nagano, N. Harakawa, H. Imai, P. Lee, J.B. Macarthy, T. Ikeo, N. Domae, Y. Shimizu, J. Iida // *Am J Pathol.* - 2006. - Vol.169, №2. - P. 445-458.

247. Godbole, G. Regulation of decidualization, interleukin-11 and interleukin-15 by homeobox A 10 in endometrial stromal cells / G. Godbole, D. Modi // *J Reprod Immunol.* - 2010. - Vol.85, №2. - P. 130-139.
248. Golias, C. Physiology and pathophysiology of selectins, integrins, and IgSF cell adhesion molecules focusing on inflammation. A paradigm model on infectious endocarditis / C. Golias, A. Batistatou, G. Bablekos, A. Charalabopoulos, D. Peschos, P. Mitsopoulos, K. Charalabopoulos // *Cell Commun Adhes.* - 2011. - Vol.18, №3. - P. 19-32.
249. Gomez-Lopez, N. Invasion of the leukocytes into the fetal-maternal interface during pregnancy / N. Gomez-Lopez, L.J. Guilbert, D.M. Olson // *J Leukoc Biol.* - 2010. - Vol.88, №4. - P. 625-633.
250. Gong, J.H. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells / J.H. Gong, G. Maki, H.G. Klingemann // *Leukemia.* - 1994. - Vol.8, №4. - P. 652-658.
251. Goodridge, J.P. The genotype of the NK cell receptor, KIR2DL4, influences INFgamma secretion by decidual natural killer cells / J.P. Goodridge, L.J. Lathbury, E. John, A.K. Charles, F.T. Christiansen, C.S. Witt // *Mol Hum Reprod.* - 2009. - Vol.15, №8. - P. 489-497.
252. Gordon, S.M. The transcription factors T-bet and Eomes control key checkpoints of natural killer cell maturation / S.M. Gordon, J. Chaix, L.J. Rupp, J. Wu, S. Madera, J.C. Sun, T. Lindsten, S.L. Reiner // *Immunity.* - 2012. - Vol.36, №1. - P. 55-67.
253. Gordon, S.M. IFNs Drive Development of Novel IL-15-Responsive Macrophages / S.M. Gordon, M.A. Nishiguchi, J.M. Chase, S. Mani, M.A. Mainigi, E.M. Behrens // *J Immunol.* - 2020. - Vol.205, №4. - P. 1113-1124.
254. Gotthardt, D. JAK/STAT Cytokine Signaling at the Crossroad of NK Cell Development and Maturation / D. Gotthardt, J. Trifinopoulos, V. Sexl, E.M. Putz // *Front Immunol.* - 2019. - Vol.10. - P. 2590.
255. Granzin, M. Highly efficient IL-21 and feeder cell-driven ex vivo expansion of human NK cells with therapeutic activity in a xenograft mouse model of melanoma / M. Granzin, A. Stojanovic, M. Miller, R. Childs, V. Huppert, A. Cerwenka // *Oncoimmunology.* - 2016. - Vol.5, №9. - P. e1219007.
256. Gregori, S. HLA-G Orchestrates the Early Interaction of Human Trophoblasts with the Maternal Niche / S. Gregori, G. Amodio, F. Quattrone, P. Panina-Bordignon // *Front Immunol.* - 2015. - Vol.6. - P. 128.
257. Griffith, O.W. Embryo implantation evolved from an ancestral inflammatory attachment reaction / O.W. Griffith, A.R. Chavan, S. Protopapas, J. Maziarz, R. Romero, G.P. Wagner // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2017. - Vol.114, №32. - P. E6566-E6575.

258. Grzywacz, B. NK cells become Ki-67+ in MLC and expand depending on the lack of ligand for KIR on stimulator cells in IL-2 supplemented MLC / B. Grzywacz, D. Dlubek, A. Lange // *Hum Immunol.* - 2002. - Vol.63, №8. - P. 638-646.
259. Grzywacz, B. Coordinated acquisition of inhibitory and activating receptors and functional properties by developing human natural killer cells / B. Grzywacz, N. Kataria, M. Sikora, R.A. Oostendorp, E.A. Dzierzak, B.R. Blazar, J.S. Miller, M.R. Verneris // *Blood.* - 2006. - Vol.108, №12. - P. 3824-3833.
260. Gupta, A. Expression and targeting of lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) on white blood cells for treatment of allergic asthma / A. Gupta, V. Espinosa, L.E. Galusha, V. Rahimian, K.L. Miro, A. Rivera-Medina, C. Kasinathan, E. Capitle, H.A. Aguila, S.C. Kachlany // *J Leukoc Biol.* - 2015. - Vol.97, №3. - P. 439-446.
261. Gwozdowicz, S. KIR specificity and avidity of standard and unusual C1, C2, Bw4, Bw6 and A3/11 amino acid motifs at entire HLA:KIR interface between NK and target cells, the functional and evolutionary classification of HLA class I molecules / S. Gwozdowicz, K. Nestorowicz, E. Graczyk-Pol, U. Szlendak, M. Rogatko-Koros, R. Mika-Witkowska, D. Pawliczak, M. Zubala, A. Malinowska, A. Witkowska, J. Nowak // *Int J Immunogenet.* - 2019. - Vol.46, №4. - P. 217-231.
262. György, B. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles / B. György, T. Szabó, M. Pásztói, Z. Pál, P. Misják, B. Aradi, V. László, É. Pállinger, E. Pap, Á. Kittel, G. Nagy, A. Falus, E. Buzás // *Cellular and Molecular Life Sciences.* - 2011. - Vol.68, №16. - P. 2667-2688.
263. Hackmon, R. Definitive class I human leukocyte antigen expression in gestational placentation: HLA-F, HLA-E, HLA-C, and HLA-G in extravillous trophoblast invasion on placentation, pregnancy, and parturition / R. Hackmon, L. Pinnaduwege, J. Zhang, S.J. Lye, D.E. Geraghty, C.E. Dunk // *Am J Reprod Immunol.* - 2017. - Vol.77, №6. - P. e12643.
264. Hadinedoushan, H. Increased natural killer cell cytotoxicity and IL-2 production in recurrent spontaneous abortion / H. Hadinedoushan, M. Mirahmadian, A. Aflatounian // *Am J Reprod Immunol.* - 2007. - Vol.58, №5. - P. 409-414.
265. Hakam, M.S. Preimplantation Factor (PIF) Promotes HLA-G, -E, -F, -C Expression in JEG-3 Choriocarcinoma Cells and Endogenous Progesterone Activity / M.S. Hakam, J.M. Miranda-Sayago, S. Hayrabedian, K. Todorova, P.S. Spencer, A. Jabeen, E.R. Barnea, N. Fernandez // *Cell Physiol Biochem.* - 2017. - Vol.43, №6. - P. 2277-2296.
266. Han, M. sHLA-G involved in the apoptosis of decidual natural killer cells following *Toxoplasma gondii* infection / M. Han, Y. Jiang, K. Lao, X. Xu, S. Zhan, Y. Wang, X. Hu // *Inflammation.* - 2014. - Vol.37, №5. - P. 1718-1727.

267. Hanna, J. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface / J. Hanna, D. Goldman-Wohl, Y. Hamani, I. Avraham, C. Greenfield, S. Natanson-Yaron, D. Prus, L. Cohen-Daniel, T.I. Arnon, I. Manaster, R. Gazit, V. Yutkin, D. Benharroch, A. Porgador, E. Keshet, S. Yagel, O. Mandelboim // *Nat Med.* - 2006. - Vol.12, №9. - P. 1065-1074.
268. Hanna, J. CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16-human natural killer cells / J. Hanna, O. Wald, D. Goldman-Wohl, D. Prus, G. Markel, R. Gazit, G. Katz, R. Haimov-Kochman, N. Fujii, S. Yagel, A. Peled, O. Mandelboim // *Blood.* - 2003. - Vol.102, №5. - P. 1569-1577.
269. Hannan, N.J. The chemokines, CX3CL1, CCL14, and CCL4, promote human trophoblast migration at the feto-maternal interface / N.J. Hannan, R.L. Jones, C.A. White, L.A. Salamonsen // *Biol Reprod.* - 2006. - Vol.74, №5. - P. 896-904.
270. Hannan, N.J. Models for study of human embryo implantation: choice of cell lines? / N.J. Hannan, P. Paiva, E. Dimitriadis, L.A. Salamonsen // *Biol Reprod.* - 2010. - Vol.82, №2. - P. 235-245.
271. Harris, E.S. VE-cadherin: at the front, center, and sides of endothelial cell organization and function / E.S. Harris, W.J. Nelson // *Curr Opin Cell Biol.* - 2010. - Vol.22, №5. - P. 651-658.
272. Harris, L.K. Adhesion molecules in human trophoblast - a review. II. extravillous trophoblast / L.K. Harris, C.J. Jones, J.D. Aplin // *Placenta.* - 2009. - Vol.30, №4. - P. 299-304.
273. Hawke, L.G. TGF-beta and IL-15 Synergize through MAPK Pathways to Drive the Conversion of Human NK Cells to an Innate Lymphoid Cell 1-like Phenotype / L.G. Hawke, B.Z. Mitchell, M.L. Ormiston // *J Immunol.* - 2020. - Vol.204, №12. - P. 3171-3181.
274. Haynes, M.K. Phenotypic analysis of adhesion molecules in first-trimester decidual tissue from chorion villus samples / M.K. Haynes, R.L. Wapner, L.G. Jackson, J.B. Smith // *Am J Reprod Immunol.* - 1997. - Vol.38, №6. - P. 423-430.
275. He, N. Human Extravillous Trophoblasts Penetrate Decidual Veins and Lymphatics before Remodeling Spiral Arteries during Early Pregnancy / N. He, L. van Iperen, D. de Jong, K. Szuhai, F.M. Helmerhorst, L.A. van der Westerlaken, S.M. Chuva de Sousa Lopes // *PLoS One.* - 2017. - Vol.12, №1. - P. e0169849.
276. He, Q. Interleukin 8 (CXCL8)-CXC chemokine receptor 2 (CXCR2) axis contributes to MiR-4437-associated recruitment of granulocytes and natural killer cells in ischemic stroke / Q. He, X. Shi, B. Zhou, J. Teng, C. Zhang, S. Liu, J. Lian, B. Luo, G. Zhao, H. Lu, Y. Xu, Y. Lian, Y. Jia, Y. Zhang // *Mol Immunol.* - 2018. - Vol.101. - P. 440-449.
277. Hedlund, M. Human placenta expresses and secretes NKG2D ligands via exosomes that down-modulate the cognate receptor expression: evidence for immunosuppressive function / M.



- Hedlund, A.C. Stenqvist, O. Nagaeva, L. Kjellberg, M. Wulff, V. Baranov, L. Mincheva-Nilsson // *J Immunol.* - 2009. - Vol.183, №1. - P. 340-351.
278. Heguy, A. Amino acids conserved in interleukin-1 receptors (IL-1Rs) and the *Drosophila* toll protein are essential for IL-1R signal transduction / A. Heguy, C.T. Baldari, G. Macchia, J.L. Telford, M. Melli // *J Biol Chem.* - 1992. - Vol.267, №4. - P. 2605-2609.
279. Herman, J. The role of interleukin 1 (IL 1) in tumor-NK cell interactions: correction of defective NK cell activity in cancer patients by treating target cells with IL 1 / J. Herman, C.A. Dinarello, M.C. Kew, A.R. Rabson // *J Immunol.* - 1985. - Vol.135, №4. - P. 2882-2886.
280. Hiebert, P.R. Granzyme B in injury, inflammation, and repair / P.R. Hiebert, D.J. Granville // *Trends Mol Med.* - 2012. - Vol.18, №12. - P. 732-741.
281. Higuma-Myojo, S. Cytokine profile of natural killer cells in early human pregnancy / S. Higuma-Myojo, Y. Sasaki, S. Miyazaki, M. Sakai, A. Siozaki, N. Miwa, S. Saito // *Am J Reprod Immunol.* - 2005. - Vol.54, №1. - P. 21-29.
282. Hirakawa, M. Low-dose IL-2 selectively activates subsets of CD4(+) Tregs and NK cells / M. Hirakawa, T.R. Matos, H. Liu, J. Koreth, H.T. Kim, N.E. Paul, K. Murase, J. Whangbo, A.C. Alho, S. Nikiforow, C. Cutler, V.T. Ho, P. Armand, E.P. Alyea, J.H. Antin, B.R. Blazar, J.F. Lacerda, R.J. Soiffer, J. Ritz // *JCI Insight.* - 2016. - Vol.1, №18. - P. e89278.
283. Hirooka, Y. Interleukin-18 in Inflammatory Kidney Disease / Y. Hirooka, Y. Nozaki // *Front Med (Lausanne).* - 2021. - Vol.8. - P. 639103.
284. Hofle, J. Engagement of TRAIL triggers degranulation and IFN $\gamma$  production in human natural killer cells / J. Hofle, T. Trenkner, N. Kleist, V. Schwane, S. Vollmers, B. Barcelona, A. Niehrs, P. Fittje, V.H. Huynh-Tran, J. Sauter, A.H. Schmidt, S. Peine, A. Hoelzemer, L. Richert, M. Altfeld, C. Korner // *EMBO Rep.* - 2022. - Vol.23, №8. - P. e54133.
285. Holmes, M.L. Peripheral natural killer cell maturation depends on the transcription factor Aiolos / M.L. Holmes, N.D. Huntington, R.P. Thong, J. Brady, Y. Hayakawa, C.E. Andoniou, P. Fleming, W. Shi, G.K. Smyth, M.A. Degli-Esposti, G.T. Belz, A. Kallies, S. Carotta, M.J. Smyth, S.L. Nutt // *EMBO J.* - 2014. - Vol.33, №22. - P. 2721-2734.
286. Hromatka, B.S. Histopathologies, immunolocalization, and a glycan binding screen provide insights into *Plasmodium falciparum* interactions with the human placenta / B.S. Hromatka, S. Ngeleza, J.J. Adibi, R.K. Niles, A.K. Tshefu, S.J. Fisher // *Biol Reprod.* - 2013. - Vol.88, №6. - P. 154.
287. Hu, J. Inhibition of monocyte adhesion to brain-derived endothelial cells by dual functional RNA chimeras / J. Hu, F. Xiao, X. Hao, S. Bai, J. Hao // *Mol Ther Nucleic Acids.* - 2014. - Vol.3, №11. - P. e209.

288. Hu, Y. Decidual NK cells alter in vitro first trimester extravillous cytotrophoblast migration: a role for IFN-gamma / Y. Hu, J.P. Dutz, C.D. MacCalman, P. Yong, R. Tan, P. von Dadelszen // *J Immunol.* - 2006. - Vol.177, №12. - P. 8522-8530.
289. Huang, R. Research Trends and Regulation of CCL5 in Prostate Cancer / R. Huang, L. Guo, M. Gao, J. Li, S. Xiang // *Onco Targets Ther.* - 2021. - Vol.14. - P. 1417-1427.
290. Huang, Z. Transforming growth factor beta1 promotes invasion of human JEG-3 trophoblast cells via TGF-beta/Smad3 signaling pathway / Z. Huang, S. Li, W. Fan, Q. Ma // *Oncotarget.* - 2017. - Vol.8, №20. - P. 33560-33570.
291. Huber, C.M. IL-12/15/18-preactivated NK cells suppress GvHD in a mouse model of mismatched hematopoietic cell transplantation / C.M. Huber, J.M. Doisne, F. Colucci // *Eur J Immunol.* - 2015. - Vol.45, №6. - P. 1727-1735.
292. Hughes, T. Stage 3 immature human natural killer cells found in secondary lymphoid tissue constitutively and selectively express the TH 17 cytokine interleukin-22 / T. Hughes, B. Becknell, S. McClory, E. Briercheck, A.G. Freud, X. Zhang, H. Mao, G. Nuovo, J. Yu, M.A. Caligiuri // *Blood.* - 2009. - Vol.113, №17. - P. 4008-4010.
293. Huhn, O. Distinctive phenotypes and functions of innate lymphoid cells in human decidua during early pregnancy / O. Huhn, M.A. Ivarsson, L. Gardner, M. Hollinshead, J.C. Stinchcombe, P. Chen, N. Shreeve, O. Chazara, L.E. Farrell, J. Theorell, H. Ghadially, P. Parham, G. Griffiths, A. Horowitz, A. Moffett, A.M. Sharkey, F. Colucci // *Nat Commun.* - 2020. - Vol.11, №1. - P. 381.
294. Huntington, N.D. NK cell maturation and peripheral homeostasis is associated with KLRG1 up-regulation / N.D. Huntington, H. Tabarias, K. Fairfax, J. Brady, Y. Hayakawa, M.A. Degli-Esposti, M.J. Smyth, D.M. Tarlinton, S.L. Nutt // *J Immunol.* - 2007. - Vol.178, №8. - P. 4764-4770.
295. Huppertz, B. The anatomy of the normal placenta / B. Huppertz // *J Clin Pathol.* - 2008. - Vol.61, №12. - P. 1296-1302.
296. Ishitani, A. Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition / A. Ishitani, N. Sageshima, N. Lee, N. Dorofeeva, K. Hatake, H. Marquardt, D.E. Geraghty // *J Immunol.* - 2003. - Vol.171, №3. - P. 1376-1384.
297. Ivagnes, A. TNFR2/BIRC3-TRAF1 signaling pathway as a novel NK cell immune checkpoint in cancer / A. Ivagnes, M. Messaoudene, G. Stoll, B. Routy, A. Fluckiger, T. Yamazaki, K. Iribarren, C.P.M. Duong, L. Fend, A. Caignard, I. Cremer, A. LeCesne, J. Adam, C. Honore, O. Mir, L. Chaigneau, A. Berger, P. Validire, C. Christidis, V.L. Brun-Ly, M.J. Smyth, X. Mariette,

- B.L. Salomon, G. Kroemer, S. Rusakiewicz, L. Zitvogel // *Oncoimmunology*. - 2018. - Vol.7, №12. - P. e1386826.
298. Jacobson, A. Healthy Neonates Possess a CD56-Negative NK Cell Population with Reduced Anti-Viral Activity / A. Jacobson, F. Bell, N. Lejarcegui, C. Mitchell, L. Frenkel, H. Horton // *PLoS One*. - 2013. - Vol.8, №6. - P. e67700.
299. Jaczewska, J. TNF-alpha and IFN-gamma promote lymphocyte adhesion to endothelial junctional regions facilitating transendothelial migration / J. Jaczewska, M.H. Abdulreda, C.Y. Yau, M.M. Schmitt, I. Schubert, P.O. Berggren, C. Weber, R.R. Koenen, V.T. Moy, E.P. Wojcikiewicz // *J Leukoc Biol*. - 2014. - Vol.95, №2. - P. 265-274.
300. James, J.L. From stem cells to spiral arteries: A journey through early placental development / J.L. James, A.L. Boss, C. Sun, H.H. Allerkamp, A.R. Clark // *Placenta*. - 2022. - Vol.125. - P. 68-77.
301. Jelencic, V. NK cell receptor NKG2D sets activation threshold for the NCR1 receptor early in NK cell development / V. Jelencic, M. Sestan, I. Kavazovic, M. Lenartic, S. Marinovic, T.D. Holmes, M. Prchal-Murphy, B. Lisnic, V. Sexl, Y.T. Bryceson, F.M. Wensveen, B. Polic // *Nat Immunol*. - 2018. - Vol.19, №10. - P. 1083-1092.
302. Jena, M.K. Role of Macrophages in Pregnancy and Related Complications / M.K. Jena, N. Nayak, K. Chen, N.R. Nayak // *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. - 2019. - Vol.67, №5. - P. 295-309.
303. Jia, N. Human Uterine Decidual NK Cells in Women with a History of Early Pregnancy Enhance Angiogenesis and Trophoblast Invasion / N. Jia, J. Li // *Biomed Res Int*. - 2020. - Vol.2020. - P. 6247526.
304. Jiang, L. Extracellular Vesicle-Mediated Secretion of HLA-E by Trophoblasts Maintains Pregnancy by Regulating the Metabolism of Decidual NK Cells / L. Jiang, H. Fei, X. Jin, X. Liu, C. Yang, C. Li, J. Chen, A. Yang, J. Zhu, H. Wang, X. Fei, S. Zhang // *Int J Biol Sci*. - 2021. - Vol.17, №15. - P. 4377-4395.
305. Jiang, Y. IL-10(+) NK and TGF-beta(+) NK cells play negative regulatory roles in HIV infection / Y. Jiang, M. Yang, X. Sun, X. Chen, M. Ma, X. Yin, S. Qian, Z. Zhang, Y. Fu, J. Liu, X. Han, J. Xu, H. Shang // *BMC Infect Dis*. - 2018. - Vol.18, №1. - P. 80.
306. Jin, X. Decidualization-derived cAMP promotes decidual NK cells to be angiogenic phenotype / X. Jin, L. Mao, W. Zhao, L. Liu, Y. Li, D. Li, Y. Zhang, M. Du // *Am J Reprod Immunol*. - 2022. - Vol.88, №3. - P. e13540.
307. Jokhi, P.P. Demonstration of the low affinity alpha subunit of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor (GM-CSF-R alpha) on human trophoblast and uterine cells /

- P.P. Jokhi, A. King, P.T. Jubinsky, Y.W. Loke // *J Reprod Immunol.* - 1994. - Vol.26, №2. - P. 147-164.
308. Jovanovic, M. Interleukin-8 (CXCL8) stimulates trophoblast cell migration and invasion by increasing levels of matrix metalloproteinase (MMP)2 and MMP9 and integrins alpha5 and beta1 / M. Jovanovic, I. Stefanoska, L. Radojicic, L. Vicovac // *Reproduction.* - 2010. - Vol.139, №4. - P. 789-798.
309. Kalkunte, S.S. Vascular endothelial growth factor C facilitates immune tolerance and endovascular activity of human uterine NK cells at the maternal-fetal interface / S.S. Kalkunte, T.F. Mselle, W.E. Norris, C.R. Wira, C.L. Sentman, S. Sharma // *J Immunol.* - 2009. - Vol.182, №7. - P. 4085-4092.
310. Kane, N. Proliferation of uterine natural killer cells is induced by human chorionic gonadotropin and mediated via the mannose receptor / N. Kane, R. Kelly, P.T. Saunders, H.O. Critchley // *Endocrinology.* - 2009. - Vol.150, №6. - P. 2882-2888.
311. Kang, X. Inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors: Immune checkpoint proteins and tumor sustaining factors / X. Kang, J. Kim, M. Deng, S. John, H. Chen, G. Wu, H. Phan, C.C. Zhang // *Cell Cycle.* - 2016. - Vol.15, №1. - P. 25-40.
312. Kantakamalakul, W. A novel enhanced green fluorescent protein (EGFP)-K562 flow cytometric method for measuring natural killer (NK) cell cytotoxic activity / W. Kantakamalakul, J. Jaroenpool, K. Pattanapanyasat // *J Immunol Methods.* - 2003. - Vol.272, №1-2. - P. 189-197.
313. Karami, N. Enhancement of peripheral blood CD56(dim) cell and NK cell cytotoxicity in women with recurrent spontaneous abortion or in vitro fertilization failure / N. Karami, M.G. Boroujerdnia, R. Nikbakht, A. Khodadadi // *J Reprod Immunol.* - 2012. - Vol.95, №1-2. - P. 87-92.
314. Kaszubowska, L. Successful ageing of nonagenarians is related to the sensitivity of NK cells to activation / L. Kaszubowska, A. Dettlaff-Pokora, L. Hak, M. Szarynska, M. Ryba, J. Mysliwska, A. Mysliwski // *J Physiol Pharmacol.* - 2008. - Vol.59 Suppl 9. - P. 187-199.
315. Kaufmann, P. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia / P. Kaufmann, S. Black, B. Huppertz // *Biol Reprod.* - 2003. - Vol.69, №1. - P. 1-7.
316. Kaufmann, P. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy / P. Kaufmann, T.M. Mayhew, D.S. Charnock-Jones // *Placenta.* - 2004. - Vol.25, №2-3. - P. 114-126.
317. Keckstein, S. Sex Specific Expression of Interleukin 7, 8 and 15 in Placentas of Women with Gestational Diabetes / S. Keckstein, S. Pritz, N. Amann, S. Meister, S. Beyer, M. Jegen, C.

- Kuhn, S. Hutter, J. Knabl, S. Mahner, T. Kolben, U. Jeschke, T.M. Kolben // *Int J Mol Sci.* - 2020. - Vol.21, №21. - P. 8026.
318. Kenesei, A. IL-15 Trans-Presentation Is an Autonomous, Antigen-Independent Process / A. Kenesei, J. Volko, N. Szaloki, G. Mocsar, K. Jambrovics, Z. Balajthy, A. Bodnar, K. Toth, T.A. Waldmann, G. Vamosi // *J Immunol.* - 2021. - Vol.207, №10. - P. 2489-2500.
319. Kennedy, P.R. Activating KIR2DS4 Is Expressed by Uterine NK Cells and Contributes to Successful Pregnancy / P.R. Kennedy, O. Chazara, L. Gardner, M.A. Ivarsson, L.E. Farrell, S. Xiong, S.E. Hiby, F. Colucci, A.M. Sharkey, A. Moffett // *J Immunol.* - 2016. - Vol.197, №11. - P. 4292-4300.
320. Keskin, D.B. TGFbeta promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16- NK cells with similarities to decidual NK cells / D.B. Keskin, D.S. Allan, B. Rybalov, M.M. Andzelm, J.N. Stern, H.D. Kopcow, L.A. Koopman, J.L. Strominger // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2007. - Vol.104, №9. - P. 3378-3383.
321. Khan, I.A. CCR5 is essential for NK cell trafficking and host survival following *Toxoplasma gondii* infection / I.A. Khan, S.Y. Thomas, M.M. Moretto, F.S. Lee, S.A. Islam, C. Combe, J.D. Schwartzman, A.D. Luster // *PLoS Pathog.* - 2006. - Vol.2, №6. - P. e49.
322. Khaznadar, Z. Defective NK Cells in Acute Myeloid Leukemia Patients at Diagnosis Are Associated with Blast Transcriptional Signatures of Immune Evasion / Z. Khaznadar, N. Boissel, S. Agaague, G. Henry, M. Cheok, M. Vignon, D. Geromin, J.M. Cayuela, S. Castaigne, C. Pautas, E. Raffoux, J. Lachuer, F. Sigaux, C. Preudhomme, H. Dombret, N. Dulphy, A. Toubert // *J Immunol.* - 2015. - Vol.195, №6. - P. 2580-2590.
323. Kiekens, L. T-BET and EOMES Accelerate and Enhance Functional Differentiation of Human Natural Killer Cells / L. Kiekens, W. Van Loocke, S. Taveirne, S. Wahlen, E. Persyn, E. Van Ammel, Z. De Vos, P. Matthys, F. Van Nieuwerburgh, T. Taghon, P. Van Vlierberghe, B. Vandekerckhove, G. Leclercq // *Front Immunol.* - 2021. - Vol.12. - P. 732511.
324. King, A. HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells / A. King, D.S. Allan, M. Bowen, S.J. Powis, S. Joseph, S. Verma, S.E. Hiby, A.J. McMichael, Y.W. Loke, V.M. Braud // *Eur J Immunol.* - 2000. - Vol.30, №6. - P. 1623-1631.
325. Kiniwa, T. NK cells activated by Interleukin-4 in cooperation with Interleukin-15 exhibit distinctive characteristics / T. Kiniwa, Y. Enomoto, N. Terazawa, A. Omi, N. Miyata, K. Ishiwata, A. Miyajima // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2016. - Vol.113, №36. - P. 10139-10144.
326. Kniotek, M. Differences in the Expression of KIR, ILT Inhibitory Receptors, and VEGF Production in the Induced Decidual NK Cell Cultures of Fertile and RPL Women / M. Kniotek,

- A. Roszczyk, M. Zych, M. Szafarowska, M. Jerzak // *Biomed Res Int.* - 2021. - Vol.2021. - P. 6673427.
327. Knofler, M. Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems / M. Knofler, S. Haider, L. Saleh, J. Pollheimer, T. Gamage, J. James // *Cell Mol Life Sci.* - 2019. - Vol.76, №18. - P. 3479-3496.
328. Kobyzeva, P.A. CD56(dim) CD57(-) NKG2C(+) NK cells retaining proliferative potential are possible precursors of CD57(+) NKG2C(+) memory-like NK cells / P.A. Kobyzeva, M.A. Streltsova, S.A. Erokhina, L.M. Kanevskiy, W.G. Telford, A.M. Sapozhnikov, E.I. Kovalenko // *J Leukoc Biol.* - 2020. - Vol.108, №4. - P. 1379-1395.
329. Koga, K. Expression and function of toll-like receptors at the maternal-fetal interface / K. Koga, G. Mor // *Reprod Sci.* - 2008. - Vol.15, №3. - P. 231-242.
330. Kohler, P.O. Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma / P.O. Kohler, W.E. Bridson // *J Clin Endocrinol Metab.* - 1971. - Vol.32, №5. - P. 683-687.
331. Kolanska, K. Proportion of Cytotoxic Peripheral Blood Natural Killer Cells and T-Cell Large Granular Lymphocytes in Recurrent Miscarriage and Repeated Implantation Failure: Case-Control Study and Meta-analysis / K. Kolanska, L. Suner, J. Cohen, Y. Ben Kraiem, L. Placais, O. Fain, M. Bornes, L. Selleret, F. Delhommeau, F. Feger, E. Mathieu d'Argent, E. Darai, N. Chabbert-Buffet, J.M. Antoine, G. Kayem, A. Mekinian // *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* - 2019. - Vol.67, №4. - P. 225-236.
332. Komatsu, F. Relation of natural killer cell line NK-92-mediated cytotoxicity (NK-92-lysis) with the surface markers of major histocompatibility complex class I antigens, adhesion molecules, and Fas of target cells / F. Komatsu, M. Kajiwara // *Oncol Res.* - 1998. - Vol.10, №10. - P. 483-489.
333. Komatsu, F. Characteristics of human T-lymphotropic virus type-1 (HTLV-1)-infected cell line MT-2, which is not killed by a natural killer cell line NK-92 but is killed by lymphokine-activated killer cells / F. Komatsu, S. Yoshida // *Oncol Res.* - 1999. - Vol.11, №5. - P. 213-218.
334. Kong, Y.F. CXCL10/CXCR3 Signaling in the DRG Exacerbates Neuropathic Pain in Mice / Y.F. Kong, W.L. Sha, X.B. Wu, L.X. Zhao, L.J. Ma, Y.J. Gao // *Neurosci Bull.* - 2021. - Vol.37, №3. - P. 339-352.
335. Konjevic, G. Novel aspects of in vitro IL-2 or IFN-alpha enhanced NK cytotoxicity of healthy individuals based on NKG2D and CD161 NK cell receptor induction / G. Konjevic, K. Mirjagic Martinovic, A. Vuletic, S. Radenkovic // *Biomed Pharmacother.* - 2010. - Vol.64, №10. - P. 663-671.

336. Konjevic, G.M. The role of cytokines in the regulation of NK cells in the tumor environment / G.M. Konjevic, A.M. Vuletic, K.M. Mirjagic Martinovic, A.K. Larsen, V.B. Jurisic // *Cytokine*. - 2019. - Vol.117. - P. 30-40.
337. Kopcow, H.D. Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic / H.D. Kopcow, D.S. Allan, X. Chen, B. Rybalov, M.M. Andzelm, B. Ge, J.L. Strominger // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2005. - Vol.102, №43. - P. 15563-15568.
338. Korenevskii, A.V. Mass-Spectrometric Analysis of Proteome of Microvesicles Produced by NK-92 Natural Killer Cells / A.V. Korenevskii, Y.P. Milyutina, A.A. Zhdanova, K.M. Pyatygina, D.I. Sokolov, S.A. Sel'kov // *Bull Exp Biol Med*. - 2018. - Vol.165, №4. - P. 564-571.
339. Korenevsky, A.V. MALDI-TOF mass spectrometric protein profiling of microvesicles produced by the NK-92 natural killer cell line / A.V. Korenevsky, A.D. Shcherbitskaia, M.E. Berezkina, K.L. Markova, E.P. Alexandrova, O.A. Balabas, S.A. Selkov, D.I. Sokolov // *Medical Immunology (Russia)*. - 2020. - Vol.22, №4. - P. 633-646.
340. Kovalenko, E.I. Adaptive features of natural killer cells, lymphocytes of innate immunity / E.I. Kovalenko, M.A. Streltsova // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. - 2017. - Vol.42, №6. - P. 590-605.
341. Kovalenko, E.I. Identification of Human Memory-Like NK Cells / E.I. Kovalenko, M.A. Streltsova, L.M. Kanevskiy, S.A. Erokhina, W.G. Telford // *Curr Protoc Cytom*. - 2017. - Vol.79. - P. 9 50 51-59 50 11.
342. Kowal, J. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes / J. Kowal, G. Arras, M. Colombo, M. Jouve, J.P. Morath, B. Primdal-Bengtson, F. Dingli, D. Loew, M. Tkach, C. Thery // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2016. - Vol.113, №8. - P. E968-977.
343. Krop, J. Imaging mass cytometry reveals the prominent role of myeloid cells at the maternal-fetal interface / J. Krop, A. van der Zwan, M.E. Ijsselsteijn, H. Kapsenberg, S.J. Luk, S.H. Hendriks, C. van der Keur, L.J. Verleng, A. Somarakis, L. van der Meeren, G. Haasnoot, M. Bos, N. de Miranda, S.M. Chuva de Sousa Lopes, M.P. van der Hoorn, F. Koning, F.H.J. Claas, S. Heidt, M. Eikmans // *iScience*. - 2022. - Vol.25, №7. - P. 104648.
344. Kruse, P.H. Natural cytotoxicity receptors and their ligands / P.H. Kruse, J. Matta, S. Ugolini, E. Vivier // *Immunol Cell Biol*. - 2014. - Vol.92, №3. - P. 221-229.
345. Krzewski, K. The killer's kiss: the many functions of NK cell immunological synapses / K. Krzewski, J.L. Strominger // *Curr Opin Cell Biol*. - 2008. - Vol.20, №5. - P. 597-605.
346. Kumar, S. Natural killer cell cytotoxicity and its regulation by inhibitory receptors / S. Kumar // *Immunology*. - 2018. - Vol.154, №3. - P. 383-393.

347. Kuperman, T. Tissue-engineered multi-cellular models of the uterine wall / T. Kuperman, M. Gavriel, R. Gotlib, Y. Zhang, A. Jaffa, D. Elad, D. Grisaru // *Biomech Model Mechanobiol.* - 2020. - Vol.19, №5. - P. 1629-1639.
348. Kusumi, M. Expression patterns of lectin-like natural killer receptors, inhibitory CD94/NKG2A, and activating CD94/NKG2C on decidual CD56bright natural killer cells differ from those on peripheral CD56dim natural killer cells / M. Kusumi, T. Yamashita, T. Fujii, T. Nagamatsu, S. Kozuma, Y. Taketani // *J Reprod Immunol.* - 2006. - Vol.70, №1-2. - P. 33-42.
349. Kwak-Kim, J. Immunological modes of pregnancy loss: inflammation, immune effectors, and stress / J. Kwak-Kim, S. Bao, S.K. Lee, J.W. Kim, A. Gilman-Sachs // *Am J Reprod Immunol.* - 2014. - Vol.72, №2. - P. 129-140.
350. Kwak-Kim, J. Current trends of reproductive immunology practices in in vitro fertilization (IVF) - a first world survey using IVF-Worldwide.com / J. Kwak-Kim, A.R. Han, A. Gilman-Sachs, S. Fishel, M. Leong, Z. Shoham // *Am J Reprod Immunol.* - 2013. - Vol.69, №1. - P. 12-20.
351. Lamas, B. Altered functions of natural killer cells in response to L-Arginine availability / B. Lamas, J. Vergnaud-Gauduchon, N. Goncalves-Mendes, O. Perche, A. Rossary, M.P. Vasson, M.C. Farges // *Cell Immunol.* - 2012. - Vol.280, №2. - P. 182-190.
352. Lan, R. Fas regulates the apoptosis and migration of trophoblast cells by targeting NF-kappaB / R. Lan, Y. Yang, J. Song, L. Wang, H. Gong // *Exp Ther Med.* - 2021. - Vol.22, №4. - P. 1055.
353. Lanier, L.L. NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense / L.L. Lanier // *Cancer Immunol Res.* - 2015. - Vol.3, №6. - P. 575-582.
354. Lash, G.E. Inhibition of trophoblast cell invasion by TGFB1, 2, and 3 is associated with a decrease in active proteases / G.E. Lash, H.A. Otun, B.A. Innes, J.N. Bulmer, R.F. Searle, S.C. Robson // *Biol Reprod.* - 2005. - Vol.73, №2. - P. 374-381.
355. Lash, G.E. Interferon-gamma inhibits extravillous trophoblast cell invasion by a mechanism that involves both changes in apoptosis and protease levels / G.E. Lash, H.A. Otun, B.A. Innes, M. Kirkley, L. De Oliveira, R.F. Searle, S.C. Robson, J.N. Bulmer // *FASEB J.* - 2006. - Vol.20, №14. - P. 2512-2518.
356. Lash, G.E. Decidual macrophages: key regulators of vascular remodeling in human pregnancy / G.E. Lash, H. Pitman, H.L. Morgan, B.A. Innes, C.N. Agwu, J.N. Bulmer // *J Leukoc Biol.* - 2016. - Vol.100, №2. - P. 315-325.
357. Lash, G.E. Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy / G.E. Lash, B. Schiessl, M. Kirkley, B.A. Innes, A. Cooper, R.F. Searle, S.C. Robson, J.N. Bulmer // *J Leukoc Biol.* - 2006. - Vol.80, №3. - P. 572-580.



358. Lash, G.E. Vascular endothelial growth factor and placental growth factor release in cultured trophoblast cells under different oxygen tensions / G.E. Lash, C.M. Taylor, A.J. Trew, S. Cooper, F.W. Anthony, T. Wheeler, P.N. Baker // *Growth Factors*. - 2002. - Vol.20, №4. - P. 189-196.
359. Lash, G.E. Vascular endothelial growth factor is a chemoattractant for trophoblast cells / G.E. Lash, A.Y. Warren, S. Underwood, P.N. Baker // *Placenta*. - 2003. - Vol.24, №5. - P. 549-556.
360. Lastovicka, J. Assessment of lymphocyte proliferation for diagnostic purpose: Comparison of CFSE staining, Ki-67 expression and (3)H-thymidine incorporation / J. Lastovicka, M. Rataj, J. Bartunkova // *Hum Immunol*. - 2016. - Vol.77, №12. - P. 1215-1222.
361. Lavergne, M. Oxidative and Non-Oxidative Antimicrobial Activities of the Granzymes / M. Lavergne, M.A. Hernandez-Castaneda, P.Y. Mantel, D. Martinvalet, M. Walch // *Front Immunol*. - 2021. - Vol.12. - P. 750512.
362. Lawson, C. ICAM-1 signaling in endothelial cells / C. Lawson, S. Wolf // *Pharmacol Rep*. - 2009. - Vol.61, №1. - P. 22-32.
363. Le Bouteiller, P. Human decidual NK cells: unique and tightly regulated effector functions in healthy and pathogen-infected pregnancies / P. Le Bouteiller // *Front Immunol*. - 2013. - Vol.4. - P. 404.
364. Ledee, N. Downregulation of human endometrial IL-18 by exogenous ovarian steroids / N. Ledee, S. Dubanchet, R. Lombroso, Y. Ville, G. Chaouat // *Am J Reprod Immunol*. - 2006. - Vol.56, №2. - P. 119-123.
365. Lee, B.J. Acquisition of cell migration defines NK cell differentiation from hematopoietic stem cell precursors / B.J. Lee, E.M. Mace // *Mol Biol Cell*. - 2017. - Vol.28, №25. - P. 3573-3581.
366. Lee, C.L. Glycodelin-A stimulates the conversion of human peripheral blood CD16-CD56bright NK cell to a decidual NK cell-like phenotype / C.L. Lee, M. Vijayan, X. Wang, K.K.W. Lam, H. Koistinen, M. Seppala, R.H.W. Li, E.H.Y. Ng, W.S.B. Yeung, P.C.N. Chiu // *Hum Reprod*. - 2019. - Vol.34, №4. - P. 689-701.
367. Lee, H.M. A comparative study of the effects of inhibitory cytokines on human natural killer cells and the mechanistic features of transforming growth factor-beta / H.M. Lee, K.S. Kim, J. Kim // *Cell Immunol*. - 2014. - Vol.290, №1. - P. 52-61.
368. Lee, J. Fas Ligand localizes to intraluminal vesicles within NK cell cytolytic granules and is enriched at the immune synapse / J. Lee, N.M.G. Dieckmann, J.R. Edgar, G.M. Griffiths, R.M. Siegel // *Immun Inflamm Dis*. - 2018. - Vol.6, №2. - P. 312-321.
369. Lee, M.M. CCR1-mediated STAT3 tyrosine phosphorylation and CXCL8 expression in THP-1 macrophage-like cells involve pertussis toxin-insensitive Galpha(14/16) signaling and IL-6

- release / M.M. Lee, R.K. Chui, I.Y. Tam, A.H. Lau, Y.H. Wong // *J Immunol.* - 2012. - Vol.189, №11. - P. 5266-5276.
370. Lee, S.K. Immune cells in the female reproductive tract / S.K. Lee, C.J. Kim, D.J. Kim, J.H. Kang // *Immune Netw.* - 2015. - Vol.15, №1. - P. 16-26.
371. Lee, T.H. Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer--the emerging science of cellular 'debris' / T.H. Lee, E. D'Asti, N. Magnus, K. Al-Nedawi, B. Meehan, J. Rak // *Semin Immunopathol.* - 2011. - Vol.33, №5. - P. 455-467.
372. Leijonhufvud, C. LIR-1 educates expanded human NK cells and defines a unique antitumor NK cell subset with potent antibody-dependent cellular cytotoxicity / C. Leijonhufvud, R. Reger, F. Segerberg, J. Theorell, H. Schlums, Y.T. Bryceson, R.W. Childs, M. Carlsten // *Clin Transl Immunology.* - 2021. - Vol.10, №10. - P. e1346.
373. Leong, J.W. Preactivation with IL-12, IL-15, and IL-18 induces CD25 and a functional high-affinity IL-2 receptor on human cytokine-induced memory-like natural killer cells / J.W. Leong, J.M. Chase, R. Romee, S.E. Schneider, R.P. Sullivan, M.A. Cooper, T.A. Fehniger // *Biol Blood Marrow Transplant.* - 2014. - Vol.20, №4. - P. 463-473.
374. Li, C. HLA-G homodimer-induced cytokine secretion through HLA-G receptors on human decidual macrophages and natural killer cells / C. Li, B.L. Houser, M.L. Nicotra, J.L. Strominger // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2009. - Vol.106, №14. - P. 5767-5772.
375. Li, H. CD49a regulates the function of human decidual natural killer cells / H. Li, Y. Hou, S. Zhang, Y. Zhou, D. Wang, S. Tao, F. Ni // *Am J Reprod Immunol.* - 2019. - Vol.81, №4. - P. e13101.
376. Li, J. Upregulation of IL-15 in the placenta alters trophoblasts behavior contributing to gestational diabetes mellitus / J. Li, Y. Li, X. Zhou, L. Wei, J. Zhang, S. Zhu, H. Zhang, X. Gao, L.M. Sharifu, S. Wang, L. Xi, L. Feng // *Cell Biosci.* - 2021. - Vol.11, №1. - P. 33.
377. Li, M. Tim-3/CTLA-4 pathways regulate decidual immune cells-extravillous trophoblasts interaction by IL-4 and IL-10 / M. Li, F. Sun, J. Qian, L. Chen, D. Li, S. Wang, M. Du // *FASEB J.* - 2021. - Vol.35, №8. - P. e21754.
378. Li, P. Progress in Exosome Isolation Techniques / P. Li, M. Kaslan, S.H. Lee, J. Yao, Z. Gao // *Theranostics.* - 2017. - Vol.7, №3. - P. 789-804.
379. Li, Q. Multiple effects of IL-21 on human NK cells in ex vivo expansion / Q. Li, L.J. Ye, H.L. Ren, T. Huyan, J. Li, J.L. Shi, Q.S. Huang // *Immunobiology.* - 2015. - Vol.220, №7. - P. 876-888.
380. Li, T. The Role of Tim-3 on dNK Cells Dysfunction During Abnormal Pregnancy With *Toxoplasma gondii* Infection / T. Li, L. Cui, X. Xu, H. Zhang, Y. Jiang, L. Ren, C. Yang, X. Liu, X. Hu // *Front Cell Infect Microbiol.* - 2021. - Vol.11. - P. 587150.

381. Li, W. Tumor necrosis factor stimulates matrix metalloproteinase 9 secretion from cultured human chorionic trophoblast cells through TNF receptor 1 signaling to IKBKB-NFKB and MAPK1/3 pathway / W. Li, H. Li, A.D. Bocking, J.R. Challis // *Biol Reprod.* - 2010. - Vol.83, №3. - P. 481-487.
382. Li, Y. Roles of TGF-beta Superfamily Proteins in Extravillous Trophoblast Invasion / Y. Li, J. Yan, H.M. Chang, Z.J. Chen, P.C.K. Leung // *Trends Endocrinol Metab.* - 2021. - Vol.32, №3. - P. 170-189.
383. Li, Z.Y. IFN-gamma modulates Ly-49 receptors on NK cells in IFN-gamma-induced pregnancy failure / Z.Y. Li, Z.H. Song, C.Y. Meng, D.D. Yang, Y. Yang, J.P. Peng // *Sci Rep.* - 2015. - Vol.5. - P. 18159.
384. Liao, W. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation / W. Liao, J.X. Lin, W.J. Leonard // *Curr Opin Immunol.* - 2011. - Vol.23, №5. - P. 598-604.
385. Librach, C.L. Interleukin-1 beta regulates human cytotrophoblast metalloproteinase activity and invasion in vitro / C.L. Librach, S.L. Feigenbaum, K.E. Bass, T.Y. Cui, N. Verastas, Y. Sadovsky, J.P. Quigley, D.L. French, S.J. Fisher // *J Biol Chem.* - 1994. - Vol.269, №25. - P. 17125-17131.
386. Lin, F. The Maternal-Fetal Interface in Small-for-Gestational-Age Pregnancies Is Associated With a Reduced Quantity of Human Decidual NK Cells With Weaker Functional Ability / F. Lin, C. Yang, T. Feng, S. Yang, R. Zhou, H. Li // *Front Cell Dev Biol.* - 2020. - Vol.8. - P. 633.
387. Lin, M.T. IL-6 inhibits apoptosis and retains oxidative DNA lesions in human gastric cancer AGS cells through up-regulation of anti-apoptotic gene mcl-1 / M.T. Lin, C.Y. Juan, K.J. Chang, W.J. Chen, M.L. Kuo // *Carcinogenesis.* - 2001. - Vol.22, №12. - P. 1947-1953.
388. Liu, H. Systemic Characterization of Novel Immune Cell Phenotypes in Recurrent Pregnancy Loss / H. Liu, X.X. Lin, X.B. Huang, D.H. Huang, S. Song, Y.J. Chen, J. Tang, D. Tao, Z.N. Yin, G. Mor, A.H. Liao // *Front Immunol.* - 2021. - Vol.12. - P. 657552.
389. Liu, H. Dihydroartemisinin attenuates autoimmune thyroiditis by inhibiting the CXCR3/PI3K/AKT/NF-kappaB signaling pathway / H. Liu, Q. Tian, X. Ai, Y. Qin, Z. Cui, M. Li, J. Yang, D. Zhai, Y. Liu, S. Chen, J. Meng, T. Sun, H. Zhou, C. Yang // *Oncotarget.* - 2017. - Vol.8, №70. - P. 115028-115040.
390. Liu, J. The expression of intracellular cytokines of decidual natural killer cells in unexplained recurrent pregnancy loss / J. Liu, P. Dong, N. Jia, X. Wen, L. Luo, S. Wang, J. Li // *J Matern Fetal Neonatal Med.* - 2022. - Vol.35, №16. - P. 3209-3215.
391. Liu, M. High-efficient generation of natural killer cells from peripheral blood with preferable cell vitality and enhanced cytotoxicity by combination of IL-2, IL-15 and IL-18 / M. Liu, Y.

- Meng, L. Zhang, Z. Han, X. Feng // *Biochem Biophys Res Commun.* - 2021. - Vol.534. - P. 149-156.
392. Liu, M. Flow cytometric analysis of circulating microvesicles derived from myocardial Ischemic preconditioning and cardioprotection of Ischemia/reperfusion Injury in rats / M. Liu, Y.L. Wang, M. Shang, Y. Wang, Q. Zhang, S.X. Wang, S. Wei, K. Zhang, C. Liu, Y.N. Wu, M.L. Liu, J.Q. Song, Y.X. Liu // *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi.* - 2015. - Vol.31, №6. - P. 524-531.
393. Liu, S. The role of decidual immune cells on human pregnancy / S. Liu, L. Diao, C. Huang, Y. Li, Y. Zeng, J.Y.H. Kwak-Kim // *J Reprod Immunol.* - 2017. - Vol.124. - P. 44-53.
394. Liu, S. Recruitment of Grb2 and SHIP1 by the ITT-like motif of TIGIT suppresses granule polarization and cytotoxicity of NK cells / S. Liu, H. Zhang, M. Li, D. Hu, C. Li, B. Ge, B. Jin, Z. Fan // *Cell Death Differ.* - 2013. - Vol.20, №3. - P. 456-464.
395. Liu, Y. Decidual Natural Killer Cells: A Good Nanny at the Maternal-Fetal Interface During Early Pregnancy / Y. Liu, S. Gao, Y. Zhao, H. Wang, Q. Pan, Q. Shao // *Front Immunol.* - 2021. - Vol.12. - P. 663660.
396. Liu, Y. Changes of inhibitory receptors on NK-92 cells and HLA-G on BeWo cells with *Toxoplasma gondii* infection / Y. Liu, L. Zhang, M. Gao, F. Zhang, X. Xu, X. Liu, X. Hu // *Inflammation.* - 2013. - Vol.36, №6. - P. 1440-1447.
397. Lockwood, C.J. Interferon-gamma protects first-trimester decidual cells against aberrant matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 expression in preeclampsia / C.J. Lockwood, M. Basar, U.A. Kayisli, O. Guzeloglu-Kayisli, W. Murk, J. Wang, N. De Paz, J.P. Shapiro, R.J. Masch, N. Semerci, S.J. Huang, F. Schatz // *Am J Pathol.* - 2014. - Vol.184, №9. - P. 2549-2559.
398. Lockwood, C.J. Decidual cell regulation of natural killer cell-recruiting chemokines: implications for the pathogenesis and prediction of preeclampsia / C.J. Lockwood, S.J. Huang, C.P. Chen, Y. Huang, J. Xu, S. Faramarzi, O. Kayisli, U. Kayisli, L. Koopman, D. Smedts, L.F. Buchwalder, F. Schatz // *Am J Pathol.* - 2013. - Vol.183, №3. - P. 841-856.
399. Loetscher, P. Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca<sup>2+</sup> mobilization, and enzyme release / P. Loetscher, M. Seitz, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini, B. Moser // *J Immunol.* - 1996. - Vol.156, №1. - P. 322-327.
400. Lohoff, M. Deficiency in the transcription factor interferon regulatory factor (IRF)-2 leads to severely compromised development of natural killer and T helper type 1 cells / M. Lohoff, G.S. Duncan, D. Ferrick, H.W. Mittrucker, S. Bischof, S. Prechtel, M. Rollinghoff, E. Schmitt, A. Pahl, T.W. Mak // *J Exp Med.* - 2000. - Vol.192, №3. - P. 325-336.

401. Lopez-Botet, M. Paired inhibitory and triggering NK cell receptors for HLA class I molecules / M. Lopez-Botet, T. Bellon, M. Llano, F. Navarro, P. Garcia, M. de Miguel // *Hum Immunol.* - 2000. - Vol.61, №1. - P. 7-17.
402. Lopez-Botet, M. NK cell recognition of non-classical HLA class I molecules / M. Lopez-Botet, M. Llano, F. Navarro, T. Bellon // *Semin Immunol.* - 2000. - Vol.12, №2. - P. 109-119.
403. Lopez-Verges, S. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset / S. Lopez-Verges, J.M. Milush, S. Pandey, V.A. York, J. Arakawa-Hoyt, H. Pircher, P.J. Norris, D.F. Nixon, L.L. Lanier // *Blood.* - 2010. - Vol.116, №19. - P. 3865-3874.
404. Lopez, J.A. Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack / J.A. Lopez, O. Susanto, M.R. Jenkins, N. Lukoyanova, V.R. Sutton, R.H. Law, A. Johnston, C.H. Bird, P.I. Bird, J.C. Whisstock, J.A. Trapani, H.R. Saibil, I. Voskoboinik // *Blood.* - 2013. - Vol.121, №14. - P. 2659-2668.
405. Lu, H. Trophoblast-derived CXCL12 promotes CD56(bright) CD82(-) CD29(+) NK cell enrichment in the decidua / H. Lu, L.P. Jin, H.L. Huang, S.Y. Ha, H.L. Yang, R.Q. Chang, D.J. Li, M.Q. Li // *Am J Reprod Immunol.* - 2020. - Vol.83, №2. - P. 1-32.
406. Lu, J. Expression and Functional Analysis of CXCL12 and Its Receptors in Human Term Trophoblast Cells / J. Lu, Z. Wang, L. Ren, Y. Sun, Y. Cao, Y. Xiong, Y. Zhang // *Reprod Sci.* - 2020. - Vol.27, №1. - P. 46-54.
407. Luo, S. Transforming growth factor-beta1 inhibits steroidogenesis in human trophoblast cells / S. Luo, H. Yu, D. Wu, C. Peng // *Mol Hum Reprod.* - 2002. - Vol.8, №4. - P. 318-325.
408. Lusty, E. IL-18/IL-15/IL-12 synergy induces elevated and prolonged IFN-gamma production by ex vivo expanded NK cells which is not due to enhanced STAT4 activation / E. Lusty, S.M. Poznanski, K. Kwofie, T.S. Mandur, D.A. Lee, C.D. Richards, A.A. Ashkar // *Mol Immunol.* - 2017. - Vol.88. - P. 138-147.
409. Luu, T. Natural killer cell-mediated immunopathology in recurrent pregnancy losses / T. Luu, L. AlSubki, K. Wolf, A. Thees, U. Ganieva, S. Dambaeva, K. Beaman, J. Kwak-Kim // *Exploration of Immunology.* - 2022. - Vol.2, №5. - P. 693-722.
410. Lvova, T.Y. Effects of placental tissue secretory products on the formation of vascular tubules by EA.Hy926 endothelial cells / T.Y. Lvova, O.I. Stepanova, K.N. Furaeva, D.A. Korenkov, D.I. Sokolov, S.A. Selkov // *Bull Exp Biol Med.* - 2013. - Vol.155, №1. - P. 108-112.
411. Lysakova-Devine, T. Tissue-specific NK cell populations and their origin / T. Lysakova-Devine, C. O'Farrelly // *J Leukoc Biol.* - 2014. - Vol.96, №6. - P. 981-990.

412. Ma, C. Activin A regulates activities of peripheral blood natural killer cells of mouse in an autocrine and paracrine manner / C. Ma, Z. Liu, S. Shang, L. Jiang, X. Lv, Y. Qi, X. Cui, J. Ge // *Exp Cell Res.* - 2019. - Vol.374, №1. - P. 114-121.
413. Ma, L. dNK cells facilitate the interaction between trophoblastic and endothelial cells via VEGF-C and HGF / L. Ma, G. Li, G. Cao, Y. Zhu, M.R. Du, Y. Zhao, H. Wang, Y. Liu, Y. Yang, Y.X. Li, D.J. Li, H. Yang, Y.L. Wang // *Immunol Cell Biol.* - 2017. - Vol.95, №8. - P. 695-704.
414. Ma, S. Harnessing IL-15 signaling to potentiate NK cell-mediated cancer immunotherapy / S. Ma, M.A. Caligiuri, J. Yu // *Trends Immunol.* - 2022. - Vol.43, №10. - P. 833-847.
415. Mace, E.M. Cell biological steps and checkpoints in accessing NK cell cytotoxicity / E.M. Mace, P. Dongre, H.T. Hsu, P. Sinha, A.M. James, S.S. Mann, L.R. Forbes, L.B. Watkin, J.S. Orange // *Immunol Cell Biol.* - 2014. - Vol.92, №3. - P. 245-255.
416. Maghazachi, A.A. Role of chemokines in the biology of natural killer cells / A.A. Maghazachi // *Curr Top Microbiol Immunol.* - 2010. - Vol.341. - P. 37-58.
417. Maghazachi, A.A. CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56+ cells / A.A. Maghazachi, A. Al-Aoukaty, T.J. Schall // *Eur J Immunol.* - 1996. - Vol.26, №2. - P. 315-319.
418. Mahajan, D. Role of Natural Killer Cells during Pregnancy and Related Complications / D. Mahajan, N.R. Sharma, S. Kancharla, P. Kolli, A. Tripathy, A.K. Sharma, S. Singh, S. Kumar, A.K. Mohanty, M.K. Jena // *Biomolecules.* - 2022. - Vol.12, №1. - P. 1-18.
419. Mai, C. NK cells that differ in expression of NKp46 might play different roles in endometrium / C. Mai, A. Fukui, R. Takeyama, M. Yamamoto, S. Saeki, A. Yamaya, T. Kato, Y. Ukita, Y. Wakimoto, H. Shibahara // *J Reprod Immunol.* - 2021. - Vol.147. - P. 103367.
420. Makowska, A. Interferon beta increases NK cell cytotoxicity against tumor cells in patients with nasopharyngeal carcinoma via tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand / A. Makowska, S. Franzen, T. Braunschweig, B. Denecke, L. Shen, V. Baloch, P. Busson, U. Kontny // *Cancer Immunol Immunother.* - 2019. - Vol.68, №8. - P. 1317-1329.
421. Maldonado-Estrada, J. Predominant intracellular expression of CXCR4 and CCR5 in purified primary trophoblast cells from first trimester and term human placentae / J. Maldonado-Estrada, E. Menu, P. Roques, B. Vaslin, A. Dautry-Varsat, F. Barre-Sinoussi, G. Chaouat // *Am J Reprod Immunol.* - 2003. - Vol.50, №4. - P. 291-301.
422. Male, V. Immature NK cells, capable of producing IL-22, are present in human uterine mucosa / V. Male, T. Hughes, S. McClory, F. Colucci, M.A. Caligiuri, A. Moffett // *J Immunol.* - 2010. - Vol.185, №7. - P. 3913-3918.

423. Male, V. The effect of pregnancy on the uterine NK cell KIR repertoire / V. Male, A. Sharkey, L. Masters, P.R. Kennedy, L.E. Farrell, A. Moffett // *Eur J Immunol.* - 2011. - Vol.41, №10. - P. 3017-3027.
424. Male, V. Natural killer cells in human pregnancy / V. Male, A. Trundle, L. Gardner, J. Northfield, C. Chang, R. Apps, A. Moffett // *Methods Mol Biol.* - 2010. - Vol.612. - P. 447-463.
425. Manabe, A. Interleukin-4 induces programmed cell death (apoptosis) in cases of high-risk acute lymphoblastic leukemia / A. Manabe, E. Coustan-Smith, M. Kumagai, F.G. Behm, S.C. Raimondi, C.H. Pui, D. Campana // *Blood.* - 1994. - Vol.83, №7. - P. 1731-1737.
426. Manaster, I. Endometrial NK cells are special immature cells that await pregnancy / I. Manaster, S. Mizrahi, D. Goldman-Wohl, H.Y. Sela, N. Stern-Ginossar, D. Lankry, R. Gruda, A. Hurwitz, Y. Bdolah, R. Haimov-Kochman, S. Yagel, O. Mandelboim // *J Immunol.* - 2008. - Vol.181, №3. - P. 1869-1876.
427. Manes, T.D. Identification of endothelial cell junctional proteins and lymphocyte receptors involved in transendothelial migration of human effector memory CD4<sup>+</sup> T cells / T.D. Manes, J.S. Pober // *J Immunol.* - 2011. - Vol.186, №3. - P. 1763-1768.
428. Mangan, M.S. A Novel Serpin Regulatory Mechanism: SerpinB9 is reversibly inhibited by vicinal disulfide bond formation in the reactive center loop / M.S. Mangan, C.H. Bird, D. Kaiserman, A.Y. Matthews, C. Hitchen, D.L. Steer, P.E. Thompson, P.I. Bird // *J Biol Chem.* - 2016. - Vol.291, №7. - P. 3626-3638.
429. Mangan, M.S. A pro-survival role for the intracellular granzyme B inhibitor Serpinb9 in natural killer cells during poxvirus infection / M.S. Mangan, C.R. Melo-Silva, J. Luu, C.H. Bird, A. Koskinen, A. Rizzitelli, M. Prakash, K.L. Scarff, A. Mullbacher, M. Regner, P.I. Bird // *Immunol Cell Biol.* - 2017. - Vol.95, №10. - P. 884-894.
430. Mardanian, F. Evaluation of CD56(dim) and CD56(bright) natural killer cells in peripheral blood of women with IVF failures / F. Mardanian, M. Kazeroonizadeh, B. Rashidi // *Iran J Reprod Med.* - 2015. - Vol.13, №9. - P. 577-582.
431. Marino, V.J. The granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) activates Jak/STAT and MAPK pathways in a trophoblastic cell line / V.J. Marino, L.P. Roguin // *J Cell Biochem.* - 2008. - Vol.103, №5. - P. 1512-1523.
432. Mariuzza, R.A. The structural basis of T-cell receptor (TCR) activation: An enduring enigma / R.A. Mariuzza, P. Agnihotri, J. Orban // *J Biol Chem.* - 2020. - Vol.295, №4. - P. 914-925.
433. Markova, K.L. Microvesicles produced by natural killer cells of the NK-92 cell line affect the phenotype and functions of endothelial cells of the EA.Hy926 cell line / K.L. Markova, V.A. Mikhailova, A.V. Korenevsky, Y.P. Milyutina, V.V. Rodygina, E.P. Aleksandrova, A.S.

- Markov, O.A. Balabas, S.A. Selkov, D.I. Sokolov // *Medical Immunology (Russia)*. - 2020. - Vol.22, №2. - P. 249-268.
434. Marlin, R. Dynamic shift from CD85j/ILT-2 to NKG2D NK receptor expression pattern on human decidual NK during the first trimester of pregnancy / R. Marlin, M. Duriez, N. Berkane, C. de Truchis, Y. Madec, M.A. Rey-Cuille, J.S. Cummings, C. Cannou, H. Quillay, F. Barre-Sinoussi, M.T. Nugeyre, E. Menu // *PLoS One*. - 2012. - Vol.7, №1. - P. e30017.
435. Martinez-Zamora, M.A. Recurrent miscarriage, antiphospholipid antibodies and the risk of thromboembolic disease / M.A. Martinez-Zamora, R. Cervera, J. Balasch // *Clin Rev Allergy Immunol*. - 2012. - Vol.43, №3. - P. 265-274.
436. Masilamani, M. CD94/NKG2A inhibits NK cell activation by disrupting the actin network at the immunological synapse / M. Masilamani, C. Nguyen, J. Kabat, F. Borrego, J.E. Coligan // *J Immunol*. - 2006. - Vol.177, №6. - P. 3590-3596.
437. Mason, A.T. Regulation of NK cells through the 80-kDa TNFR (CD120b) / A.T. Mason, D.W. McVicar, C.A. Smith, H.A. Young, C.F. Ware, J.R. Ortaldo // *J Leukoc Biol*. - 1995. - Vol.58, №2. - P. 249-255.
438. Masuda, A. Efficient recruitment of c-FLIP(L) to the death-inducing signaling complex leads to Fas resistance in natural killer-cell lymphoma / A. Masuda, Y. Isobe, K. Sugimoto, M. Yoshimori, A. Arai, N. Komatsu // *Cancer Sci*. - 2020. - Vol.111, №3. - P. 807-816.
439. Matsumoto, J. Expression of surface CD1d in the extravillous trophoblast cells of early gestational placenta is downregulated in a manner dependent on trophoblast differentiation / J. Matsumoto, K. Kawana, T. Nagamatsu, D.J. Schust, T. Fujii, H. Sato, H. Hyodo, T. Yasugi, S. Kozuma, Y. Taketani // *Biochem Biophys Res Commun*. - 2008. - Vol.371, №2. - P. 236-241.
440. Matthews, L. BAY 50-4798, a novel, high-affinity receptor-specific recombinant interleukin-2 analog, induces dose-dependent increases in CD25 expression and proliferation among unstimulated, human peripheral blood mononuclear cells in vitro / L. Matthews, S. Chapman, M.S. Ramchandani, H.C. Lane, R.T. Davey, Jr., I. Sereti // *Clin Immunol*. - 2004. - Vol.113, №3. - P. 248-255.
441. Mause, S.F. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange / S.F. Mause, C. Weber // *Circ Res*. - 2010. - Vol.107, №9. - P. 1047-1057.
442. Mayhew, T.M. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies / T.M. Mayhew, D.S. Charnock-Jones, P. Kaufmann // *Placenta*. - 2004. - Vol.25, №2-3. - P. 127-139.
443. McIntire, R.H. Programming of human monocytes by the uteroplacental environment / R.H. McIntire, K.G. Ganacias, J.S. Hunt // *Reprod Sci*. - 2008. - Vol.15, №5. - P. 437-447.



444. Meazza, R. Role of common-gamma chain cytokines in NK cell development and function: perspectives for immunotherapy / R. Meazza, B. Azzarone, A.M. Orengo, S. Ferrini // *J Biomed Biotechnol.* - 2011. - Vol.2011. - P. 861920.
445. Mei, J. CXCL16/CXCR6 interaction promotes endometrial decidualization via the PI3K/AKT pathway / J. Mei, Y. Yan, S.Y. Li, W.J. Zhou, Q. Zhang, M.Q. Li, H.X. Sun // *Reproduction.* - 2019. - Vol.157, №3. - P. 273-282.
446. Meisser, A. Effects of interleukin-6 (IL-6) on cytotrophoblastic cells / A. Meisser, P. Cameo, D. Islami, A. Campana, P. Bischof // *Mol Hum Reprod.* - 1999. - Vol.5, №11. - P. 1055-1058.
447. Melsted, W.N. The choriocarcinoma cell line JEG-3 upregulates regulatory T cell phenotypes and modulates pro-inflammatory cytokines through HLA-G / W.N. Melsted, S.H. Matzen, M.H. Andersen, T.V.F. Hviid // *Cell Immunol.* - 2018. - Vol.324. - P. 14-23.
448. Mendoza-Cabrera, M.I. Effect of pregnancy hormone mixtures on cytokine production and surface marker expression in naive and LPS-activated THP-1 differentiated monocytes/macrophages / M.I. Mendoza-Cabrera, R.E. Navarro-Hernandez, A. Santerre, P.C. Ortiz-Lazareno, A.L. Pereira-Suarez, C. Estrada-Chavez // *Innate Immun.* - 2020. - Vol.26, №2. - P. 84-96.
449. Merino, D. Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2 / D. Merino, N. Lalaoui, A. Morizot, P. Schneider, E. Solary, O. Micheau // *Mol Cell Biol.* - 2006. - Vol.26, №19. - P. 7046-7055.
450. Metkar, S.S. Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation / S.S. Metkar, B. Wang, M. Aguilar-Santelises, S.M. Raja, L. Uhlin-Hansen, E. Podack, J.A. Trapani, C.J. Froelich // *Immunity.* - 2002. - Vol.16, №3. - P. 417-428.
451. Meyer, C.E. Expression of the inhibitory receptor NKG2A correlates with increased liver and splenic NK cell response to activating receptor engagement / C.E. Meyer, P.N. Key, T. Zhu, M. Shabsovich, A. Ni, S.K. Tripathy // *Immun Inflamm Dis.* - 2017. - Vol.5, №2. - P. 177-189.
452. Meza Guzman, L.G. Natural Killer Cells: Tumor Surveillance and Signaling / L.G. Meza Guzman, N. Keating, S.E. Nicholson // *Cancers (Basel).* - 2020. - Vol.12, №4. - P. 952.
453. Mezouar, S. Changing the paradigm of IFN-gamma at the interface between innate and adaptive immunity: Macrophage-derived IFN-gamma / S. Mezouar, J.L. Mege // *J Leukoc Biol.* - 2020. - Vol.108, №1. - P. 419-426.
454. Mikhailova, V.A. Detection of microparticles of leukocytic origin in the peripheral blood in normal pregnancy and preeclampsia / V.A. Mikhailova, O.M. Ovchinnikova, M.S. Zainulina, D.I. Sokolov, S.A. Sel'kov // *Bull Exp Biol Med.* - 2014. - Vol.157, №6. - P. 751-756.

455. Miko, E. Progesterone-induced blocking factor (PIBF) and trophoblast invasiveness / E. Miko, M. Halasz, B. Jericevic-Mulac, L. Wicherek, P. Arck, G. Arato, J. Skret Magierlo, D. Rukavina, J. Szekeres-Bartho // *J Reprod Immunol.* - 2011. - Vol.90, №1. - P. 50-57.
456. Miller, D. Innate Lymphoid Cells in the Maternal and Fetal Compartments / D. Miller, K. Motomura, V. Garcia-Flores, R. Romero, N. Gomez-Lopez // *Front Immunol.* - 2018. - Vol.9. - P. 2396.
457. Miller, V.M. Specific cell-derived microvesicles: Linking endothelial function to carotid artery intima-media thickness in low cardiovascular risk menopausal women / V.M. Miller, B.D. Lahr, K.R. Bailey, H.N. Hodis, S.L. Mulvagh, M. Jayachandran // *Atherosclerosis.* - 2016. - Vol.246. - P. 21-28.
458. Mincheva-Nilsson, L. Cancer exosomes and NKG2D receptor-ligand interactions: impairing NKG2D-mediated cytotoxicity and anti-tumour immune surveillance / L. Mincheva-Nilsson, V. Baranov // *Semin Cancer Biol.* - 2014. - Vol.28. - P. 24-30.
459. Mirandola, P. Activated human NK and CD8<sup>+</sup> T cells express both TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity / P. Mirandola, C. Ponti, G. Gobbi, I. Sponzilli, M. Vaccarezza, L. Cocco, G. Zauli, P. Secchiero, F.A. Manzoli, M. Vitale // *Blood.* - 2004. - Vol.104, №8. - P. 2418-2424.
460. Mirjagic Martinovic, K. Favorable in vitro effects of combined IL-12 and IL-18 treatment on NK cell cytotoxicity and CD25 receptor expression in metastatic melanoma patients / K. Mirjagic Martinovic, N. Babovic, R. Dzodic, V. Jurisic, S. Matkovic, G. Konjevic // *J Transl Med.* - 2015. - Vol.13. - P. 120.
461. Moffett, A. First do no harm: uterine natural killer (NK) cells in assisted reproduction / A. Moffett, N. Shreeve // *Hum Reprod.* - 2015. - Vol.30, №7. - P. 1519-1525.
462. Montaldo, E. Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function / E. Montaldo, G. Del Zotto, M. Della Chiesa, M.C. Mingari, A. Moretta, A. De Maria, L. Moretta // *Cytometry A.* - 2013. - Vol.83, №8. - P. 702-713.
463. Montaldo, E. Unique Eomes(+) NK Cell Subsets Are Present in Uterus and Decidua During Early Pregnancy / E. Montaldo, P. Vacca, L. Chiossone, D. Croxatto, F. Loiacono, S. Martini, S. Ferrero, T. Walzer, L. Moretta, M.C. Mingari // *Front Immunol.* - 2015. - Vol.6. - P. 646.
464. Montaldo, E. Human NK cells at early stages of differentiation produce CXCL8 and express CD161 molecule that functions as an activating receptor / E. Montaldo, C. Vitale, F. Cottalasso, R. Conte, T. Glatzer, P. Ambrosini, L. Moretta, M.C. Mingari // *Blood.* - 2012. - Vol.119, №17. - P. 3987-3996.
465. Moore, K.W. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor / K.W. Moore, R. de Waal Malefyt, R.L. Coffman, A. O'Garra // *Annu Rev Immunol.* - 2001. - Vol.19. - P. 683-765.

466. Moreau, P. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes / P. Moreau, F. Adrian-Cabestre, C. Menier, V. Guiard, L. Gourand, J. Dausset, E.D. Carosella, P. Paul // *Int Immunol.* - 1999. - Vol.11, №5. - P. 803-811.
467. Morel, N. Microparticles during sepsis and trauma. A link between inflammation and thrombotic processes / N. Morel, O. Morel, X. Delabranche, L. Jesel, F. Sztark, P. Dabadie, J.M. Freyssinet, F. Toti // *Ann Fr Anesth Reanim.* - 2006. - Vol.25, №9. - P. 955-966.
468. Morel, O. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles / O. Morel, L. Jesel, J.M. Freyssinet, F. Toti // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* - 2011. - Vol.31, №1. - P. 15-26.
469. Morel, O. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors / O. Morel, F. Toti, B. Hugel, J.M. Freyssinet // *Curr Opin Hematol.* - 2004. - Vol.11, №3. - P. 156-164.
470. Moser, G. Human trophoblast invasion: new and unexpected routes and functions / G. Moser, K. Windsperger, J. Pollheimer, S.C. de Sousa Lopes, B. Huppertz // *Histochem Cell Biol.* - 2018. - Vol.150, №4. - P. 361-370.
471. Munaut, C. Hypoxia is responsible for soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) but not for soluble endoglin induction in villous trophoblast / C. Munaut, S. Lorquet, C. Pequeux, S. Blacher, S. Berndt, F. Frankenne, J.M. Foidart // *Hum Reprod.* - 2008. - Vol.23, №6. - P. 1407-1415.
472. Muralidharan-Chari, V. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression / V. Muralidharan-Chari, J.W. Clancy, A. Sedgwick, C. D'Souza-Schorey // *J Cell Sci.* - 2010. - Vol.123, №Pt 10. - P. 1603-1611.
473. Murphy, S.P. Interferon gamma in successful pregnancies / S.P. Murphy, C. Tayade, A.A. Ashkar, K. Hatta, J. Zhang, B.A. Croy // *Biol Reprod.* - 2009. - Vol.80, №5. - P. 848-859.
474. Murrieta-Coxca, J.M. Role of IL-36 Cytokines in the Regulation of Angiogenesis Potential of Trophoblast Cells / J.M. Murrieta-Coxca, R.N. Gutierrez-Samudio, H.M. El-Shorafa, T. Groten, S. Rodriguez-Martinez, M.E. Cancino-Diaz, J.C. Cancino-Diaz, R.R. Favaro, U.R. Markert, D.M. Morales-Prieto // *Int J Mol Sci.* - 2020. - Vol.22, №1. - P. 285.
475. Nakashima, A. The balance of the immune system between T cells and NK cells in miscarriage / A. Nakashima, T. Shima, K. Inada, M. Ito, S. Saito // *Am J Reprod Immunol.* - 2012. - Vol.67, №4. - P. 304-310.
476. Naruse, K. Secretion of cytokines by villous cytotrophoblast and extravillous trophoblast in the first trimester of human pregnancy / K. Naruse, B.A. Innes, J.N. Bulmer, S.C. Robson, R.F. Searle, G.E. Lash // *J Reprod Immunol.* - 2010. - Vol.86, №2. - P. 148-150.

477. Naume, B. Synergistic effects of interleukin 4 and interleukin 12 on NK cell proliferation / B. Naume, M.K. Gately, B.B. Desai, A. Sundan, T. Espevik // *Cytokine*. - 1993. - Vol.5, №1. - P. 38-46.
478. Navarrete-Galvan, L. Optimizing NK-92 serial killers: gamma irradiation, CD95/Fas-ligation, and NK or LAK attack limit cytotoxic efficacy / L. Navarrete-Galvan, M. Guglielmo, J. Cruz Amaya, J. Smith-Gagen, V.C. Lombardi, R. Merica, D. Hudig // *J Transl Med*. - 2022. - Vol.20, №1. - P. 151.
479. Navarro, F. The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells / F. Navarro, M. Llano, T. Bellon, M. Colonna, D.E. Geraghty, M. Lopez-Botet // *Eur J Immunol*. - 1999. - Vol.29, №1. - P. 277-283.
480. Netter, P. Termination of the Activating NK Cell Immunological Synapse Is an Active and Regulated Process / P. Netter, M. Anft, C. Watzl // *J Immunol*. - 2017. - Vol.199, №7. - P. 2528-2535.
481. Newby, D. Villous explant culture: characterization and evaluation of a model to study trophoblast invasion / D. Newby, L. Marks, F. Cousins, E. Duffie, F. Lyall // *Hypertens Pregnancy*. - 2005. - Vol.24, №1. - P. 75-91.
482. Neykova, K. Endometrial receptivity and pregnancy outcome / K. Neykova, V. Tosto, I. Giardina, V. Tsibizova, G. Vakrilov // *J Matern Fetal Neonatal Med*. - 2022. - Vol.35, №13. - P. 2591-2605.
483. Ni, J. Sustained effector function of IL-12/15/18-preactivated NK cells against established tumors / J. Ni, M. Miller, A. Stojanovic, N. Garbi, A. Cerwenka // *J Exp Med*. - 2012. - Vol.209, №13. - P. 2351-2365.
484. Nielsen, C.M. Synergy between Common gamma Chain Family Cytokines and IL-18 Potentiates Innate and Adaptive Pathways of NK Cell Activation / C.M. Nielsen, A.S. Wolf, M.R. Goodier, E.M. Riley // *Front Immunol*. - 2016. - Vol.7. - P. 101.
485. Nilsson, L.L. HLA Class Ib-receptor interactions during embryo implantation and early pregnancy / L.L. Nilsson, T.V.F. Hviid // *Hum Reprod Update*. - 2022. - Vol.28, №3. - P. 435-454.
486. Nocturne, G. Impact of anti-TNF therapy on NK cells function and on immunosurveillance against B-cell lymphomas / G. Nocturne, S. Boudaoud, B. Ly, J. Pascaud, A. Paoletti, X. Mariette // *J Autoimmun*. - 2017. - Vol.80. - P. 56-64.
487. Norwitz, E.R. Implantation and the survival of early pregnancy / E.R. Norwitz, D.J. Schust, S.J. Fisher // *N Engl J Med*. - 2001. - Vol.345, №19. - P. 1400-1408.

488. Novembri, R. Effects of urocortin 2 and urocortin 3 on IL-10 and TNF-alpha expression and secretion from human trophoblast explants / R. Novembri, M. Torricelli, E. Bloise, N. Conti, L.R. Galeazzi, F.M. Severi, F. Petraglia // *Placenta*. - 2011. - Vol.32, №12. - P. 969-974.
489. Nowak, I. KIR, LILRB and their Ligands' Genes as Potential Biomarkers in Recurrent Implantation Failure / I. Nowak, K. Wilczynska, J.R. Wilczynski, A. Malinowski, P. Radwan, M. Radwan, P. Kusnierczyk // *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. - 2017. - Vol.65, №5. - P. 391-399.
490. Nunez, S.Y. Human M2 Macrophages Limit NK Cell Effector Functions through Secretion of TGF-beta and Engagement of CD85j / S.Y. Nunez, A. Ziblat, F. Secchiari, N.I. Torres, J.M. Sierra, X.L. Raffo Iraolagoitia, R.E. Araya, C.I. Domaica, M.B. Fuertes, N.W. Zwirner // *J Immunol*. - 2018. - Vol.200, №3. - P. 1008-1015.
491. Oberoi, P. Directed Differentiation of Mobilized Hematopoietic Stem and Progenitor Cells into Functional NK cells with Enhanced Antitumor Activity / P. Oberoi, K. Kamenjarin, J.F.V. Ossa, B. Uherek, H. Bonig, W.S. Wels // *Cells*. - 2020. - Vol.9, №4. - P. 811.
492. Ogasawara, K. Requirement for IRF-1 in the microenvironment supporting development of natural killer cells / K. Ogasawara, S. Hida, N. Azimi, Y. Tagaya, T. Sato, T. Yokochi-Fukuda, T.A. Waldmann, T. Taniguchi, S. Taki // *Nature*. - 1998. - Vol.391, №6668. - P. 700-703.
493. Oka, N. IL-12 regulates the expansion, phenotype, and function of murine NK cells activated by IL-15 and IL-18 / N. Oka, T. Markova, K. Tsuzuki, W. Li, Y. El-Darawish, M. Pencheva-Demireva, K. Yamanishi, H. Yamanishi, M. Sakagami, Y. Tanaka, H. Okamura // *Cancer Immunol Immunother*. - 2020. - Vol.69, №9. - P. 1699-1712.
494. Orange, J.S. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse / J.S. Orange // *Nat Rev Immunol*. - 2008. - Vol.8, №9. - P. 713-725.
495. Osinska, I. Perforin: an important player in immune response / I. Osinska, K. Popko, U. Demkow // *Cent Eur J Immunol*. - 2014. - Vol.39, №1. - P. 109-115.
496. Ostankova, Y.V. Expression of thrombospondin-1 gene mRNA and protein in the placenta in gestosis / Y.V. Ostankova, Y.S. Klimovskaya, O.A. Gorskaya, A.V. Kolobov, I.M. Kvetnoi, S.A. Selkov, D.I. Sokolov // *Bull Exp Biol Med*. - 2011. - Vol.151, №2. - P. 215-218.
497. Ottaviani, C. CD56brightCD16(-) NK cells accumulate in psoriatic skin in response to CXCL10 and CCL5 and exacerbate skin inflammation / C. Ottaviani, F. Nasorri, C. Bedini, O. de Pita, G. Girolomoni, A. Cavani // *Eur J Immunol*. - 2006. - Vol.36, №1. - P. 118-128.
498. Otun, H.A. Effect of tumour necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma on first trimester extravillous trophoblast invasion / H.A. Otun, G.E. Lash, B.A. Innes, J.N. Bulmer, K. Naruse, T. Hannon, R.F. Searle, S.C. Robson // *J Reprod Immunol*. - 2011. - Vol.88, №1. - P. 1-11.

499. Pahl, J.H.W. Memory-Like NK Cells: Remembering a Previous Activation by Cytokines and NK Cell Receptors / J.H.W. Pahl, A. Cerwenka, J. Ni // *Front Immunol.* - 2018. - Vol.9. - P. 2796.
500. Panagiotou, N. Microvesicles as Vehicles for Tissue Regeneration: Changing of the Guards / N. Panagiotou, R. Wayne Davies, C. Selman, P.G. Shiels // *Curr Pathobiol Rep.* - 2016. - Vol.4, №4. - P. 181-187.
501. Pandey, M.K. An update in recurrent spontaneous abortion / M.K. Pandey, R. Rani, S. Agrawal // *Arch Gynecol Obstet.* - 2005. - Vol.272, №2. - P. 95-108.
502. Papamitsou, T. Immunohistochemical study of immunological markers: HLAG, CD16, CD25, CD56 and CD68 in placenta tissues in recurrent pregnancy loss / T. Papamitsou, A. Toskas, K. Papadopoulou, A. Sioga, S. Lakis, M. Chatzistamatiou, Z. Economou, L. Adriopoulou // *Histol Histopathol.* - 2014. - Vol.29, №8. - P. 1047-1055.
503. Papuchova, H. The Dual Role of HLA-C in Tolerance and Immunity at the Maternal-Fetal Interface / H. Papuchova, T.B. Meissner, Q. Li, J.L. Strominger, T. Tilburgs // *Front Immunol.* - 2019. - Vol.10. - P. 2730.
504. Park, D.W. Peripheral blood NK cells reflect changes in decidual NK cells in women with recurrent miscarriages / D.W. Park, H.J. Lee, C.W. Park, S.R. Hong, J. Kwak-Kim, K.M. Yang // *Am J Reprod Immunol.* - 2010. - Vol.63, №2. - P. 173-180.
505. Park, J.Y. IL-15-induced IL-10 increases the cytolytic activity of human natural killer cells / J.Y. Park, S.H. Lee, S.R. Yoon, Y.J. Park, H. Jung, T.D. Kim, I. Choi // *Mol Cells.* - 2011. - Vol.32, №3. - P. 265-272.
506. Park, S.Y. Trophoblasts regulate natural killer cells via control of interleukin-15 receptor signaling / S.Y. Park, S. Yun, B.J. Ryu, A.R. Han, S.K. Lee // *Am J Reprod Immunol.* - 2017. - Vol.78, №2. - P. e12628.
507. Paul, S. Intratumoral natural killer cells show reduced effector and cytolytic properties and control the differentiation of effector Th1 cells / S. Paul, N. Kulkarni, Shilpi, G. Lal // *Oncoimmunology.* - 2016. - Vol.5, №12. - P. e1235106.
508. Pazina, T. Regulation of the Functions of Natural Cytotoxicity Receptors by Interactions with Diverse Ligands and Alterations in Splice Variant Expression / T. Pazina, A. Shemesh, M. Brusilovsky, A. Porgador, K.S. Campbell // *Front Immunol.* - 2017. - Vol.8. - P. 369.
509. Pelengaris, S. c-MYC: more than just a matter of life and death / S. Pelengaris, M. Khan, G. Evan // *Nat Rev Cancer.* - 2002. - Vol.2, №10. - P. 764-776.
510. Pelosi, A. An Anti-inflammatory microRNA Signature Distinguishes Group 3 Innate Lymphoid Cells From Natural Killer Cells in Human Decidua / A. Pelosi, C. Alicata, N. Tumino, T.

- Ingenere, F. Loiacono, M.C. Mingari, L. Moretta, P. Vacca // *Front Immunol.* - 2020. - Vol.11. - P. 133.
511. Penafuerte, C. The human ortholog of granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 fusion protein induces potent ex vivo natural killer cell activation and maturation / C. Penafuerte, N. Bautista-Lopez, M.R. Boulassel, J.P. Routy, J. Galipeau // *Cancer Res.* - 2009. - Vol.69, №23. - P. 9020-9028.
512. Pende, D. Killer Ig-Like Receptors (KIRs): Their Role in NK Cell Modulation and Developments Leading to Their Clinical Exploitation / D. Pende, M. Falco, M. Vitale, C. Cantoni, C. Vitale, E. Munari, A. Bertaina, F. Moretta, G. Del Zotto, G. Pietra, M.C. Mingari, F. Locatelli, L. Moretta // *Front Immunol.* - 2019. - Vol.10. - P. 1179.
513. Peng, H. NK cell trafficking in health and autoimmunity: a comprehensive review / H. Peng, Z. Tian // *Clin Rev Allergy Immunol.* - 2014. - Vol.47, №2. - P. 119-127.
514. Peng, J. Uterine activin receptor-like kinase 5 is crucial for blastocyst implantation and placental development / J. Peng, D. Monsivais, R. You, H. Zhong, S.A. Pangas, M.M. Matzuk // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2015. - Vol.112, №36. - P. E5098-5107.
515. Persson, G. Cytokine stimulation of the choriocarcinoma cell line JEG-3 leads to alterations in the HLA-G expression profile / G. Persson, J.B.S. Bork, C. Isgaard, T.G. Larsen, A.M. Bordoy, M.S. Bengtsson, T.V.F. Hviid // *Cell Immunol.* - 2020. - Vol.352. - P. 104110.
516. Perussia, B. The Cytokine Profile of Resting and Activated NK Cells / B. Perussia // *Methods.* - 1996. - Vol.9, №2. - P. 370-378.
517. Peterson, R.A. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression / R.A. Peterson // *Toxicol Pathol.* - 2012. - Vol.40, №2. - P. 186-204.
518. Pfefferle, A. Deciphering Natural Killer Cell Homeostasis / A. Pfefferle, B. Jacobs, A. Haroun-Izquierdo, L. Kveberg, E. Sohlberg, K.J. Malmberg // *Front Immunol.* - 2020. - Vol.11. - P. 812.
519. Pflanz, S. WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27 / S. Pflanz, L. Hibbert, J. Mattson, R. Rosales, E. Vaisberg, J.F. Bazan, J.H. Phillips, T.K. McClanahan, R. de Waal Malefyt, R.A. Kastelein // *J Immunol.* - 2004. - Vol.172, №4. - P. 2225-2231.
520. Piao, H.L. CXCL12/CXCR4 signal involved in the regulation of trophoblasts on peripheral NK cells leading to Th2 bias at the maternal-fetal interface / H.L. Piao, S.C. Wang, Y. Tao, Q. Fu, M.R. Du, D.J. Li // *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* - 2015. - Vol.19, №12. - P. 2153-2161.
521. Piccinni, M.P. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones / M.P. Piccinni, M.G. Giudizi, R. Biagiotti, L. Beloni, L. Giannarini,

- S. Sampognaro, P. Parronchi, R. Manetti, F. Annunziato, C. Livi // *J Immunol.* - 1995. - Vol.155, №1. - P. 128-133.
522. Piersma, S.J. Activation Receptor-Dependent IFN-gamma Production by NK Cells Is Controlled by Transcription, Translation, and the Proteasome / S.J. Piersma, M.A. Pak-Wittel, A. Lin, B. Plougastel-Douglas, W.M. Yokoyama // *J Immunol.* - 2019. - Vol.203, №7. - P. 1981-1988.
523. Pinho, M.J. Genetic regulation on ex vivo differentiated natural killer cells from human umbilical cord blood CD34+ cells / M.J. Pinho, C.J. Marques, F. Carvalho, M. Punzel, M. Sousa, A. Barros // *J Recept Signal Transduct Res.* - 2012. - Vol.32, №5. - P. 238-249.
524. Pitman, H. Altered expression of interleukin-6, interleukin-8 and their receptors in decidua of women with sporadic miscarriage / H. Pitman, B.A. Innes, S.C. Robson, J.N. Bulmer, G.E. Lash // *Hum Reprod.* - 2013. - Vol.28, №8. - P. 2075-2086.
525. Pohla, H. Evolution of a CD3+CD4+ alpha/beta T-cell receptor+ mature T-cell clone from CD3-CD7+ sorted human bone marrow cells / H. Pohla, M. Adibzadeh, H.J. Buhning, P. Siegels-Hubenthal, T. Deikeler, M. Owsianowsky, A. Schenk, A. Rehbein, E. Schlotz, K. Schaudt // *Dev Immunol.* - 1993. - Vol.3, №3. - P. 197-210.
526. Pollheimer, J. Regulation of Placental Extravillous Trophoblasts by the Maternal Uterine Environment / J. Pollheimer, S. Vondra, J. Baltayeva, A.G. Beristain, M. Knofler // *Front Immunol.* - 2018. - Vol.9. - P. 2597.
527. Poloski, E. JEG-3 Trophoblast Cells Producing Human Chorionic Gonadotropin Promote Conversion of Human CD4+FOXP3- T Cells into CD4+FOXP3+ Regulatory T Cells and Foster T Cell Suppressive Activity / E. Poloski, A. Oettel, S. Ehrentraut, L. Luley, S.D. Costa, A.C. Zenclussen, A. Schumacher // *Biol Reprod.* - 2016. - Vol.94, №5. - P. 106.
528. Poussin, C. Mechanism of an indirect effect of aqueous cigarette smoke extract on the adhesion of monocytic cells to endothelial cells in an in vitro assay revealed by transcriptomics analysis / C. Poussin, I. Gallitz, W.K. Schlage, Y. Steffen, K. Stolle, S. Lebrun, J. Hoeng, M.C. Peitsch, M. Lietz // *Toxicol In Vitro.* - 2014. - Vol.28, №5. - P. 896-908.
529. Prager, I. NK cells switch from granzyme B to death receptor-mediated cytotoxicity during serial killing / I. Prager, C. Liesche, H. van Ooijen, D. Urlaub, Q. Verron, N. Sandstrom, F. Fasbender, M. Claus, R. Eils, J. Beaudouin, B. Onfelt, C. Watzl // *J Exp Med.* - 2019. - Vol.216, №9. - P. 2113-2127.
530. Prager, I. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity / I. Prager, C. Watzl // *J Leukoc Biol.* - 2019. - Vol.105, №6. - P. 1319-1329.



531. Prasnikar, E. Nonameric Peptide Orchestrates Signal Transduction in the Activating HLA-E/NKG2C/CD94 Immune Complex as Revealed by All-Atom Simulations / E. Prasnikar, A. Perdih, J. Borisek // *Int J Mol Sci.* - 2021. - Vol.22, №13. - P. 6670.
532. Presicce, P. IL-1 signaling mediates intrauterine inflammation and chorio-decidua neutrophil recruitment and activation / P. Presicce, C.W. Park, P. Senthamaraiannan, S. Bhattacharyya, C. Jackson, F. Kong, C.M. Rueda, E. DeFranco, L.A. Miller, D.A. Hildeman, N. Salomonis, C.A. Chougnet, A.H. Jobe, S.G. Kallapur // *JCI Insight.* - 2018. - Vol.3, №6. - P. e98306.
533. Principe, S. Tumor-derived exosomes and microvesicles in head and neck cancer: implications for tumor biology and biomarker discovery / S. Principe, A.B. Hui, J. Bruce, A. Sinha, F.F. Liu, T. Kislinger // *Proteomics.* - 2013. - Vol.13, №10-11. - P. 1608-1623.
534. Prossler, J. The relationship between TGFbeta, low oxygen and the outgrowth of extravillous trophoblasts from anchoring villi during the first trimester of pregnancy / J. Prossler, Q. Chen, L. Chamley, J.L. James // *Cytokine.* - 2014. - Vol.68, №1. - P. 9-15.
535. Prutsch, N. The role of interleukin-1beta in human trophoblast motility / N. Prutsch, V. Fock, P. Haslinger, S. Haider, C. Fiala, J. Pollheimer, M. Knofler // *Placenta.* - 2012. - Vol.33, №9. - P. 696-703.
536. Qu, X. Immunological Approaches Towards Cancer and Inflammation: A Cross Talk / X. Qu, Y. Tang, S. Hua // *Front Immunol.* - 2018. - Vol.9. - P. 563.
537. Rajagopalan, S. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells / S. Rajagopalan, E.O. Long // *J Exp Med.* - 1999. - Vol.189, №7. - P. 1093-1100.
538. Rajagopalan, S. KIR2DL4 (CD158d): An activation receptor for HLA-G / S. Rajagopalan, E.O. Long // *Front Immunol.* - 2012. - Vol.3. - P. 258.
539. Rajashekhar, G. Hypoxia up-regulated angiogenin and down-regulated vascular cell adhesion molecule-1 expression and secretion in human placental trophoblasts / G. Rajashekhar, A. Loganath, A.C. Roy, S.S. Chong, Y.C. Wong // *J Soc Gynecol Investig.* - 2005. - Vol.12, №5. - P. 310-319.
540. Ramhorst, R.E. Galectin-1 confers immune privilege to human trophoblast: implications in recurrent fetal loss / R.E. Ramhorst, L. Giribaldi, L. Fraccaroli, M.A. Toscano, J.C. Stupirski, M.D. Romero, E.S. Durand, N. Rubinstein, A. Blaschitz, P. Sedlmayr, S. Genti-Raimondi, L. Fainboim, G.A. Rabinovich // *Glycobiology.* - 2012. - Vol.22, №10. - P. 1374-1386.
541. Rao, V.A. Cytokines, NK cells and regulatory T cell functions in normal pregnancy and reproductive failures / V.A. Rao, N.K. Kurian, K.A. Rao // *Am J Reprod Immunol.* - 2023. - Vol.89, №2. - P. e13667.

542. Rautela, J. IL-15 signaling in NK cell cancer immunotherapy / J. Rautela, N.D. Huntington // *Curr Opin Immunol.* - 2017. - Vol.44. - P. 1-6.
543. Rawlings, T.M. Modelling the impact of decidual senescence on embryo implantation in human endometrial assembloids / T.M. Rawlings, K. Makwana, D.M. Taylor, M.A. Mole, K.J. Fishwick, M. Tryfonos, J. Odendaal, A. Hawkes, M. Zernicka-Goetz, G.M. Hartshorne, J.J. Brosens, E.S. Lucas // *Elife.* - 2021. - Vol.10. - P. e69603.
544. Rebuli, M.E. Distinguishing Human Peripheral Blood NK Cells from CD56(dim)CD16(dim)CD69(+)CD103(+) Resident Nasal Mucosal Lavage Fluid Cells / M.E. Rebuli, E.A. Pawlak, D. Walsh, E.M. Martin, I. Jaspers // *Sci Rep.* - 2018. - Vol.8, №1. - P. 3394.
545. Redhead, M.L. The Transcription Factor NFIL3 Is Essential for Normal Placental and Embryonic Development but Not for Uterine Natural Killer (UNK) Cell Differentiation in Mice / M.L. Redhead, N.A. Portilho, A.M. Felker, S. Mohammad, D.L. Mara, B.A. Croy // *Biol Reprod.* - 2016. - Vol.94, №5. - P. 101.
546. Regis, S. NK Cell Function Regulation by TGF-beta-Induced Epigenetic Mechanisms / S. Regis, A. Dondero, F. Caliendo, C. Bottino, R. Castriconi // *Front Immunol.* - 2020. - Vol.11. - P. 311.
547. Renaud, S.J. Coordinated regulation of human trophoblast invasiveness by macrophages and interleukin 10 / S.J. Renaud, S.K. Macdonald-Goodfellow, C.H. Graham // *Biol Reprod.* - 2007. - Vol.76, №3. - P. 448-454.
548. Renaud, S.J. Natural killer-cell deficiency alters placental development in rats / S.J. Renaud, R.L. Scott, D. Chakraborty, M.A. Rumi, M.J. Soares // *Biol Reprod.* - 2017. - Vol.96, №1. - P. 145-158.
549. Renaud, S.J. Tumour necrosis factor alpha stimulates the production of monocyte chemoattractants by extravillous trophoblast cells via differential activation of MAPK pathways / S.J. Renaud, R. Sullivan, C.H. Graham // *Placenta.* - 2009. - Vol.30, №4. - P. 313-319.
550. Renoux, V.M. Identification of a Human Natural Killer Cell Lineage-Restricted Progenitor in Fetal and Adult Tissues / V.M. Renoux, A. Zriwil, C. Peitzsch, J. Michaelsson, D. Friberg, S. Soneji, E. Sitnicka // *Immunity.* - 2015. - Vol.43, №2. - P. 394-407.
551. Rheinlander, A. CD45 in human physiology and clinical medicine / A. Rheinlander, B. Schraven, U. Bommhardt // *Immunol Lett.* - 2018. - Vol.196. - P. 22-32.
552. Robbins, S.H. Direct effects of T-bet and MHC class I expression, but not STAT1, on peripheral NK cell maturation / S.H. Robbins, M.S. Tessmer, L. Van Kaer, L. Brossay // *Eur J Immunol.* - 2005. - Vol.35, №3. - P. 757-765.

553. Robertson, S.A. Embryotoxic cytokines-Potential roles in embryo loss and fetal programming / S.A. Robertson, P.Y. Chin, J.G. Femia, H.M. Brown // *J Reprod Immunol.* - 2018. - Vol.125. - P. 80-88.
554. Robinette, M.L. Immunological Genome. Transcriptional programs define molecular characteristics of innate lymphoid cell classes and subsets / M.L. Robinette, A. Fuchs, V.S. Cortez, J.S. Lee, Y. Wang, S.K. Durum, S. Gilfillan, M. Colonna // *Nat Immunol.* - 2015. - Vol.16, №3. - P. 306-317.
555. Romee, R. Cytokine activation induces human memory-like NK cells / R. Romee, S.E. Schneider, J.W. Leong, J.M. Chase, C.R. Keppel, R.P. Sullivan, M.A. Cooper, T.A. Fehniger // *Blood.* - 2012. - Vol.120, №24. - P. 4751-4760.
556. Roos, M.A. Microparticles in physiological and in pathological conditions / M.A. Roos, L. Gennero, T. Denysenko, S. Reguzzi, G. Cavallo, G.P. Pescarmona, A. Ponzetto // *Cell Biochem Funct.* - 2010. - Vol.28, №7. - P. 539-548.
557. Roth, I. Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10 / I. Roth, D.B. Corry, R.M. Locksley, J.S. Abrams, M.J. Litton, S.J. Fisher // *J Exp Med.* - 1996. - Vol.184, №2. - P. 539-548.
558. Roth, I. IL-10 is an autocrine inhibitor of human placental cytotrophoblast MMP-9 production and invasion / I. Roth, S.J. Fisher // *Dev Biol.* - 1999. - Vol.205, №1. - P. 194-204.
559. Rouas-Freiss, N. Role of the HLA-G immune checkpoint molecule in pregnancy / N. Rouas-Freiss, P. Moreau, J. LeMaoult, B. Papp, D. Tronik-Le Roux, E.D. Carosella // *Hum Immunol.* - 2021. - Vol.82, №5. - P. 353-361.
560. Rousalova, I. Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (review) / I. Rousalova, E. Krepela // *Int J Oncol.* - 2010. - Vol.37, №6. - P. 1361-1378.
561. Roussev, R.G. Preimplantation factor inhibits circulating natural killer cell cytotoxicity and reduces CD69 expression: implications for recurrent pregnancy loss therapy / R.G. Roussev, B.V. Dons'koi, C. Stamatkin, S. Ramu, V.P. Chernyshov, C.B. Coulam, E.R. Barnea // *Reprod Biomed Online.* - 2013. - Vol.26, №1. - P. 79-87.
562. Saghian, R. Establishment of maternal blood supply to the placenta: insights into plugging, unplugging and trophoblast behaviour from an agent-based model / R. Saghian, G. Bogle, J.L. James, A.R. Clark // *Interface Focus.* - 2019. - Vol.9, №5. - P. 20190019.
563. Saito, S. The balance between cytotoxic NK cells and regulatory NK cells in human pregnancy / S. Saito, A. Nakashima, S. Myojo-Higuma, A. Shiozaki // *J Reprod Immunol.* - 2008. - Vol.77, №1. - P. 14-22.

564. Saito, S. Cytokine production by CD16-CD56bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua / S. Saito, K. Nishikawa, T. Morii, M. Enomoto, N. Narita, K. Motoyoshi, M. Ichijo // *Int Immunol.* - 1993. - Vol.5, №5. - P. 559-563.
565. Salazar, M.D. Post-hoc evaluation of peripheral blood natural killer cell cytotoxicity in predicting the risk of recurrent pregnancy losses and repeated implantation failures / M.D. Salazar, W.J. Wang, A. Skariah, Q. He, K. Field, M. Nixon, R. Reed, S. Dambaeva, K. Beaman, A. Gilman-Sachs, J. Kwak-Kim // *J Reprod Immunol.* - 2022. - Vol.150. - P. 103487.
566. Salimi, E. Association of Promoter Region Polymorphisms of IL-6 and IL-18 Genes with Risk of Recurrent Pregnancy Loss: A Systematic Review and Meta-Analysis / E. Salimi, M. Karimi-Zarchi, S.A. Dastgheib, H. Abbasi, R.S. Tabatabaiee, A. Hadadan, N. Amjadi, M.J. Akbarian-Bafghi, H. Neamatzadeh // *Fetal Pediatr Pathol.* - 2019. - P. 1-14.
567. Sanchez-Correa, B. DNAM-1 and the TIGIT/PVRIG/TACTILE Axis: Novel Immune Checkpoints for Natural Killer Cell-Based Cancer Immunotherapy / B. Sanchez-Correa, I. Valhondo, F. Hassouneh, N. Lopez-Sejas, A. Pera, J.M. Bergua, M.J. Arcos, H. Banas, I. Casas-Aviles, E. Duran, C. Alonso, R. Solana, R. Tarazona // *Cancers (Basel).* - 2019. - Vol.11, №6. - P. 877.
568. Sathe, P. Identification of Novel Human NK Cell Progenitor Subsets / P. Sathe, S.H.M. Pang, R. Delconte, N. Elwood, N.D. Huntington // *Int J Mol Sci.* - 2017. - Vol.18, №12. - P. 2716.
569. Sato, Y. Trophoblasts acquire a chemokine receptor, CCR1, as they differentiate towards invasive phenotype / Y. Sato, T. Higuchi, S. Yoshioka, K. Tatsumi, H. Fujiwara, S. Fujii // *Development.* - 2003. - Vol.130, №22. - P. 5519-5532.
570. Scarpellini, F. Immunohistochemical Study on the Expression of G-CSF, G-CSFR, VEGF, VEGFR-1, Foxp3 in First Trimester Trophoblast of Recurrent Pregnancy Loss in Pregnancies Treated with G-CSF and Controls / F. Scarpellini, F.G. Klinger, G. Rossi, M. Sbracia // *Int J Mol Sci.* - 2019. - Vol.21, №1. - P. 285.
571. Schafer-Somi, S. Cytokines during early pregnancy of mammals: a review / S. Schafer-Somi // *Anim Reprod Sci.* - 2003. - Vol.75, №1-2. - P. 73-94.
572. Schanton, M. Involvement of leptin in the molecular physiology of the placenta / M. Schanton, J.L. Maymo, A. Perez-Perez, V. Sanchez-Margalet, C.L. Varone // *Reproduction.* - 2018. - Vol.155, №1. - P. R1-R12.
573. Schanz, A. Pre-eclampsia is associated with elevated CXCL12 levels in placental syncytiotrophoblasts and maternal blood / A. Schanz, V.D. Winn, S.J. Fisher, M. Blumenstein, C. Heiss, A.P. Hess, J.S. Kruessel, M. McMaster, R.A. North // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* - 2011. - Vol.157, №1. - P. 32-37.

574. Schilling, B. Transforming growth factor-beta(1), -beta(2), -beta(3) and their type I and II receptors in human term placenta / B. Schilling, J. Yeh // *Gynecol Obstet Invest.* - 2000. - Vol.50, №1. - P. 19-23.
575. Schleinitz, N. Recruitment of activation receptors at inhibitory NK cell immune synapses / N. Schleinitz, M.E. March, E.O. Long // *PLoS One.* - 2008. - Vol.3, №9. - P. e3278.
576. Scholzen, T. The Ki-67 protein: from the known and the unknown / T. Scholzen, J. Gerdes // *J Cell Physiol.* - 2000. - Vol.182, №3. - P. 311-322.
577. Schug, Z.T. BID is cleaved by caspase-8 within a native complex on the mitochondrial membrane / Z.T. Schug, F. Gonzalvez, R.H. Houtkooper, F.M. Vaz, E. Gottlieb // *Cell Death Differ.* - 2011. - Vol.18, №3. - P. 538-548.
578. Schulz, U. Interleukin-10 promotes NK cell killing of autologous macrophages by stimulating expression of NKG2D ligands / U. Schulz, M. Kreutz, G. Multhoff, B. Stoelcker, M. Kohler, R. Andreesen, E. Holler // *Scand J Immunol.* - 2010. - Vol.72, №4. - P. 319-331.
579. Scott, L.M. Production and regulation of interleukin-1 family cytokines at the materno-fetal interface / L.M. Scott, A.H. Bryant, A. Rees, B. Down, R.H. Jones, C.A. Thornton // *Cytokine.* - 2017. - Vol.99. - P. 194-202.
580. Seillet, C. Development, Homeostasis, and Heterogeneity of NK Cells and ILC1 / C. Seillet, G.T. Belz, N.D. Huntington // *Curr Top Microbiol Immunol.* - 2016. - Vol.395. - P. 37-61.
581. Seillet, C. Differential requirement for Nfil3 during NK cell development / C. Seillet, N.D. Huntington, P. Gangatirkar, E. Axelsson, M. Minnich, H.J. Brady, M. Busslinger, M.J. Smyth, G.T. Belz, S. Carotta // *J Immunol.* - 2014. - Vol.192, №6. - P. 2667-2676.
582. Senthilnayagam, B. Decidual CD56+ Natural Killer Cells in Spontaneous Early Pregnancy Loss- An Immunohistochemical Study / B. Senthilnayagam, S. Karthikeyan, J. Sukumaran, A. Srivalsan, R. Rao, V. Subbiah // *J Clin Diagn Res.* - 2016. - Vol.10, №10. - P. EC27-EC29.
583. Sentman, C.L. Recruitment of uterine NK cells: induction of CXC chemokine ligands 10 and 11 in human endometrium by estradiol and progesterone / C.L. Sentman, S.K. Meadows, C.R. Wira, M. Eriksson // *J Immunol.* - 2004. - Vol.173, №11. - P. 6760-6766.
584. Seshadri, S. Natural killer cells in female infertility and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis / S. Seshadri, S.K. Sunkara // *Hum Reprod Update.* - 2014. - Vol.20, №3. - P. 429-438.
585. Shahbazi, M.N. Deconstructing and reconstructing the mouse and human early embryo / M.N. Shahbazi, M. Zernicka-Goetz // *Nat Cell Biol.* - 2018. - Vol.20, №8. - P. 878-887.
586. Sharkey, A.M. Killer Ig-like receptor expression in uterine NK cells is biased toward recognition of HLA-C and alters with gestational age / A.M. Sharkey, L. Gardner, S. Hiby, L.

- Farrell, R. Apps, L. Masters, J. Goodridge, L. Lathbury, C.A. Stewart, S. Verma, A. Moffett // *J Immunol.* - 2008. - Vol.181, №1. - P. 39-46.
587. Sharkey, A.M. Tissue-Specific Education of Decidual NK Cells / A.M. Sharkey, S. Xiong, P.R. Kennedy, L. Gardner, L.E. Farrell, O. Chazara, M.A. Ivarsson, S.E. Hiby, F. Colucci, A. Moffett // *J Immunol.* - 2015. - Vol.195, №7. - P. 3026-3032.
588. Sharma, N. NKG2D Signaling between Human NK Cells Enhances TACE-Mediated TNF-alpha Release / N. Sharma, C.V. Trinidad, A.P. Trembath, M.A. Markiewicz // *J Immunol.* - 2017. - Vol.199, №8. - P. 2865-2872.
589. Sharma, S. Decidual Control of Trophoblast Invasion / S. Sharma, G. Godbole, D. Modi // *Am J Reprod Immunol.* - 2016. - Vol.75, №3. - P. 341-350.
590. Shemesh, A. Splice variants of human natural cytotoxicity receptors: novel innate immune checkpoints / A. Shemesh, M. Brusilovsky, K. Kundu, A. Ottolenghi, K.S. Campbell, A. Porgador // *Cancer Immunol Immunother.* - 2018. - Vol.67, №12. - P. 1871-1883.
591. Sheridan, M.A. Characterization of primary models of human trophoblast / M.A. Sheridan, X. Zhao, R.C. Fernando, L. Gardner, V. Perez-Garcia, Q. Li, S.G.E. Marsh, R. Hamilton, A. Moffett, M.Y. Turco // *Development.* - 2021. - Vol.148, №21. - P. 1-13.
592. Shi, Y. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus / Y. Shi, J. Massague // *Cell.* - 2003. - Vol.113, №6. - P. 685-700.
593. Shigeru, S. The balance between cytotoxic NK cells and regulatory NK cells in human pregnancy / S. Shigeru, N. Akitoshi, M.-H. Subaru, A. Shiozaki // *J Reprod Immunol.* - 2008. - Vol.77. - P. 14-22.
594. Shobu, T. The surface expression of HLA-F on decidual trophoblasts increases from mid to term gestation / T. Shobu, N. Sageshima, H. Tokui, M. Omura, K. Saito, Y. Nagatsuka, M. Nakanishi, Y. Hayashi, K. Hatake, A. Ishitani // *J Reprod Immunol.* - 2006. - Vol.72, №1-2. - P. 18-32.
595. Shokouhifar, A. Overcoming the UCB HSCs -Derived NK cells Dysfunction through Harnessing RAS/MAPK, IGF-1R and TGF-beta Signaling Pathways / A. Shokouhifar, G. Anani Sarab, M. Yazdanifar, M. Fereidouni, M. Nouri, M. Ebrahimi // *Cancer Cell Int.* - 2021. - Vol.21, №1. - P. 298.
596. Sica, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas / A. Sica, A. Mantovani // *J Clin Invest.* - 2012. - Vol.122, №3. - P. 787-795.
597. Siewiera, J. Natural cytotoxicity receptor splice variants orchestrate the distinct functions of human natural killer cell subtypes / J. Siewiera, J. Gouilly, H.R. Hocine, G. Cartron, C. Levy, R. Al-Daccak, N. Jabrane-Ferrat // *Nat Commun.* - 2015. - Vol.6. - P. 10183.

598. Silva, J.F. Intrauterine trophoblast migration: A comparative view of humans and rodents / J.F. Silva, R. Serakides // *Cell Adh Migr.* - 2016. - Vol.10, №1-2. - P. 88-110.
599. Simak, J. Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers / J. Simak, M.P. Gelderman // *Transfus Med Rev.* - 2006. - Vol.20, №1. - P. 1-26.
600. Simak, J. Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome / J. Simak, M.P. Gelderman, H. Yu, V. Wright, A.E. Baird // *J Thromb Haemost.* - 2006. - Vol.4, №6. - P. 1296-1302.
601. Simonetta, F. NK Cell Functional Impairment after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Is Associated with Reduced Levels of T-bet and Eomesodermin / F. Simonetta, A. Pradier, C. Bosshard, S. Masouridi-Levrat, Y. Chalandon, E. Roosnek // *J Immunol.* - 2015. - Vol.195, №10. - P. 4712-4720.
602. Simoni, Y. Dissecting human ILC heterogeneity: more than just three subsets / Y. Simoni, E.W. Newell // *Immunology.* - 2018. - Vol.153, №3. - P. 297-303.
603. Singh, H.D. TRAIL regulatory receptors constrain human hepatic stellate cell apoptosis / H.D. Singh, I. Otano, K. Rombouts, K.P. Singh, D. Peppas, U.S. Gill, K. Bottcher, P.T.F. Kennedy, J. Oben, M. Pinzani, H. Walczak, G. Fusai, W.M.C. Rosenberg, M.K. Maini // *Sci Rep.* - 2017. - Vol.7, №1. - P. 5514.
604. Sitras, V. Differences in gene expression between first and third trimester human placenta: a microarray study / V. Sitras, C. Fenton, R. Paulssen, A. Vartun, G. Acharya // *PLoS One.* - 2012. - Vol.7, №3. - P. e33294.
605. Sivori, S. Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications / S. Sivori, P. Vacca, G. Del Zotto, E. Munari, M.C. Mingari, L. Moretta // *Cell Mol Immunol.* - 2019. - Vol.16, №5. - P. 430-441.
606. So, E.C. NK cell expression of Tim-3: First impressions matter / E.C. So, A. Khaladj-Ghom, Y. Ji, J. Amin, Y. Song, E. Burch, H. Zhou, H. Sun, S. Chen, S. Bentzen, R. Hertzano, X. Zhang, S.E. Strome // *Immunobiology.* - 2019. - Vol.224, №3. - P. 362-370.
607. Soares, M.J. Hypoxia and Placental Development / M.J. Soares, K. Iqbal, K. Kozai // *Birth Defects Res.* - 2017. - Vol.109, №17. - P. 1309-1329.
608. Sojka, D.K. Uterine Natural Killer Cell Heterogeneity: Lessons From Mouse Models / D.K. Sojka // *Front Immunol.* - 2020. - Vol.11. - P. 290.
609. Sojka, D.K. Cutting Edge: Local Proliferation of Uterine Tissue-Resident NK Cells during Decidualization in Mice / D.K. Sojka, L. Yang, B. Plougastel-Douglas, D.A. Higuchi, B.A. Croy, W.M. Yokoyama // *J Immunol.* - 2018. - Vol.201, №9. - P. 2551-2556.

610. Sojka, D.K. Uterine natural killer cells: To protect and to nurture / D.K. Sojka, L. Yang, W.M. Yokoyama // *Birth Defects Res.* - 2018. - Vol.110, №20. - P. 1531-1538.
611. Sokolov, D.I. Changes in Functional Activity of JEG-3 Trophoblast Cell Line in the Presence of Factors Secreted by Placenta / D.I. Sokolov, K.N. Furaeva, O.I. Stepanova, O.M. Ovchinnikova, L.P. Viazmina, G.R. Kozonov, T.U. Kuzminykh, S.A. Selkov // *Arch Med Res.* - 2015. - Vol.46, №4. - P. 245-256.
612. Sokolov, D.I. Proliferative and Migration Activity of JEG-3 Trophoblast Cell Line in the Presence of Cytokines / D.I. Sokolov, K.N. Furaeva, O.I. Stepanova, S.A. Sel'kov // *Bull Exp Biol Med.* - 2015. - Vol.159, №4. - P. 550-556.
613. Sokolov, D.I. The role of cytokines in control of placenta developing in the norm and at preeclampsia / D.I. Sokolov, M.V. Lesnichiya, A.V. Selutin, V.A. Klimova, O.N. Arzhanova, S.A. Selkov // *Immunology (Russia) / Immunologiya.* - 2009. - Vol.1. - P. 22-27.
614. Sokolov, D.I. Influence of peripheral blood microparticles of pregnant women with preeclampsia on the phenotype of monocytes / D.I. Sokolov, O.M. Ovchinnikova, D.A. Korenkov, A.N. Viknyanschuk, K.A. Benken, K.V. Onokhin, S.A. Selkov // *Transl Res.* - 2016. - Vol.170. - P. 112-123.
615. Sokolov, D.I. Decidual macrophages: the role in immunologic dialogue of mother and the fetus / D.I. Sokolov, S.A. Selkov // *Immunologia (Russia) / Immunology.* - 2014. - Vol.35, №2. - P. 113-117.
616. Sokolov, D.I. The role of the different subpopulations of CD4<sup>+</sup>T lymphocytes during pregnancy / D.I. Sokolov, O.I. Stepanova, S.I. Selkov // *Medical Immunology (Russia).* - 2016. - Vol.18, №6. - P. 521-536.
617. Song, X. The potential markers of NK-92 associated to cytotoxicity against K562 cells / X. Song, C. Xu, X. Wu, X. Zhao, J. Fan, S. Meng // *Biologicals.* - 2020. - Vol.68. - P. 46-53.
618. Song, Y. IL-12/IL-18-preactivated donor NK cells enhance GVL effects and mitigate GvHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation / Y. Song, B. Hu, Y. Liu, Z. Jin, Y. Zhang, D. Lin, Y. Zhu, L. Lei, H. Gong, Y. Mei, H.Y. Teo, D. Wu, H. Liu // *Eur J Immunol.* - 2018. - Vol.48, №4. - P. 670-682.
619. Sordo-Bahamonde, C. Mechanisms of Apoptosis Resistance to NK Cell-Mediated Cytotoxicity in Cancer / C. Sordo-Bahamonde, S. Lorenzo-Herrero, A.R. Payer, S. Gonzalez, A. Lopez-Soto // *Int J Mol Sci.* - 2020. - Vol.21, №10. - P. 3726.
620. Sotnikova, N. Interaction of decidual CD56<sup>+</sup> NK with trophoblast cells during normal pregnancy and recurrent spontaneous abortion at early term of gestation / N. Sotnikova, D. Voronin, Y. Antsiferova, E. Bukina // *Scand J Immunol.* - 2014. - Vol.80, №3. - P. 198-208.



621. Southcombe, J.H. Interleukin-1 family cytokines and their regulatory proteins in normal pregnancy and pre-eclampsia / J.H. Southcombe, C.W. Redman, I.L. Sargent, I. Granne // *Clin Exp Immunol.* - 2015. - Vol.181, №3. - P. 480-490.
622. Spits, H. Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature / H. Spits, D. Artis, M. Colonna, A. Dieffenbach, J.P. Di Santo, G. Eberl, S. Koyasu, R.M. Locksley, A.N. McKenzie, R.E. Mebius, F. Powrie, E. Vivier // *Nat Rev Immunol.* - 2013. - Vol.13, №2. - P. 145-149.
623. Spits, H. NK cells and type 1 innate lymphoid cells: partners in host defense / H. Spits, J.H. Bernink, L. Lanier // *Nat Immunol.* - 2016. - Vol.17, №7. - P. 758-764.
624. Spits, H. Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function / H. Spits, T. Cupedo // *Annu Rev Immunol.* - 2012. - Vol.30. - P. 647-675.
625. Staaf, E. Educated natural killer cells show dynamic movement of the activating receptor NKp46 and confinement of the inhibitory receptor Ly49A / E. Staaf, P.N. Hedde, S. Bagawath Singh, J. Piguet, E. Gratton, S. Johansson // *Sci Signal.* - 2018. - Vol.11, №517. - P. eaai9200.
626. Stauber, D.J. Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor / D.J. Stauber, E.W. Debler, P.A. Horton, K.A. Smith, I.A. Wilson // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2006. - Vol.103, №8. - P. 2788-2793.
627. Stenqvist, A.C. Exosomes secreted by human placenta carry functional Fas ligand and TRAIL molecules and convey apoptosis in activated immune cells, suggesting exosome-mediated immune privilege of the fetus / A.C. Stenqvist, O. Nagaeva, V. Baranov, L. Mincheva-Nilsson // *J Immunol.* - 2013. - Vol.191, №11. - P. 5515-5523.
628. Stepanova, O.I. Effects of placental secretory factors on cytokine production by endothelial cells / O.I. Stepanova, N.U. Safronova, K.N. Furaeva, T.U. Lvova, D.I. Sokolov, S.A. Selkov // *Bull Exp Biol Med.* - 2013. - Vol.154, №3. - P. 375-378.
629. Stokic-Trtica, V. NK Cell Development in Times of Innate Lymphoid Cell Diversity / V. Stokic-Trtica, A. Dieffenbach, C.S.N. Klose // *Front Immunol.* - 2020. - Vol.11. - P. 813.
630. Straszewski-Chavez, S.L. The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy / S.L. Straszewski-Chavez, V.M. Abrahams, G. Mor // *Endocr Rev.* - 2005. - Vol.26, №7. - P. 877-897.
631. Streltsova, M.A. Recurrent Stimulation of Natural Killer Cell Clones with K562 Expressing Membrane-Bound Interleukin-21 Affects Their Phenotype, Interferon-gamma Production, and Lifespan / M.A. Streltsova, S.A. Erokhina, L.M. Kanevskiy, M.V. Grechikhina, P.A. Kobyzeva, D.A. Lee, W.G. Telford, A.M. Sapozhnikov, E.I. Kovalenko // *Int J Mol Sci.* - 2019. - Vol.20, №2. - P. 443.
632. Streltsova, M.A. Analysis of NK cell clones obtained using interleukin-2 and gene-modified K562 cells revealed the ability of "senescent" NK cells to lose CD57 expression and start

- expressing NKG2A / M.A. Streltsova, S.A. Erokhina, L.M. Kanevskiy, D.A. Lee, W.G. Telford, A.M. Sapozhnikov, E.I. Kovalenko // *PLoS One*. - 2018. - Vol.13, №12. - P. e0208469.
633. Strizova, Z. NK and T cells with a cytotoxic/migratory phenotype accumulate in peritumoral tissue of patients with clear cell renal carcinoma / Z. Strizova, P. Taborska, D. Stakheev, S. Partlova, K. Havlova, S. Vesely, J. Bartunkova, D. Smrz // *Urol Oncol*. - 2019. - Vol.37, №7. - P. 503-509.
634. Suarez-Fueyo, A. Downregulation of CD3zeta in NK Cells from Systemic Lupus Erythematosus Patients Confers a Proinflammatory Phenotype / A. Suarez-Fueyo, S.J. Bradley, T. Katsuyama, S. Solomon, E. Katsuyama, V.C. Kytтары, V.R. Moulton, G.C. Tsokos // *J Immunol*. - 2018. - Vol.200, №9. - P. 3077-3086.
635. Suck, G. KHYG-1, a model for the study of enhanced natural killer cell cytotoxicity / G. Suck, D.R. Branch, M.J. Smyth, R.G. Miller, J. Vergidis, S. Fahim, A. Keating // *Exp Hematol*. - 2005. - Vol.33, №10. - P. 1160-1171.
636. Sun, C. TGF-beta1 down-regulation of NKG2D/DAP10 and 2B4/SAP expression on human NK cells contributes to HBV persistence / C. Sun, B. Fu, Y. Gao, X. Liao, R. Sun, Z. Tian, H. Wei // *PLoS Pathog*. - 2012. - Vol.8, №3. - P. e1002594.
637. Sun, J. Tim-3 Is Upregulated in NK Cells during Early Pregnancy and Inhibits NK Cytotoxicity toward Trophoblast in Galectin-9 Dependent Pathway / J. Sun, M. Yang, Y. Ban, W. Gao, B. Song, Y. Wang, Y. Zhang, Q. Shao, B. Kong, X. Qu // *PLoS One*. - 2016. - Vol.11, №1. - P. e0147186.
638. Sun, R. Tumor-associated neutrophils suppress antitumor immunity of NK cells through the PD-L1/PD-1 axis / R. Sun, Y. Xiong, H. Liu, C. Gao, L. Su, J. Weng, X. Yuan, D. Zhang, J. Feng // *Transl Oncol*. - 2020. - Vol.13, №10. - P. 100825.
639. Sun, Y. Decreased placental IL9 and IL9R in preeclampsia impair trophoblast cell proliferation, invasion, and angiogenesis / Y. Sun, S. Liu, R. Hu, Q. Zhou, X. Li // *Hypertens Pregnancy*. - 2020. - Vol.39, №3. - P. 228-235.
640. Sung, D.C. VE-cadherin enables trophoblast endovascular invasion and spiral artery remodeling during placental development / D.C. Sung, X. Chen, M. Chen, J. Yang, S. Schultz, A. Babu, Y. Xu, S. Gao, T.C.S.t. Keller, P. Mericko-Ishizuka, M. Lee, Y. Yang, J.P. Scallan, M.L. Kahn // *Elife*. - 2022. - Vol.11. - P. e77241.
641. Sweeney, E.A. Inhibition of sphingolipid induced apoptosis by caspase inhibitors indicates that sphingosine acts in an earlier part of the apoptotic pathway than ceramide / E.A. Sweeney, J. Inokuchi, Y. Igarashi // *FEBS Lett*. - 1998. - Vol.425, №1. - P. 61-65.

642. Tait Wojno, E.D. Innate lymphoid cells: balancing immunity, inflammation, and tissue repair in the intestine / E.D. Tait Wojno, D. Artis // *Cell Host Microbe*. - 2012. - Vol.12, №4. - P. 445-457.
643. Takahashi, E. Induction of CD16<sup>+</sup> CD56<sup>bright</sup> NK cells with antitumour cytotoxicity not only from CD16<sup>-</sup> CD56<sup>bright</sup> NK Cells but also from CD16<sup>-</sup> CD56<sup>dim</sup> NK cells / E. Takahashi, N. Kuranaga, K. Satoh, Y. Habu, N. Shinomiya, T. Asano, S. Seki, M. Hayakawa // *Scand J Immunol*. - 2007. - Vol.65, №2. - P. 126-138.
644. Takahashi, H. Natural Cytotoxicity Receptors in Decidua Natural Killer Cells of Term Normal Pregnancy / H. Takahashi, T. Yamamoto, M. Yamazaki, T. Murase, T. Matsuno, F. Chishima // *J Pregnancy*. - 2018. - Vol.2018. - P. 4382084.
645. Tang, A.W. Natural killer cells and pregnancy outcomes in women with recurrent miscarriage and infertility: a systematic review / A.W. Tang, Z. Alfirevic, S. Quenby // *Hum Reprod*. - 2011. - Vol.26, №8. - P. 1971-1980.
646. Tang, L. Deficiency of DICER reduces the invasion ability of trophoblasts and impairs the pro-angiogenic effect of trophoblast-derived microvesicles / L. Tang, M. Yang, L. Qin, X. Li, G. He, X. Liu, W. Xu // *J Cell Mol Med*. - 2020. - Vol.24, №9. - P. 4915-4930.
647. Tao, Y. CD56<sup>(bright)</sup>CD25<sup>+</sup> NK cells are preferentially recruited to the maternal/fetal interface in early human pregnancy / Y. Tao, Y.H. Li, H.L. Piao, W.J. Zhou, D. Zhang, Q. Fu, S.C. Wang, D.J. Li, M.R. Du // *Cell Mol Immunol*. - 2015. - Vol.12, №1. - P. 77-86.
648. Tao, Y. Decidual CXCR4(+) CD56<sup>(bright)</sup> NK cells as a novel NK subset in maternal-foetal immune tolerance to alleviate early pregnancy failure / Y. Tao, Y.H. Li, D. Zhang, L. Xu, J.J. Chen, Y.F. Sang, H.L. Piao, X.L. Jing, M. Yu, Q. Fu, S.T. Zhou, D.J. Li, M.R. Du // *Clin Transl Med*. - 2021. - Vol.11, №10. - P. e540.
649. Taub, D.D. Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity / D.D. Taub, T.J. Sayers, C.R. Carter, J.R. Ortaldo // *J Immunol*. - 1995. - Vol.155, №8. - P. 3877-3888.
650. Tauber, Z. The expression patterns of IL-1 $\beta$  and IL-10 and their relation to CYP epoxygenases in normal human placenta / Z. Tauber, K. Chroma, R. Baranova, K. Cizkova // *Ann Anat*. - 2021. - Vol.236. - P. 151671.
651. Tayade, C. Differential transcription of Eomes and T-bet during maturation of mouse uterine natural killer cells / C. Tayade, Y. Fang, G.P. Black, A.P. V, Jr., A. Erlebacher, B.A. Croy // *J Leukoc Biol*. - 2005. - Vol.78, №6. - P. 1347-1355.
652. Templer, S. A blessing and a curse: is high NK cell activity good for health and bad for reproduction? / S. Templer, G. Sacks // *Hum Fertil (Camb)*. - 2016. - Vol.19, №3. - P. 166-172.

653. Thery, C. Membrane vesicles as conveyors of immune responses / C. Thery, M. Ostrowski, E. Segura // *Nat Rev Immunol.* - 2009. - Vol.9, №8. - P. 581-593.
654. Thirkill, T.L. Regulation of trophoblast beta1-integrin expression by contact with endothelial cells / T.L. Thirkill, S.R. Hendren, A. Soghomonians, N.F. Mariano, A.I. Barakat, G.C. Douglas // *Cell Commun Signal.* - 2004. - Vol.2, №1. - P. 4.
655. Thum, M.Y. Prednisolone suppresses NK cell cytotoxicity in vitro in women with a history of infertility and elevated NK cell cytotoxicity / M.Y. Thum, S. Bhaskaran, H.I. Abdalla, B. Ford, N. Sumar, A. Bansal // *Am J Reprod Immunol.* - 2008. - Vol.59, №3. - P. 259-265.
656. Tilburgs, T. The HLA-G cycle provides for both NK tolerance and immunity at the maternal-fetal interface / T. Tilburgs, J.H. Evans, A.C. Crespo, J.L. Strominger // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2015. - Vol.112, №43. - P. 13312-13317.
657. Timonen, T. Participation of CD11a-c/CD18, CD2 and RGD-binding receptors in endogenous and interleukin-2-stimulated NK activity of CD3-negative large granular lymphocytes / T. Timonen, C.G. Gahmberg, M. Patarroyo // *Int J Cancer.* - 1990. - Vol.46, №6. - P. 1035-1040.
658. Tokmadzic, V.S. IL-18 is present at the maternal-fetal interface and enhances cytotoxic activity of decidual lymphocytes / V.S. Tokmadzic, Y. Tsuji, T. Bogovic, G. Laskarin, K. Cupurdija, N. Strbo, K. Koyama, H. Okamura, E.R. Podack, D. Rukavina // *Am J Reprod Immunol.* - 2002. - Vol.48, №4. - P. 191-200.
659. Tomaniak, M. Cell-derived microvesicles in cardiovascular diseases and antiplatelet therapy monitoring - A lesson for future trials? Current evidence, recent progresses and perspectives of clinical application / M. Tomaniak, A. Gasecka, K.J. Filipiak // *Int J Cardiol.* - 2017. - Vol.226. - P. 93-102.
660. Tomura, M. A Critical Role for IL-18 in the Proliferation and Activation of NK1.1<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> Cells / M. Tomura, X.-Y. Zhou, S. Maruo, H.-J. Ahn, T. Hamaoka, H. Okamura, K. Nakanishi, T. Tanimoto, M. Kurimoto, H. Fujiwara // *J Immunol.* - 1998. - Vol.160, №10. - P. 4738-4746.
661. Toth, B. Placental interleukin-15 expression in recurrent miscarriage / B. Toth, T. Haufe, C. Scholz, C. Kuhn, K. Friese, M. Karamouti, A. Makrigiannakis, U. Jeschke // *Am J Reprod Immunol.* - 2010. - Vol.64, №6. - P. 402-410.
662. Townsend, M.J. T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells / M.J. Townsend, A.S. Weinmann, J.L. Matsuda, R. Salomon, P.J. Farnham, C.A. Biron, L. Gapin, L.H. Glimcher // *Immunity.* - 2004. - Vol.20, №4. - P. 477-494.
663. Tsiakkas, A. Serum placental growth factor in the three trimesters of pregnancy: effects of maternal characteristics and medical history / A. Tsiakkas, N. Duvdevani, A. Wright, D. Wright, K.H. Nicolaidis // *Ultrasound Obstet Gynecol.* - 2015. - Vol.45, №5. - P. 591-598.

664. Tufa, D.M. IL-1beta limits the extent of human 6-sulfo LacNAc dendritic cell (slanDC)-mediated NK cell activation and regulates CD95-induced apoptosis / D.M. Tufa, F. Ahmad, D. Chatterjee, G. Ahrenstorf, R.E. Schmidt, R. Jacobs // *Cell Mol Immunol.* - 2017. - Vol.14, №12. - P. 976-985.
665. Turco, M.Y. Trophoblast organoids as a model for maternal-fetal interactions during human placentation / M.Y. Turco, L. Gardner, R.G. Kay, R.S. Hamilton, M. Prater, M.S. Hollinshead, A. McWhinnie, L. Esposito, R. Fernando, H. Skelton, F. Reimann, F.M. Gribble, A. Sharkey, S.G.E. Marsh, S. O'Rahilly, M. Hemberger, G.J. Burton, A. Moffett // *Nature.* - 2018. - Vol.564, №7735. - P. 263-267.
666. Ueda, M. Endovascular trophoblast expresses CD59 to evade complement-dependent cytotoxicity / M. Ueda, Y. Sato, A. Horie, H. Tani, Y. Miyazaki, A. Okunomiya, H. Matsumoto, J. Hamanishi, E. Kondoh, M. Mandai // *Mol Cell Endocrinol.* - 2019. - Vol.490. - P. 57-67.
667. Urlaub, D. LFA-1 Activation in NK Cells and Their Subsets: Influence of Receptors, Maturation, and Cytokine Stimulation / D. Urlaub, K. Hofer, M.L. Muller, C. Watzl // *J Immunol.* - 2017. - Vol.198, №5. - P. 1944-1951.
668. Vacca, P. Regulatory role of NKp44, NKp46, DNAM-1 and NKG2D receptors in the interaction between NK cells and trophoblast cells. Evidence for divergent functional profiles of decidual versus peripheral NK cells / P. Vacca, C. Cantoni, C. Prato, E. Fulcheri, A. Moretta, L. Moretta, M.C. Mingari // *Int Immunol.* - 2008. - Vol.20, №11. - P. 1395-1405.
669. Vacca, P. Heterogeneity of NK Cells and Other Innate Lymphoid Cells in Human and Murine Decidua / P. Vacca, L. Chiossone, M.C. Mingari, L. Moretta // *Front Immunol.* - 2019. - Vol.10. - P. 170.
670. Vacca, P. Identification of diverse innate lymphoid cells in human decidua / P. Vacca, E. Montaldo, D. Croxatto, F. Loiacono, F. Canegallo, P.L. Venturini, L. Moretta, M.C. Mingari // *Mucosal Immunol.* - 2015. - Vol.8, №2. - P. 254-264.
671. Vacca, P. CD34+ hematopoietic precursors are present in human decidua and differentiate into natural killer cells upon interaction with stromal cells / P. Vacca, C. Vitale, E. Montaldo, R. Conte, C. Cantoni, E. Fulcheri, V. Darretta, L. Moretta, M.C. Mingari // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2011. - Vol.108, №6. - P. 2402-2407.
672. Vacca, P. Human Innate Lymphoid Cells: Their Functional and Cellular Interactions in Decidua / P. Vacca, C. Vitale, E. Munari, M.A. Cassatella, M.C. Mingari, L. Moretta // *Front Immunol.* - 2018. - Vol.9. - P. 1897.
673. Vajen, T. Microvesicles from platelets: novel drivers of vascular inflammation / T. Vajen, S.F. Mause, R.R. Koenen // *Thromb Haemost.* - 2015. - Vol.114, №2. - P. 228-236.

674. van Buul, J.D. ICAM-3 activation modulates cell-cell contacts of human bone marrow endothelial cells / J.D. van Buul, F.P. Mul, C.E. van der Schoot, P.L. Hordijk // *J Vasc Res.* - 2004. - Vol.41, №1. - P. 28-37.
675. Van de Walle, I. GATA3 induces human T-cell commitment by restraining Notch activity and repressing NK-cell fate / I. Van de Walle, A.C. Dolens, K. Durinck, K. De Mulder, W. Van Looke, S. Damle, E. Waegemans, J. De Medts, I. Velghe, M. De Smedt, B. Vandekerckhove, T. Kerre, J. Plum, G. Leclercq, E.V. Rothenberg, P. Van Vlierberghe, F. Speleman, T. Taghon // *Nat Commun.* - 2016. - Vol.7. - P. 11171.
676. van der Haar Avila, I. Evaluating Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity by Flow Cytometry / I. van der Haar Avila, P. Marmol, J. Cany, R. Kiessling, Y. Pico de Coana // *Methods Mol Biol.* - 2019. - Vol.1913. - P. 181-194.
677. van der Pol, E. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles / E. van der Pol, A.N. Boing, P. Harrison, A. Sturk, R. Nieuwland // *Pharmacol Rev.* - 2012. - Vol.64, №3. - P. 676-705.
678. van der Pol, E. Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing / E. van der Pol, F.A. Coumans, A.E. Grootemaat, C. Gardiner, I.L. Sargent, P. Harrison, A. Sturk, T.G. van Leeuwen, R. Nieuwland // *J Thromb Haemost.* - 2014. - Vol.12, №7. - P. 1182-1192.
679. van Horssen, R. TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility / R. van Horssen, T.L. Ten Hagen, A.M. Eggermont // *Oncologist.* - 2006. - Vol.11, №4. - P. 397-408.
680. van Mourik, M.S. Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment / M.S. van Mourik, N.S. Macklon, C.J. Heijnen // *J Leukoc Biol.* - 2009. - Vol.85, №1. - P. 4-19.
681. van Niel, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles / G. van Niel, G. D'Angelo, G. Raposo // *Nat Rev Mol Cell Biol.* - 2018. - Vol.19, №4. - P. 213-228.
682. Vaporciyan, A.A. Rapid analysis of leukocyte-endothelial adhesion / A.A. Vaporciyan, M.L. Jones, P.A. Ward // *J Immunol Methods.* - 1993. - Vol.159, №1-2. - P. 93-100.
683. Veenstra van Nieuwenhoven, A.L. Cytokine production in natural killer cells and lymphocytes in pregnant women compared with women in the follicular phase of the ovarian cycle / A.L. Veenstra van Nieuwenhoven, A. Bouman, H. Moes, M.J. Heineman, L.F. de Leij, J. Santema, M.M. Faas // *Fertil Steril.* - 2002. - Vol.77, №5. - P. 1032-1037.
684. Veluchamy, J.P. Standardized and flexible eight colour flow cytometry panels harmonized between different laboratories to study human NK cell phenotype and function / J.P.

- Veluchamy, M. Delso-Vallejo, N. Kok, F. Bohme, R. Seggewiss-Bernhardt, H.J. van der Vliet, T.D. de Gruijl, V. Huppert, J. Spanholtz // *Sci Rep.* - 2017. - Vol.7. - P. 43873.
685. Vento-Tormo, R. Single-cell reconstruction of the early maternal-fetal interface in humans / R. Vento-Tormo, M. Efremova, R.A. Botting, M.Y. Turco, M. Vento-Tormo, K.B. Meyer, J.E. Park, E. Stephenson, K. Polanski, A. Goncalves, L. Gardner, S. Holmqvist, J. Henriksson, A. Zou, A.M. Sharkey, B. Millar, B. Innes, L. Wood, A. Wilbrey-Clark, R.P. Payne, M.A. Ivarsson, S. Lisgo, A. Filby, D.H. Rowitch, J.N. Bulmer, G.J. Wright, M.J.T. Stubbington, M. Haniffa, A. Moffett, S.A. Teichmann // *Nature.* - 2018. - Vol.563, №7731. - P. 347-353.
686. Verma, S. Human decidual natural killer cells express the receptor for and respond to the cytokine interleukin 15 / S. Verma, S.E. Hiby, Y.W. Loke, A. King // *Biol Reprod.* - 2000. - Vol.62, №4. - P. 959-968.
687. Verron, Q. NK cells integrate signals over large areas when building immune synapses but require local stimuli for degranulation / Q. Verron, E. Forslund, L. Brandt, M. Leino, T.W. Frisk, P.E. Olofsson, B. Onfelt // *Sci Signal.* - 2021. - Vol.14, №684. - P. eabe2740.
688. Veters, J. The ubiquitin-editing enzyme A20 controls NK cell homeostasis through regulation of mTOR activity and TNF / J. Veters, M.J. van Helden, S. Wahlen, S.J. Tavernier, A. Martens, F. Fayazpour, K. Vergote, M. Vanheerswynghels, K. Deswarte, J. Van Moorlegghem, S. De Prijck, N. Takahashi, P. Vandenabeele, L. Boon, G. van Loo, E. Vivier, B.N. Lambrecht, S. Janssens // *J Exp Med.* - 2019. - Vol.216, №9. - P. 2010-2023.
689. Victor, A.R. Epigenetic and Posttranscriptional Regulation of CD16 Expression during Human NK Cell Development / A.R. Victor, C. Weigel, S.D. Scoville, W.K. Chan, K. Chatman, M.M. Nemer, C. Mao, K.A. Young, J. Zhang, J. Yu, A.G. Freud, C.C. Oakes, M.A. Caligiuri // *J Immunol.* - 2018. - Vol.200, №2. - P. 565-572.
690. Vivier, E. Functions of natural killer cells / E. Vivier, E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer, S. Ugolini // *Nat Immunol.* - 2008. - Vol.9, №5. - P. 503-510.
691. Volchek, M. Lymphatics in the human endometrium disappear during decidualization / M. Volchek, J.E. Girling, G.E. Lash, L. Cann, B. Kumar, S.C. Robson, J.N. Bulmer, P.A. Rogers // *Hum Reprod.* - 2010. - Vol.25, №10. - P. 2455-2464.
692. Von Woon, E. Number and function of uterine natural killer cells in recurrent miscarriage and implantation failure: a systematic review and meta-analysis / E. Von Woon, O. Greer, N. Shah, D. Nikolaou, M. Johnson, V. Male // *Hum Reprod Update.* - 2022. - Vol.28, №4. - P. 548-582.
693. Vong, Q.P. TOX2 regulates human natural killer cell development by controlling T-BET expression / Q.P. Vong, W.H. Leung, J. Houston, Y. Li, B. Rooney, M. Holladay, R.A. Oostendorp, W. Leung // *Blood.* - 2014. - Vol.124, №26. - P. 3905-3913.

694. Voskoboinik, I. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology / I. Voskoboinik, J.C. Whisstock, J.A. Trapani // *Nat Rev Immunol.* - 2015. - Vol.15, №6. - P. 388-400.
695. Vosshenrich, C.A. Roles for common cytokine receptor gamma-chain-dependent cytokines in the generation, differentiation, and maturation of NK cell precursors and peripheral NK cells in vivo / C.A. Vosshenrich, T. Ranson, S.I. Samson, E. Corcuff, F. Colucci, E.E. Rosmaraki, J.P. Di Santo // *J Immunol.* - 2005. - Vol.174, №3. - P. 1213-1221.
696. Vulpis, E. Impact on NK cell functions of acute versus chronic exposure to extracellular vesicle-associated MICA: Dual role in cancer immunosurveillance / E. Vulpis, L. Loconte, A. Peri, R. Molfetta, G. Caracciolo, L. Masuelli, L. Tomaipitnca, G. Peruzzi, S. Petillo, M.T. Petrucci, F. Fazio, L. Simonelli, C. Fionda, A. Soriani, C. Cerboni, M. Cippitelli, R. Paolini, G. Bernardini, G. Palmieri, A. Santoni, A. Zingoni // *J Extracell Vesicles.* - 2022. - Vol.11, №1. - P. e12176.
697. Wallace, A.E. Extravillous trophoblast and decidual natural killer cells: a remodelling partnership / A.E. Wallace, R. Fraser, J.E. Cartwright // *Hum Reprod Update.* - 2012. - Vol.18, №4. - P. 458-471.
698. Wang, F. Biology and pathology of the uterine microenvironment and its natural killer cells / F. Wang, A.E. Qualls, L. Marques-Fernandez, F. Colucci // *Cell Mol Immunol.* - 2021. - Vol.18, №9. - P. 2101-2113.
699. Wang, F. Effects of human chorionic gonadotropin, estradiol, and progesterone on interleukin-18 expression in human decidual tissues / F. Wang, H. Zhu, B. Li, M. Liu, D. Liu, M. Deng, Y. Wang, X. Xia, Q. Jiang, D. Chen // *Gynecol Endocrinol.* - 2017. - Vol.33, №4. - P. 265-269.
700. Wang, H. Important role for Nkp30 in synapse formation and activation of NK cells / H. Wang, X. Zheng, H. Wei, Z. Tian, R. Sun // *Immunol Invest.* - 2012. - Vol.41, №4. - P. 367-381.
701. Wang, P. Unique metabolism and protein expression signature in human decidual NK cells / P. Wang, T. Liang, H. Zhan, M. Zhu, M. Wu, L. Qian, Y. Zhou, F. Ni // *Front Immunol.* - 2023. - Vol.14. - P. 1136652.
702. Wang, R. Natural killer cell-produced IFN-gamma and TNF-alpha induce target cell cytotoxicity through up-regulation of ICAM-1 / R. Wang, J.J. Jaw, N.C. Stutzman, Z. Zou, P.D. Sun // *J Leukoc Biol.* - 2012. - Vol.91, №2. - P. 299-309.
703. Wang, S. Recurrent miscarriage is associated with a decline of decidual natural killer cells expressing killer cell immunoglobulin-like receptors specific for human leukocyte antigen C / S. Wang, Y.P. Li, B. Ding, Y.R. Zhao, Z.J. Chen, C.Y. Xu, Y.B. Fu, X.T. Wang // *J Obstet Gynaecol Res.* - 2014. - Vol.40, №5. - P. 1288-1295.
704. Wang, W.J. Overview of serpin B9 and its roles in cancer (Review) / W.J. Wang, J. Wang, C. Ouyang, C. Chen, X.F. Xu, X.Q. Ye // *Oncol Rep.* - 2021. - Vol.46, №3. - P. 190.



705. Wang, X.Q. Trophoblast-derived CXCL16 induces M2 macrophage polarization that in turn inactivates NK cells at the maternal-fetal interface / X.Q. Wang, W.J. Zhou, X.X. Hou, Q. Fu, D.J. Li // *Cell Mol Immunol.* - 2018. - Vol.15, №12. - P. 1038-1046.
706. Wang, Z. IL-10 Enhances Human Natural Killer Cell Effector Functions via Metabolic Reprogramming Regulated by mTORC1 Signaling / Z. Wang, D. Guan, J. Huo, S.K. Biswas, Y. Huang, Y. Yang, S. Xu, K.P. Lam // *Front Immunol.* - 2021. - Vol.12. - P. 619195.
707. Waters, W.R. Five-color flow cytometric analysis of swine lymphocytes for detection of proliferation, apoptosis, viability, and phenotype / W.R. Waters, K.R. Harkins, M.J. Wannemuehler // *Cytometry.* - 2002. - Vol.48, №3. - P. 146-152.
708. Watt, W. The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis / W. Watt, K.A. Koeplinger, A.M. Mildner, R.L. Heinrikson, A.G. Tomasselli, K.D. Watenpaugh // *Structure.* - 1999. - Vol.7, №9. - P. 1135-1143.
709. Wei, B.R. Increased resistance to apoptosis during differentiation and syncytialization of BeWo choriocarcinoma cells / B.R. Wei, C. Xu, N.S. Rote // *Adv Biosci Biotechnol.* - 2012. - Vol.3, №6A. - P. 805-813.
710. Wei, J. Effect of sera on the adhesion of natural killer cells to the endothelium in severe preeclampsia / J. Wei, M. Satomi, Y. Negishi, Y. Matsumura, A. Miura, Y. Nishi, H. Asakura, T. Takeshita // *J Obstet Gynaecol Res.* - 2006. - Vol.32, №5. - P. 443-448.
711. Wei, X. The central role of natural killer cells in preeclampsia / X. Wei, X. Yang // *Front Immunol.* - 2023. - Vol.14. - P. 1009867.
712. Weiss, I.D. Ccr5 deficiency regulates the proliferation and trafficking of natural killer cells under physiological conditions / I.D. Weiss, H. Shoham, O. Wald, H. Wald, K. Beider, M. Abraham, N. Barashi, E. Galun, A. Nagler, A. Peled // *Cytokine.* - 2011. - Vol.54, №3. - P. 249-257.
713. Weitzner, O. Enhanced expression of alphaVbeta3 integrin in villus and extravillous trophoblasts of placenta accreta / O. Weitzner, C. Seraya-Bareket, T. Biron-Shental, A. Fishamn, Y. Yagur, K. Tzadikvitch-Geffen, S. Farladansky-Gershnel, D. Kidron, M. Ellis, O. Ashur-Fabian // *Arch Gynecol Obstet.* - 2021. - Vol.303, №5. - P. 1175-1183.
714. Whettlock, E.M. Dynamic Changes in Uterine NK Cell Subset Frequency and Function Over the Menstrual Cycle and Pregnancy / E.M. Whettlock, E.V. Woon, A.O. Cuff, B. Browne, M.R. Johnson, V. Male // *Front Immunol.* - 2022. - Vol.13. - P. 880438.
715. Wilczynski, J.R. Th1/Th2 cytokines balance--yin and yang of reproductive immunology / J.R. Wilczynski // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* - 2005. - Vol.122, №2. - P. 136-143.

716. Williams, P.J. Decidual leucocyte populations in early to late gestation normal human pregnancy / P.J. Williams, R.F. Searle, S.C. Robson, B.A. Innes, J.N. Bulmer // *J Reprod Immunol.* - 2009. - Vol.82, №1. - P. 24-31.
717. Windsperger, K. Extravillous trophoblast invasion of venous as well as lymphatic vessels is altered in idiopathic, recurrent, spontaneous abortions / K. Windsperger, S. Dekan, S. Pils, C. Golletz, V. Kunihs, C. Fiala, G. Kristiansen, M. Knofler, J. Pollheimer // *Hum Reprod.* - 2017. - Vol.32, №6. - P. 1208-1217.
718. Wolfarth, A.A. Advancements of Common Gamma-Chain Family Cytokines in Cancer Immunotherapy / A.A. Wolfarth, S. Dhar, J.B. Goon, U.I. Ezeanya, S. Ferrando-Martinez, B.H. Lee // *Immune Netw.* - 2022. - Vol.22, №1. - P. e5.
719. Wu, C.H. Extracellular vesicles derived from natural killer cells use multiple cytotoxic proteins and killing mechanisms to target cancer cells / C.H. Wu, J. Li, L. Li, J. Sun, M. Fabbri, A.S. Wayne, R.C. Seeger, A.Y. Jong // *J Extracell Vesicles.* - 2019. - Vol.8, №1. - P. 1588538.
720. Wu, J. IL-6 and IL-8 secreted by tumour cells impair the function of NK cells via the STAT3 pathway in oesophageal squamous cell carcinoma / J. Wu, F.X. Gao, C. Wang, M. Qin, F. Han, T. Xu, Z. Hu, Y. Long, X.M. He, X. Deng, D.L. Ren, T.Y. Dai // *J Exp Clin Cancer Res.* - 2019. - Vol.38, №1. - P. 321.
721. Wu, P.H. Activation of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor gene expression following DNA demethylation in placental choriocarcinoma and transformed cell lines / P.H. Wu, X.M. Chen, X.Q. Liu, J.L. He, Q. Feng, X. Lan, X. Zhang, Y.Q. Geng, Y.X. Wang, Y.B. Ding // *Reprod Fertil Dev.* - 2015. - Vol.28, №11. - P. 1844-1853.
722. Wu, X. The expression of CXCR4/CXCL12 in first-trimester human trophoblast cells / X. Wu, D.J. Li, M.M. Yuan, Y. Zhu, M.Y. Wang // *Biol Reprod.* - 2004. - Vol.70, №6. - P. 1877-1885.
723. Wu, Y. Developmental and Functional Control of Natural Killer Cells by Cytokines / Y. Wu, Z. Tian, H. Wei // *Front Immunol.* - 2017. - Vol.8. - P. 930.
724. Wu, Z. Pro-Inflammatory Signature in Decidua of Recurrent Pregnancy Loss Regardless of Embryonic Chromosomal Abnormalities / Z. Wu, M. Wang, G. Liang, P. Jin, P. Wang, Y. Xu, Y. Qian, X. Jiang, J. Qian, M. Dong // *Front Immunol.* - 2021. - Vol.12. - P. 772729.
725. Xiang, L. Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor have differential, cell-type specific patterns of expression in vascular cells / L. Xiang, R. Varshney, N.A. Rashdan, J.H. Shaw, P.G. Lloyd // *Microcirculation.* - 2014. - Vol.21, №5. - P. 368-379.
726. Xiong, S. Maternal uterine NK cell-activating receptor KIR2DS1 enhances placentation / S. Xiong, A.M. Sharkey, P.R. Kennedy, L. Gardner, L.E. Farrell, O. Chazara, J. Bauer, S.E. Hiby, F. Colucci, A. Moffett // *J Clin Invest.* - 2013. - Vol.123, №10. - P. 4264-4272.

727. Xiu, W. CXCL9 secreted by tumor-associated dendritic cells up-regulates PD-L1 expression in bladder cancer cells by activating the CXCR3 signaling / W. Xiu, J. Luo // *BMC Immunol.* - 2021. - Vol.22, №1. - P. 1-3.
728. Xu, B. Galectin-1-Related Modulation of Trophoblast Endothelial Interactions by Integrins alpha1 and beta1 / B. Xu, R. Shanmugalingam, K. Chau, A. Makris, A. Hennessy // *Reprod Sci.* - 2020. - Vol.27, №5. - P. 1097-1109.
729. Xu, G. Control of proliferation, migration, and invasiveness of human extravillous trophoblast by decorin, a decidual product / G. Xu, M.J. Guimond, C. Chakraborty, P.K. Lala // *Biol Reprod.* - 2002. - Vol.67, №2. - P. 681-689.
730. Xu, J. Essential role of the TNF-TNFR2 cognate interaction in mouse dendritic cell-natural killer cell crosstalk / J. Xu, A.K. Chakrabarti, J.L. Tan, L. Ge, A. Gambotto, N.L. Vujanovic // *Blood.* - 2007. - Vol.109, №8. - P. 3333-3341.
731. Xu, J. Reduced CD200 expression is associated with altered Th1/Th2 cytokine production in placental trophoblasts from preeclampsia / J. Xu, Y. Gu, J. Sun, H. Zhu, D.F. Lewis, Y. Wang // *Am J Reprod Immunol.* - 2018. - Vol.79, №1. - P. 1-15.
732. Xu, R. Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application / R. Xu, D.W. Greening, H.J. Zhu, N. Takahashi, R.J. Simpson // *J Clin Invest.* - 2016. - Vol.126, №4. - P. 1152-1162.
733. Xu, X. TGF-beta1 improving abnormal pregnancy outcomes induced by *Toxoplasma gondii* infection: Regulating NKG2D/DAP10 and killer subset of decidual NK cells / X. Xu, J. Zhang, S. Zhan, Z. Li, X. Liu, H. Zhang, Y. Jiang, X. Hu // *Cell Immunol.* - 2017. - Vol.317. - P. 9-17.
734. Xu, X. Uterine NK cell functions at maternal-fetal interfacedagger / X. Xu, Y. Zhou, B. Fu, H. Wei // *Biol Reprod.* - 2022. - Vol.107, №1. - P. 327-338.
735. Xu, Y. Innate lymphoid cells at the human maternal-fetal interface in spontaneous preterm labor / Y. Xu, R. Romero, D. Miller, P. Silva, B. Panaitescu, K.R. Theis, A. Arif, S.S. Hassan, N. Gomez-Lopez // *Am J Reprod Immunol.* - 2018. - Vol.79, №6. - P. e12820.
736. Xuan, Y.H. Expression of TGF-beta signaling proteins in normal placenta and gestational trophoblastic disease / Y.H. Xuan, Y.L. Choi, Y.K. Shin, G.H. Ahn, K.H. Kim, W.J. Kim, H.C. Lee, S.H. Kim // *Histol Histopathol.* - 2007. - Vol.22, №3. - P. 227-234.
737. Yamaguchi, T. Potential selectin L ligands involved in selective recruitment of peripheral blood CD16(-) natural killer cells into human endometrium / T. Yamaguchi, K. Kitaya, N. Daikoku, T. Yasuo, S. Fushiki, H. Honjo // *Biol Reprod.* - 2006. - Vol.74, №1. - P. 35-40.
738. Yang, B. Blocking transforming growth factor-beta signaling pathway augments antitumor effect of adoptive NK-92 cell therapy / B. Yang, H. Liu, W. Shi, Z. Wang, S. Sun, G. Zhang, Y. Hu, T. Liu, S. Jiao // *Int Immunopharmacol.* - 2013. - Vol.17, №2. - P. 198-204.

739. Yang, H.L. Decidual stromal cells promote the differentiation of CD56(bright) CD16(-) NK cells by secreting IL-24 in early pregnancy / H.L. Yang, W.J. Zhou, H. Lu, S.T. Lei, S.Y. Ha, Z.Z. Lai, Z.M. Zheng, L.Y. Ruan, Y.Y. He, D.J. Li, M.Q. Li, J. Shao // *Am J Reprod Immunol.* - 2019. - Vol.81, №6. - P. e13110.
740. Yang, S.L. Kynurenine promotes the cytotoxicity of NK cells through aryl hydrocarbon receptor in early pregnancy / S.L. Yang, H.X. Tan, T.T. Niu, D.J. Li, H.Y. Wang, M.Q. Li // *J Reprod Immunol.* - 2021. - Vol.143. - P. 103270.
741. Yang, Y. TNFR2: Role in Cancer Immunology and Immunotherapy / Y. Yang, M.S. Islam, Y. Hu, X. Chen // *Immunotargets Ther.* - 2021. - Vol.10. - P. 103-122.
742. Yao, X. Chemokine networks modulating natural killer cell trafficking to solid tumors / X. Yao, S. Matosevic // *Cytokine Growth Factor Rev.* - 2021. - Vol.59. - P. 36-45.
743. Ye, W. Adenosine A3 Receptor Mediates ERK1/2- and JNK-Dependent TNF-alpha Production in Toxoplasma gondii-Infected HTR8/SVneo Human Extravillous Trophoblast Cells / W. Ye, J. Sun, C. Li, X. Fan, F. Gong, X. Huang, M. Deng, J.Q. Chu // *Korean J Parasitol.* - 2020. - Vol.58, №4. - P. 393-402.
744. Yi, Y. TGF-beta1 inhibits human trophoblast cell invasion by upregulating cyclooxygenase-2 / Y. Yi, J.C. Cheng, C. Klausen, P.C.K. Leung // *Placenta.* - 2018. - Vol.68. - P. 44-51.
745. Yi, Y. Transcription factor SOX4 facilitates BMP2-regulated gene expression during invasive trophoblast differentiation / Y. Yi, H. Zhu, C. Klausen, P.C.K. Leung // *FASEB J.* - 2021. - Vol.35, №12. - P. e22028.
746. Yin, N. IL-27 activates human trophoblasts to express IP-10 and IL-6: implications in the immunopathophysiology of preeclampsia / N. Yin, H. Zhang, X. Luo, Y. Ding, X. Xiao, X. Liu, N. Shan, X. Zhang, Q. Deng, B. Zhuang, H. Qi // *Mediators Inflamm.* - 2014. - Vol.2014. - P. 926875.
747. Yoshida, Y. Phenotypic Characterization by Single-Cell Mass Cytometry of Human Intrahepatic and Peripheral NK Cells in Patients with Hepatocellular Carcinoma / Y. Yoshida, S. Yoshio, T. Yamazoe, T. Mori, Y. Tsustui, H. Kawai, S. Yoshikawa, T. Fukuhara, T. Okamoto, Y. Ono, Y. Takahashi, R. Hashida, T. Kawaguchi, A. Taketomi, T. Kanto // *Cells.* - 2021. - Vol.10, №6. - P. 1495.
748. You, Y. TNF-alpha Regulated Endometrial Stroma Secretome Promotes Trophoblast Invasion / Y. You, P. Stelzl, D.N. Joseph, P.B. Aldo, A.J. Maxwell, N. Dekel, A. Liao, S. Whirledge, G. Mor // *Front Immunol.* - 2021. - Vol.12. - P. 737401.
749. Yu, H. MST4 Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition of Choriocarcinoma by Mediating TGF-beta1 Expression / H. Yu, W. Zhang, P. Han, B. Yang, X. Feng, P. Zhou, X. Zhu, B. Zhou, W. Chen, J. Qian, J. Yu // *Onco Targets Ther.* - 2020. - Vol.13. - P. 11935-11946.

750. Yu, H.F. Bmp2 regulates Serpinb6b expression via cAMP/PKA/Wnt4 pathway during uterine decidualization / H.F. Yu, L.W. Zheng, Z.Q. Yang, Y.S. Wang, J.C. Huang, S. Liu, Z.P. Yue, B. Guo // *J Cell Mol Med.* - 2020. - Vol.24, №12. - P. 7023-7033.
751. Yu, J. Location and cellular stages of natural killer cell development / J. Yu, A.G. Freud, M.A. Caligiuri // *Trends Immunol.* - 2013. - Vol.34, №12. - P. 573-582.
752. Yu, M. Influence of reverse signaling via membrane TNF-alpha on cytotoxicity of NK92 cells / M. Yu, W. Shi, J. Zhang, L. Niu, Q. Chen, D. Yan, T. Liu, W. Jing, X. Jiang, F. Wei, B. Yin, W. Zhang, Q. Li, Z. Li // *Eur J Cell Biol.* - 2009. - Vol.88, №3. - P. 181-191.
753. Yu, X. Expression and localization of tumor necrosis factor receptor 1 protein in the chorionic villi in early normal and spontaneous abortion / X. Yu, L. Wang, C. Yan, X. Li // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* - 2007. - Vol.132, №1. - P. 58-63.
754. Zamora, A.E. Licensing delineates helper and effector NK cell subsets during viral infection / A.E. Zamora, E.G. Aguilar, C.M. Sungur, L.T. Khuat, C. Dunai, G.R. Lochhead, J. Du, C. Pomeroy, B.R. Blazar, D.L. Longo, J.M. Venstrom, N. Baumgarth, W.J. Murphy // *JCI Insight.* - 2017. - Vol.2, №10. - P. e87032.
755. Zelova, H. TNF-alpha signalling and inflammation: interactions between old acquaintances / H. Zelova, J. Hosek // *Inflamm Res.* - 2013. - Vol.62, №7. - P. 641-651.
756. Zhang, C. NK cell subsets in autoimmune diseases / C. Zhang, Z. Tian // *J Autoimmun.* - 2017. - Vol.83. - P. 22-30.
757. Zhang, J. IL-4 potentiates activated T cell apoptosis via an IL-2-dependent mechanism / J. Zhang, T. Bardos, Q. Shao, J. Tschopp, K. Mikecz, T.T. Glant, A. Finnegan // *J Immunol.* - 2003. - Vol.170, №7. - P. 3495-3503.
758. Zhang, J. Unusual timing of CD127 expression by mouse uterine natural killer cells / J. Zhang, Z. Chen, J.H. Fritz, Y. Rochman, W.J. Leonard, J.L. Gommerman, A.W. Plumb, N. Abraham, B.A. Croy // *J Leukoc Biol.* - 2012. - Vol.91, №3. - P. 417-426.
759. Zhang, J. To serve and to protect: the role of decidual innate immune cells on human pregnancy / J. Zhang, C. Dunk, A.B. Croy, S.J. Lye // *Cell Tissue Res.* - 2016. - Vol.363, №1. - P. 249-265.
760. Zhang, J. Human dNK cell function is differentially regulated by extrinsic cellular engagement and intrinsic activating receptors in first and second trimester pregnancy / J. Zhang, C.E. Dunk, M. Kwan, R.L. Jones, L.K. Harris, S. Keating, S.J. Lye // *Cell Mol Immunol.* - 2017. - Vol.14, №2. - P. 203-213.
761. Zhang, J. Specific immunotherapy generates CD8(+) CD196(+) T cells to suppress lung cancer growth in mice / J. Zhang, J. Liu, H. Chen, W. Wu, X. Li, Y. Wu, Z. Wang, K. Zhang, Y. Li, Y. Weng, H. Liao, L. Gu // *Immunol Res.* - 2016. - Vol.64, №4. - P. 1033-1040.

762. Zhang, J. Characterization of interleukin-15 gene-modified human natural killer cells: implications for adoptive cellular immunotherapy / J. Zhang, R. Sun, H. Wei, J. Zhang, Z. Tian // *Haematologica*. - 2004. - Vol.89, №3. - P. 338-347.
763. Zhang, W. Atrial natriuretic peptide promotes uterine decidualization and a TRAIL-dependent mechanism in spiral artery remodeling / W. Zhang, S. Li, J. Lou, H. Li, M. Liu, N. Dong, Q. Wu // *J Clin Invest*. - 2021. - Vol.131, №20. - P. 1-11.
764. Zhang, X. Role of Decidual Natural Killer Cells in Human Pregnancy and Related Pregnancy Complications / X. Zhang, H. Wei // *Front Immunol*. - 2021. - Vol.12. - P. 728291.
765. Zhang, Y. CD58 Immunobiology at a Glance / Y. Zhang, Q. Liu, S. Yang, Q. Liao // *Front Immunol*. - 2021. - Vol.12. - P. 705260.
766. Zhang, Y. Increased Peripheral NKG2A-NKG2D+CD3-CD16+CD56dim NK Cell Subset Was Positively Correlated with Antiphospholipid Antibodies in Patients of Obstetric Antiphospholipid Syndrome / Y. Zhang, Y. Zhao, W. Si, B. Yang, M. Lin, J. Zheng, L. Cui // *Immunol Invest*. - 2022. - Vol.51, №2. - P. 425-437.
767. Zhang, Y.E. Non-Smad Signaling Pathways of the TGF-beta Family / Y.E. Zhang // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. - 2017. - Vol.9, №2. - P. a022129.
768. Zhao, H. Unique roles of infiltrating myeloid cells in the murine uterus during early to midpregnancy / H. Zhao, F. Kalish, S. Schulz, Y. Yang, R.J. Wong, D.K. Stevenson // *J Immunol*. - 2015. - Vol.194, №8. - P. 3713-3722.
769. Zhao, L. NK cells modulate T cell responses via interaction with dendritic cells in *Chlamydomyces pneumoniae* infection / L. Zhao, H. Wang, R. Thomas, X. Gao, H. Bai, S. Shekhar, S. Wang, J. Yang, W. Zhao, X. Yang // *Cell Immunol*. - 2020. - Vol.353. - P. 104132.
770. Zhao, M.R. Dual effect of transforming growth factor beta1 on cell adhesion and invasion in human placenta trophoblast cells / M.R. Zhao, W. Qiu, Y.X. Li, Z.B. Zhang, D. Li, Y.L. Wang // *Reproduction*. - 2006. - Vol.132, №2. - P. 333-341.
771. Zheng, J. Pigment epithelium-derived factor, a novel decidual natural killer cells-derived factor, protects decidual stromal cells via anti-inflammation and anti-apoptosis in early pregnancy / J. Zheng, Y. Li, Y. Sang, L. Xu, X. Jin, Y. Tao, D. Li, M. Du // *Hum Reprod*. - 2020. - Vol.35, №7. - P. 1537-1552.
772. Zhou, Y. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? / Y. Zhou, S.J. Fisher, M. Janatpour, O. Genbacev, E. Dejana, M. Wheelock, C.H. Damsky // *J Clin Invest*. - 1997. - Vol.99, №9. - P. 2139-2151.
773. Zhu, L. Changes of NK cell subsets with time post-transplant in peripheral blood of renal transplant recipients / L. Zhu, M. Aly, H. Wang, H. Karakizlis, R. Weimer, C. Morath, R.J.

- Kuon, B. Toth, N. Ekpoom, G. Opelz, V. Daniel // *Transpl Immunol.* - 2018. - Vol.49. - P. 59-71.
774. Zhu, L. Enhancement of antitumor potency of extracellular vesicles derived from natural killer cells by IL-15 priming / L. Zhu, S. Kalimuthu, J.M. Oh, P. Gangadaran, S.H. Baek, S.Y. Jeong, S.W. Lee, J. Lee, B.C. Ahn // *Biomaterials.* - 2019. - Vol.190-191. - P. 38-50.
775. Zhu, L. Circulating NKG2A-NKG2D<sup>+</sup> CD56dimCD16<sup>+</sup> Natural Killer (NK) Cells as Mediators of Functional Immunosurveillance in Kidney Transplant Recipients / L. Zhu, H. Karakizlis, R. Weimer, C. Morath, N. Ekpoom, E.H. Ibrahim, G. Opelz, V. Daniel // *Ann Transplant.* - 2020. - Vol.25. - P. e925162.
776. Zhu, S. Activin A increases human trophoblast invasion by upregulating integrin beta1 through ALK4 / S. Zhu, Z. Li, L. Cui, Y. Ban, P.C.K. Leung, Y. Li, J. Ma // *FASEB J.* - 2021. - Vol.35, №2. - P. e21220.
777. Zybina, T.G. Role of cell cycling and polyploidy in placental trophoblast of different mammalian species / T.G. Zybina, E.V. Zybina // *Reprod Domest Anim.* - 2020. - Vol.55, №8. - P. 895-904.
778. Zygmunt, M. Invasion of cytotrophoblastic (JEG-3) cells is up-regulated by interleukin-15 in vitro / M. Zygmunt, D. Hahn, N. Kiesenbauer, K. Munstedt, U. Lang // *Am J Reprod Immunol.* - 1998. - Vol.40, №5. - P. 326-331.