

**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**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Санкт-Петербург  
2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении "Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта" Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

**Научные консультанты:**

**Соколов Дмитрий Игоревич** - доктор биологических наук, доцент

**Сельков Сергей Алексеевич** - доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ

**Официальные оппоненты:**

1. **Самойлович Марина Платоновна** - доктор биологических наук, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории гибридной технологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

2. **Кречетова Любовь Валентиновна** – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией клинической иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

3. **Козлов Иван Генрихович** – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры организации и управления в сфере обращения лекарственных средств Института последипломного образования Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение "Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 202 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 24.1.158.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197002, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр., д. 69-71.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197002, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12 и на сайте <https://iemsrb.ru/science/diss/diss001-022-02/>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 202 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета 24.1.158.01  
доктор биологических наук

Алешина Галина Матвеевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**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 [Тетруашвили Н.К. и др., 2022]. Частота ПНБ в популяции составляет 1-5% от числа всех беременностей [Тетруашвили Н.К. и др., 2022], при этом в общей структуре невынашивания беременности частота ПНБ достигает по разным оценкам от 5 до 25% [El Nacheh H. et al., 2017, Агнаева А.О. и др., 2017, Ali S.B. et al., 2018, Батрак Н.В. и др., 2020]. Адекватная трансформация эндометрия, внедрение в него бластоцисты с последующей инвазией клеток трофобласта плодного происхождения обеспечивают формирование плаценты и физиологическое течение беременности [Sharma S. et al., 2016, James J.L. et al., 2022]. 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 [Gaynor L.M. et al., 2017, Liu S. et al., 2017, de Mendonca Vieira R. et al., 2020, Wang F. et al., 2021, Du M. et al., 2022, Xu X. et al., 2022]. Иммуногистохимические исследования подтверждают близкую локализацию NK-клеток и клеток экстравиллезного трофобласта [Anacker J. et al., 2011, Choudhury R.H. et al., 2017, Choudhury R.H. et al., 2019]. Секреторные факторы, синтезируемые децидуальными (d)NK-клетками, регулируют инвазию клеток трофобласта *in vitro* [Ma L. et al., 2017, Jia N. et al., 2020]. Сниженное содержание NK-клеток в децидуальной оболочке ассоциировано с патологическим вращением плаценты [El-Badawy O. et al., 2023]. Отмечают, что иммунологические факторы, в том числе дисфункция dNK-клеток, могут являться одной из причин повторных потерь беременности [Fukui A. et al., 2015, Агнаева А.О. и др., 2017, Тетруашвили Н.К., 2017, Ali S.B. et al., 2018, Аржанова О.Н. и др., 2019].

Согласно общепринятой точке зрения, физиологическое развитие беременности сопровождается снижением цитотоксической активности NK-клеток [Liu Y. et al., 2021, Zhang X. et al., 2021]. В то же время dNK-клетки экспрессируют как ингибирующие, так и активирующие цитотоксическую активность рецепторы [Takahashi H. et al., 2018, Liu Y. et al., 2021, Liu T. et al., 2022]. 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 [Von Woon E. et al., 2022]. 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 [Kniotek M. et al., 2021]. По другим данным при ПНБ снижено количество dNK-клеток с регуляторным фенотипом CD56<sup>bright</sup>, а также синтез ими цитокинов [Liu H. et al., 2021, Tao Y. et al., 2021]. При ПНБ dNK-клетки характеризуются повышенной экспрессией гранзима В (GrzB), перфорина, и гранулизина, с чем связывают их повышенную цитотоксическую активность [Nakashima A. et al., 2012, Sotnikova N. et al., 2014, Li H. et al., 2019]. Предпринимаются попытки разработать подходы к определению рисков

развития невынашивания беременности на основе оценки изменений функциональной активности NK-клеток [Templer S. et al., 2016]. 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 [Sojka D.K. et al., 2018, Mahajan D. et al., 2022, Xu X. et al., 2022]. 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 [Arutyunyan A. et al., 2023]. Показано, что культивирование dNK-клеток с клетками трофобласта линии HTR-8 стимулировало миграционную активность последних [Jia N. et al., 2020]. Блокирование хемокина CXCL12, секретлируемого клетками трофобласта, подавляло экспрессию адгезионных рецепторов NK-клеток с фенотипом CD56<sup>bright</sup> [Lu H. et al., 2020]. 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 с 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 [Montaldo E. et al., 2013, Sivori S. et al., 2019, Meza Guzman L.G. et al., 2020], а также рецепторов адгезии [Urlaub D. et al., 2017] и цитокиновых рецепторов [Konjevic G.M. et al., 2019]. Описаны основные этапы формирования NK-клеткой иммунологического синапса с потенциальной клеткой-мишенью и возможные варианты реализации естественными киллерами цитотоксической активности [Mace E.M. et al., 2014]. Традиционно dNK-клетки рассматривают, как регуляторные клетки, обладающие сниженной цитотоксичностью [Zhang J. et al., 2016, Liu S. et al., 2017, Rao V.A. et al., 2023]. 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 [Choudhury R.H. et al., 2017, Choudhury R.H. et al., 2019, Kniotek M. et al., 2021, Tao Y. et al., 2021]. Продемонстрировано, что dNK-клетки продуцируют цитокины IFN $\gamma$ , VEGF, PLGF, IP-10 [Hanna J. et al., 2006, Chen C.P. et al., 2015, Jia N. et al., 2020], которые в модели *in vitro*

регулируют инвазию клеток трофобласта и ангиогенез [Hu Y. et al., 2006, Jia N. et al., 2020].

В исследованиях роли естественных киллеров в развитии репродуктивных патологий, как правило, оценивают количество НК-клеток, в ряде случаев дополняя описание отдельными фенотипическими маркерами, генотипированием материала [Von Woon E. et al., 2022, Wei X. et al., 2023] и оценкой цитотоксической функции [Salazar M.D. et al., 2022]. 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 [Liu J. et al., 2022]. 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 [Fukui A. et al., 2017]. Выделяются работы, проведенные с использованием животных. Например, у мышей описаны изменения фенотипического и функционального статуса dNK-клеток в экспериментальных моделях инфекций [Xu X. et al., 2017, Li T. et al., 2021]. На крысах продемонстрировано, что в отсутствии НК-клеток развивается глубокая патологическая инвазия клеток трофобласта в стенку матки [Renaud S.J. et al., 2017]. 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 [Silva J.F. et al., 2016, Soares M.J. et al., 2017, Sojka D.K., 2020], что затрудняет интерпретацию результатов, полученных с использованием модельных животных.

Предпринимаются попытки оценки содержания популяций иммунных клеток децидуальной оболочки человека с помощью высокопроизводительной цитометрии [Wu Z. et al., 2021, Fu M. et al., 2022]. Однако эти исследования выполнены на малых выборках пациентов [Wu Z. et al., 2021]. 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 [Whettlock E.M. et al., 2022]. 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 НК-клеток. Возможность образования пула dNK-клеток за счет миграции НК-клеток из периферической крови исследована на мышах [Sojka D.K. et al., 2018, Tao Y. et al., 2021], отдельные работы выполнены с использованием биологического материала человека [Lu H. et al., 2020, Jin X. et al., 2022, Wang P. et al., 2023]. 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 NK-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 рNK-клеток.
3. Оценить пролиферативную активность NK-клеток в составе моноклеарной фракции периферической крови и выделенных из нее NK-клеток в присутствии клеток трофобласта у здоровых небеременных женщин и женщин с физиологической беременностью в I триместре.
4. Сравнить особенности пролиферации рNK-клеток у здоровых небеременных женщин и женщин с физиологической беременностью в I триместре с пролиферацией рNK-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 NK-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 NK-клетках и клетках трофобласта в модели их сокультивирования.
7. Оценить цитотоксическую функцию NK-клеток в составе моноклеарной фракции периферической крови и выделенных из нее NK-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 pNK-клеток. Однако, pNK-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 pNK-клеток небеременных женщин в разных фазах цикла к влиянию клеток трофобласта. У беременных женщин pNK-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 pNK-клеток, а также субпопуляций с фенотипом CD56+CD16- и CD56+CD16+, была подавлена в случае взаимодействия с клетками трофобласта *in vitro*. Отмечено, что pNK-клетки женщин с ПНБ в секреторной фазе менструального цикла характеризовались сниженной экспрессией CD56 в присутствии клеток трофобласта.

Впервые получены данные о секреторной активности NK-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 NK-клеток, реализуемой по отношению к клеткам трофобласта, включавшей исследование с использованием клеток линии NK-92, моноклеарной фракции, содержащей pNK-клетки, и pNK-клеток, предварительно отсортированных из фракции моноклеаров. Впервые установлено, что NK-клетки вызывают апоптоз клеток трофобласта только при контактном взаимодействии, что сопровождается снижением экспрессии цитотоксических белков NK-клетками и может свидетельствовать о снижении их цитотоксического потенциала.

Впервые оценен вклад цитокинового микроокружения во взаимодействие NK-клеток и клеток трофобласта. Продemonстрировано, что NK-клетки экспрессируют проапоптотические рецепторы к TRAIL, а растворимые факторы, секретируемые клетками плаценты в I триместре, стимулируют цитотоксичность NK-клеток в отношении клеток трофобласта, и повышают устойчивость самих NK-клеток к рецептор-опосредованному апоптозу. Впервые получены данные об экспрессии клетками трофобласта линии JEG-3 белка серпина B9, инактивирующего GrzB, что указывает на наличие у клеток трофобласта механизмов защиты от индукции апоптоза естественными киллерами. Продemonстрировано, что цитокины, стимулирующие цитотоксическую активность NK-клеток, вызывали снижение экспрессии серпина B9 клетками трофобласта, что подтверждает значимость цитокинового микроокружения маточно-плацентарного комплекса. Получены новые данные об изменении цитотоксической активности pNK-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 NK-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 НК-клеток. Растворимые факторы, секретируемые клетками плаценты, стимулируют экспрессию молекул адгезии как клетками трофобласта, так и НК-клетками, а также стимулируют миграцию НК-клеток.

2. Длительное контактное взаимодействие с клетками трофобласта вызывает изменение экспрессии транскрипционных факторов Eomes, AhR, ROR $\alpha$ , T-bet НК-

клетками, а также их поверхностных рецепторов, способствуя формированию фенотипа, подобного децидуальным НК-клеткам. Цитокины микроокружения плаценты модифицируют влияние клеток трофобласта на НК-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 НК-клетках, под его влиянием НК-клетки повышают экспрессию, а также содержание мРНК гена, кодирующего основной дифференцировочный рецептор естественных киллеров CD56.

4. Пролиферативная активность НК-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 НК-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 НК-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 НК-клетками рецепторов к TRAIL в присутствии растворимых факторов, секретируемых клетками плаценты, отражает уменьшение восприимчивости НК-клеток к апоптотическому сигналу. Длительное контактное культивирование НК-клеток и клеток трофобласта приводит к снижению содержания цитотоксических белков в НК-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 НК-клеток.

7. У женщин с привычным невынашиванием беременности сохраняется высокая цитотоксическая активность НК-клеток периферической крови в отношении клеток трофобласта на протяжении менструального цикла. Снижение пролиферации и экспрессии CD56 НК-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-

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 «Эндометрия 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.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Культуры клеток.** Работа выполнена с использованием клеток линии НК-92, воспроизводящих основные морфологические, фенотипические, функциональные характеристики клеток естественных киллеров [Gong J.H. et al., 1994, Komatsu F. Et al., 1998, Rajagopalan S. Et al., 1999, Hannan N.J. et al., 2010, Han M. Et al., 2014]. В работе использовали клетки линии JEG-3 (АТСС, США), которым свойственны морфологические, фенотипические и функциональные характеристики инвазивного трофобласта I триместра беременности [Kohler P.O. et al., 1971, Al-Nasiry S. Et al., 2006, Hannan N.J. et al., 2010, Poloski E. Et al., 2016, Melsted W.N. et al., 2018, Persson G. Et al., 2020, Eikmans M. Et al., 2022]. Клетки линии K-562 (АТСС, США) применяли в качестве клеток-мишеней при оценке цитотоксической активности НК-клеток. Клетки культивировали при 37°С 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%.

**Кондиционированные среды (КС) ворсин хориона** получали после инкубации эксплантатов плацент, содержащих ворсины хориона, в 1 мл среды DMEM без добавления ЭТС в течение 24 часов. Средняя масса эксплантатов составила 110±15 мг.

Перед экспериментами в КС измеряли общее количество белка на спектрофотометре NanoDrop One (ThermoScientific, США). Использовали КС ворсин хориона в объеме, содержащем одинаковое количество белка.

**Индукторы.** 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).

**Пациенты.** Обследовано 477 женщин. 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». 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 года. В работе были также сформированы группы здоровых небеременных женщин, составленные из добровольцев. У всех включенных в исследование человек 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 с использованием набора ГК «Алкор Био» (Россия). Содержание прогестерона составило 13,0 {3,7; 16,7} нг/мл (референсные значения для женщин в лютеиновой фазе цикла 3,1-27,9 нг/мл), 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. Выделены следующие группы: небеременные женщины в пролиферативной (группа I-a) и секреторной фазе менструального цикла (группа I-b), небеременные фертильные женщины в пролиферативной (группа II-a) и секреторной фазе менструального цикла (группа II-b), женщины с физиологическим течением беременности в I (группа III-a) и III (III-b) триместре, небеременные женщины с ПНБ в пролиферативной (группа IV-a) и секреторной фазе менструального цикла (группа IV-b), беременные женщины с ПНБ в анамнезе (группа V).

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. Периферическую кровь получали натошак венепункцией локтевой вены и собирали в вакуумную пробирку с антикоагулянтом гепарин (Vacuette; Greiner Bio-One, Австрия).

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), наружный генитальный эндометриоз III-IV степени, программа экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) с использованием донорских ооцитов, верифицированный антифосфолипидный синдром, аутоиммунные заболевания, аномалии развития половых органов, прием гормональных препаратов, в том числе гормональная контрацепция.

**Мононуклеары периферической крови** выделяли стерильно стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности  $\rho=1,077$  (Histopaque®-1077, Sigma, США) по методике А. Воуум [Voium A. et al., 1968].

**Изолированную популяцию НК-клеток периферической крови** получали из мононуклеарной фракции с помощью проточного сортировщика клеток FacsAriaIII (BD, США), через сопло диаметром 85 мкм, по фенотипу CD45+CD3-CD56+, применяя протокол Purity. Чистота выделения во всех случаях составляла не менее 99%. Доля жизнеспособных НК-клеток после выделения на сортировщике составляла 89-95%. Отсортированные из фракции мононуклеаров НК-клетки далее обозначены как spNK-клетки (от англ. sorted peripheral NK cells).

**Методы исследования.** Экспрессию поверхностных рецепторов НК-клеток и их микровезикул (МВ), рецепторов клеток трофобласта, адгезию и трансмиграцию НК-клеток, секрецию клетками цитокинов проводили методом проточной цитофлюориметрии. Для этого обрабатывали клетки специфическими антителами (BD, RnD, США), мечеными флюоресцентными метками и оценивая относительное количество меченных клеток и их интенсивность флюоресценции на цитометре FACSCantoII (BD, США). Для уменьшения неспецифического связывания антител клетки предварительно обрабатывали реагентом, блокирующим Fc-рецепторы (MACS, Германия). Часть клеток обрабатывали изотипическими антителами для контроля неспецифического связывания. Оценку внутриклеточного содержания транскрипционных факторов AhR, Eomes, GATA3, ROR $\alpha$ , ROR $\gamma$ t, T-bet, содержания белков GrzA, GrzB, перфорины, серпина B6, серпина B9 проводили методом проточной цитофлюориметрии, предварительно обрабатывая пробы растворами для пермеабиллизации и фиксации клеток (BD, США). Определение внутриклеточного содержания каспазы 3, каспазы 8, белков SMAD, GrzB и перфорины проведено методом иммуноблоттинга. Для этого клетки лизировали в буфере RIPA с добавлением коктейля ингибиторов протеаз и фосфатаз, затем клеточные лизаты разделяли в 10% полиакриламидном геле, переносили на PVDF-мембрану, обрабатывали специфическими антителами (Cell Signaling, США) и визуализировали хемиллюминесценцию с помощью системы ChemiDoc™ Touch (Bio-Rad, США). Визуализация взаимного расположения НК-клеток и клеток трофобласта при трансмиграции через мембраны системы Transwell (диаметр поры 8 мкм, Falcon, США) выполнена на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 (Германия). Гранулометрический анализ МВ проведен с помощью лазерного анализатора nanoPARTICA SZ-100 (Horiba, Япония). Визуализация МВ проведена на сканирующем зондовом микроскопе Интегра Аура (NT-MDT, Россия) и трансмиссионном электронном микроскопе Jeol JEM 1400 (Япония). Наличие рецепторов на мембране МВ оценивали методом высокоточной проточной цитофлюориметрии, используя Cytoflex (Beckman Coulter, США), позволяющий

детектировать частицы размером от 0,1 мкм. ПЦР в режиме реального времени выполнена на амплификаторе Real-time CFX Connect (Bio-Rad, США).

**Исследование влияния клеток трофобласта на фенотип и функции адгезии и трансмиграции НК-клеток под действием цитокинов и КС ворсин хориона I и III триместров беременности** состояло из следующих этапов: 1) оценка фенотипа клеток трофобласта линии JEG-3, его изменений в присутствии КС или отдельных цитокинов, а также определение секреции цитокинов клетками трофобласта линии JEG-3; 2) оценка фенотипа клеток линии NK-92 и влияния КС на него; 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 системе «трансвелл» 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. Культивирование клеток линий NK-92 и JEG-3 в присутствии индукторов проводили в течение 24 часов.

**Исследование параметров дифференцировки НК-клеток в присутствии клеток трофобласта** 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 на экспрессию рецепторов клетками линии NK-92 в присутствии трофобласта; 2) оценка содержания мРНК гена *NCAM1*, кодирующего дифференцировочный рецептор 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 НК-клетками периферической крови после совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3; 5) оценка содержания транскрипционных факторов в клетках линии NK-92 и его изменений после совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3. Для оценки параметров дифференцировки НК-клеток проводили их культивирование с клетками трофобласта в течение 96 часов.

**Исследование пролиферативной активности НК-клеток периферической крови в присутствии клеток трофобласта** включало следующие этапы: 1) определение пролиферативной активности рНК-клеток в составе мононуклеаров здоровых небеременных женщин и ее изменений у беременных женщин в I триместре в присутствии клеток трофобласта; 2) оценка пролиферативной активности spНК-клеток здоровых небеременных женщин и беременных женщин в I триместре, в присутствии клеток трофобласта; 3) оценка изменений популяционного состава рНК-клеток после культивирования фракции мононуклеаров в присутствии клеток трофобласта; 4) определение пролиферативной активности рНК-клеток в присутствии клеток трофобласта у небеременных женщин с ПНБ в разных фазах менструального цикла, беременных женщин с ПНБ в анамнезе, и сравнение с параметрами пролиферации НК-клеток у здоровых небеременных фертильных и беременных женщин. Для оценки пролиферации рНК-клеток и изменения их популяционного состава клетки культивировали в течение 144 часов в присутствии клеток трофобласта.

**Исследование продукции клетками линии NK-92 цитокинов и микровезикул** включало следующие этапы: 1) оценка продукции цитокинов клетками линии NK-92; 2)

оценка продукции МВ клетками линии НК-92, включавшее гранулометрический анализ, трансмиссионную электронную микроскопию и атомно-силовую микроскопию МВ; 3) определение содержания каспаз в МВ и фенотипа МВ; 4) оценка переноса содержимого МВ клеток линии НК-92 в клетки трофобласта линии JEG-3 и влияние МВ на фенотип, функции пролиферации и миграции клеток трофобласта, а также влияние на активацию внутриклеточных путей передачи сигнала в клетках трофобласта.

**Исследование цитотоксической функции клеток линии НК-92 в отношении клеток трофобласта** 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 НК-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 гранзима В и перфорина в клетках линии НК-92 и каспаз 3 и 8 в клетках линии JEG-3 после контактного и дистантного взаимодействия; 5) оценка цитотоксичности клеток линии НК-92 после их совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3; 6) определение содержания перфорина, гранзимов и серпинов в клетках линии НК-92; 7) оценка содержания перфорина, гранзимов и серпинов в клетках линии JEG-3 после их совместного культивирования с клетками линии НК-92. Влияние цитокинов на цитотоксичность клеток линии НК-92 в отношении клеток линии К-562 и клеток линии JEG-3 оценивали, инкубируя НК-клетки с клетками-мишенями в течение 4 часов. Оценку проапоптотических рецепторов клеток линии НК-92 проводили после совместной инкубации НК-клеток с клетками трофобласта линии JEG-3 в течение 4 часов. Содержание гранзима В, перфорина, каспаз 3 и 8 в НК-клетках и клетках трофобласта оценивали после контактного и дистантного культивирования клеток линий НК-92 и JEG-3 в течение 24 часов. Для оценки цитотоксической функции НК-клеток в модели длительного совместного культивирования с клетками трофобласта проводили предварительную экспозицию НК-клеток цитокинам в течение 96 часов. Также оценили цитотоксическую функцию НК-клеток в отношении клеток линии К-562 после непосредственной экспозиции клеток линии НК-92 клеткам трофобласта линии JEG-3 в течение 96 часов. Определение содержания перфорина, гранзимов и серпинов также проведено в сокультуре клеток линии НК-92 и JEG-3 после контактного культивирования в течение 96 часов.

**Исследование цитотоксической функции клеток периферической крови в отношении клеток трофобласта при привычном невынашивании беременности** включало следующие этапы: 1) оценка цитотоксичности рНК-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 I триместре беременности; 2) оценка цитотоксичности spNK-клеток в отношении клеток трофобласта линии JEG-3 у здоровых небеременных женщин без акушерского анамнеза, здоровых небеременных фертильных женщин и женщин в I триместре беременности; 3) оценка цитотоксичности рНК-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 НК-клеток у здоровых небеременных женщин в разных фазах цикла и беременных женщин.

**Статистическую обработку данных** проводили в программах Statistica 10 ([www.statsoft.com](http://www.statsoft.com), США) и GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). В случае равенства дисперсий применяли методы параметрической статистики: t-критерий Стьюдента для двух независимых переменных и однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) для множественных сравнений. 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). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$  (\* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ ). 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).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Влияние клеток трофобласта на фенотип и трансмиграцию НК-клеток в присутствии цитокинов и КС ворсин хориона I и III триместров беременности.** За счет экспрессируемых рецепторов, а также секреции цитокинов, клетки трофобласта могут влиять на формирование пула dNK-клеток, в связи с чем был проанализирован фенотип клеток трофобласта и его изменения под влиянием растворимых факторов. 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. В присутствии цитокинов VEGF, IL-6, IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$  количество клеток линии JEG-3, несущих на своей поверхности TGF $\beta$ R2, было выше по сравнению с интактными клетками линии JEG-3 (Рисунок 1а).

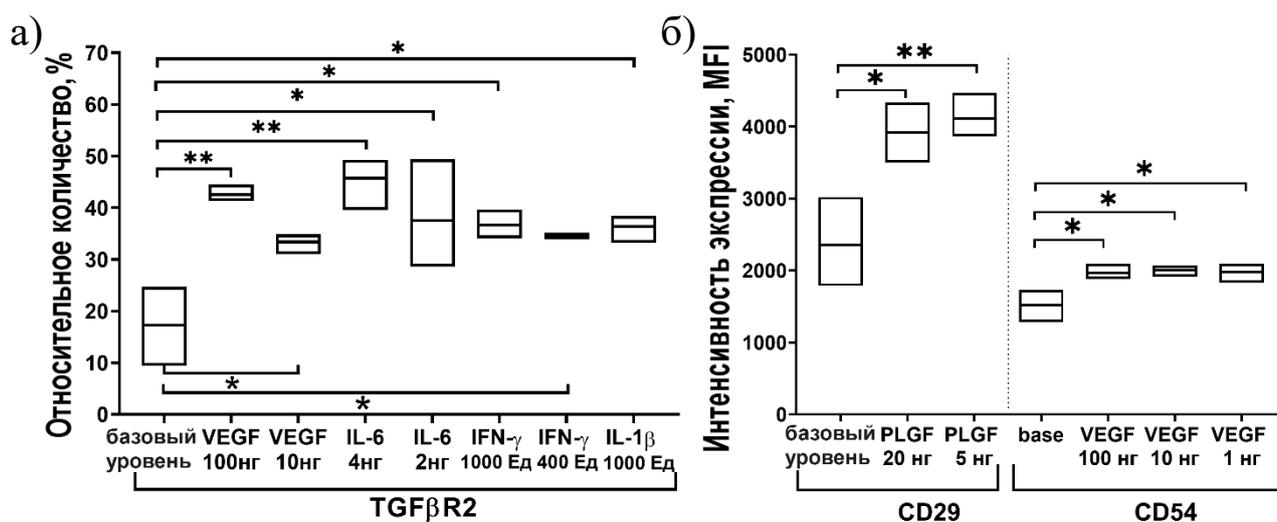


Рисунок 1 - Фенотип клеток линии JEG-3 в присутствии цитокинов. Относительное количество клеток, экспрессирующих на своей мембране TGF $\beta$ R2 (а). Интенсивность экспрессии клетками рецепторов CD29, CD54 (б)

Интенсивность экспрессии клетками линии JEG-3 рецептора CD29 была выше в присутствии PLGF, а рецептора CD54 - в присутствии VEGF, по сравнению с интактными клетками (Рисунок 1б).

Ранее в отделе иммунологии ФГБНУ «АГиР им.Д.О.Отта» установлено, что КС ворсин хориона I и III триместров содержат цитокины IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  [Соколов Д.И. и др., 2012]. В настоящей работе в КС ворсин хориона были выявлены IL-15 и IL-18, что согласуется с данными литературы [Ledee N. et al., 2006, Toth V. et al., 2010, Wang F. et al., 2017, Wang X.Q. et al., 2018]. Их концентрации не различались в зависимости от триместра беременности. В присутствии КС ворсин хориона I триместра беременности по сравнению со спонтанным уровнем отмечали повышение интенсивности экспрессии CD106, CD95, CD49a, CD31, CD51/61, интегрин  $\beta$ 6 (Рисунок 2 а,б).

В присутствии КС ворсин хориона III триместра беременности по сравнению со спонтанным уровнем также установлена повышенная интенсивность экспрессии CD106, CD95, CD49a, CD31, CD51/61, интегрин  $\beta$ 6 (Рисунок 2 а,б). Интенсивность экспрессии клетками трофобласта VE-кадгерина (Рисунок 2б) снижена в присутствии КС ворсин хориона III триместра физиологической беременности по сравнению с КС I триместра. Выявленные изменения экспрессии адгезионных рецепторов, по-видимому, определяют возможность инвазии клеток трофобласта и их встраивания в сосуды децидуальной оболочки, а также указывают на регуляцию диапедеза лейкоцитов в зависимости от условий микроокружения.

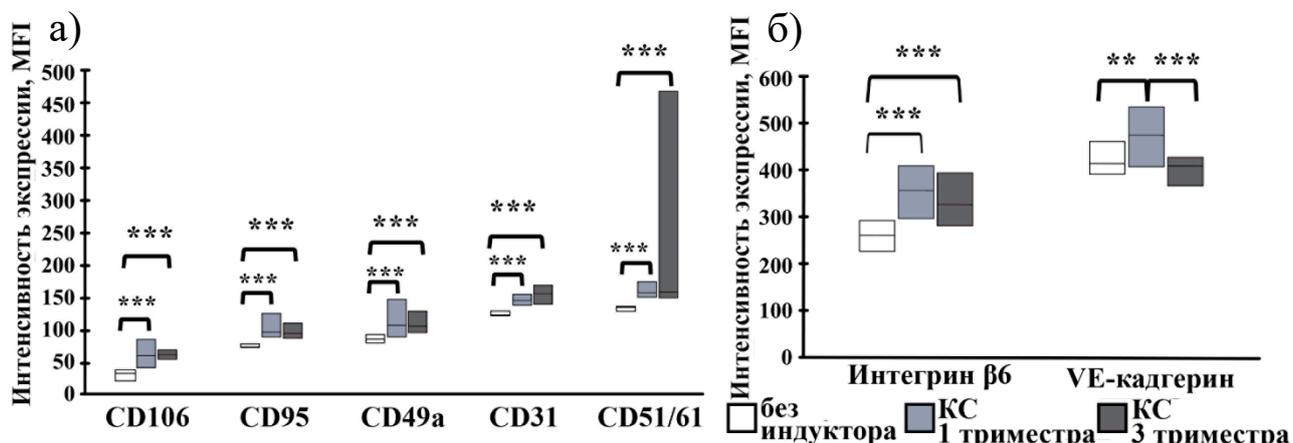


Рисунок 2 - Фенотип клеток линии JEG-3 в присутствии КС ворсин хориона. Интенсивность экспрессии клетками CD106, CD95, CD49a, CD31, CD51/61 (а), интегрин  $\beta$ 6 и VE-кадгерина (б)

С учетом того, что на представительство dNK-клеток в течение беременности может влиять цитокиновое микроокружение, нами был оценен эффект КС ворсин хориона на NK-клетки, в том числе на их фенотип, а также функции адгезии и трансмиграции. После инкубации клеток линии NK-92 в присутствии КС ворсин хориона I триместра беременности повышена интенсивность экспрессии клетками линии NK-92 рецепторов CD29, CD58, CD11a, CD49d (Рисунок 3 а,б,в) и снижена интенсивность экспрессии CD184 по сравнению со спонтанным уровнем (Рисунок 3а). После инкубации клеток линии NK-92 с КС ворсин хориона III триместра отмечена повышенная интенсивность экспрессии CD29, CD58, CD11a, CD49d и сниженная интенсивность экспрессии CD184, CD47, CD54 по сравнению со спонтанным уровнем

(Рисунок 3 а,б,в). Таким образом, растворимые факторы, секретируемые клетками плаценты, стимулируют экспрессию NK-клетками адгезионных рецепторов.

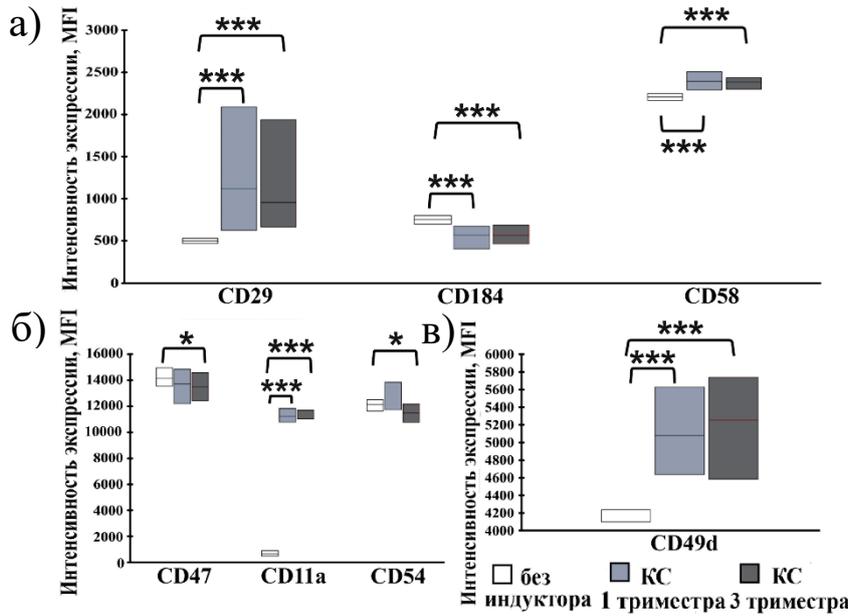


Рисунок 3 - Фенотип клеток линии NK-92 в присутствии КС ворсин хориона. Интенсивность экспрессии клетками CD29, CD184, CD58 (а), CD47, CD11a, CD54 (б), CD49d (в)

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 4). Установлено, что для клеток линии NK-92, мигрировавших через монослой клеток трофобласта, 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 в исследовании (bFGF, IL-10, IL-8, SDF-1, TGFβ, IL-15, IL-18, IFNγ, IL-6, TNFα, IL-4, IL-1β). В присутствии IL-18, а также в присутствии IL-4, интенсивность экспрессии CD11a NK-клетками, мигрировавшими через клетки трофобласта, была выше, чем у клеток, мигрировавших спонтанно (Рисунок 5).

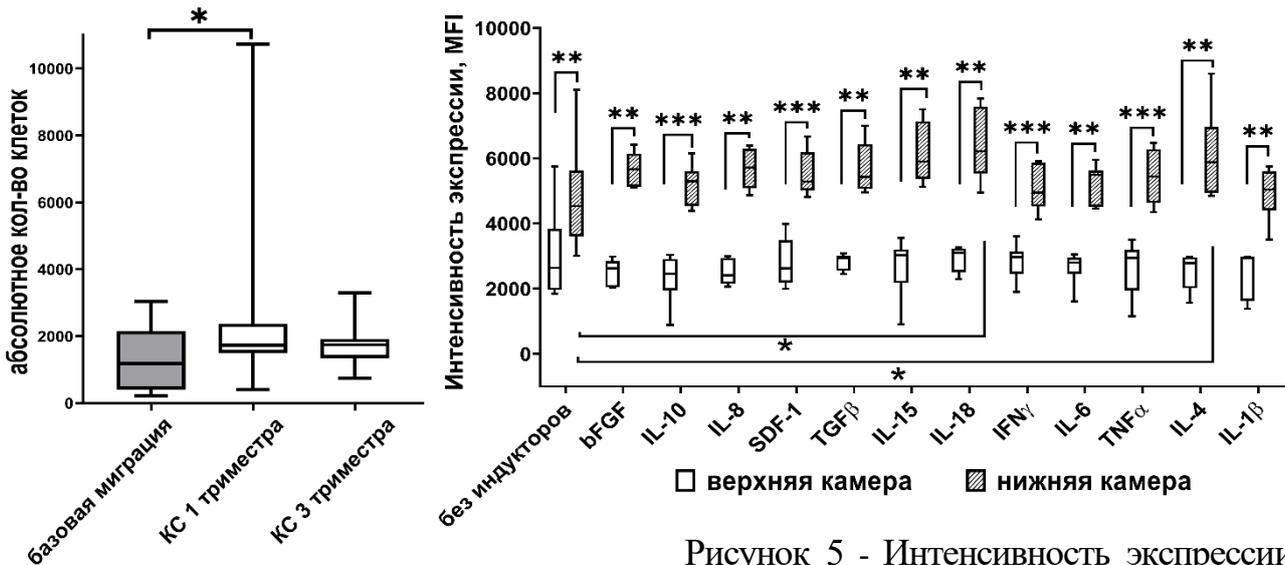


Рисунок 4 - Количество клеток линии NK-92, мигрировавших через монослой клеток трофобласта линии JEG-3

Рисунок 5 - Интенсивность экспрессии клетками линии NK-92 рецептора CD11a в верхней и нижней камере «транвелла», разделенными монослоем клеток трофобласта

Таким образом, зарегистрированная в модели *in vitro* экспрессия адгезионных рецепторов и их лигандов НК-клетками и клетками трофобласта, а также повышенная функция трансмиграции НК-клеток через клетки трофобласта в присутствии КС ворсин хориона I триместра свидетельствуют о контроле трафика НК-клеток в децидуальную оболочку клетками трофобласта.

**Изменение параметров дифференцировки НК-клеток в присутствии клеток трофобласта.** Миграция в ткань может стимулировать изменения спектра рецепторов НК-клеток, связанных с их созреванием. В связи с этим в работе оценена экспрессия клетками линии NK-92 фенотипических маркеров CD56, CD161, CD117, CD57, CD62L, рецепторов к цитокинам CD122 (IL-2R $\beta$ ), CD215 (IL-15R $\alpha$ ), CD127 (IL-7R $\alpha$ ), активационных рецепторов цитотоксической активности NKp30, NKp44, NKG2D, NKG2C, KIR2DL4, KIR2DS4, и ингибиторных рецепторов NKG2A, KIR2DL1, KIR2DL3, KIR3DL1, после продолжительного культивирования с клетками трофобласта. Профиль экспрессии 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 6).

Для оценки степени влияния клеток трофобласта на НК-клетки проанализирована экспрессия транскрипционных факторов, связанных с процессом дифференцировки НК-клеток, и активация внутриклеточного сигнального пути в клетках линии NK-92 от клеток линии JEG-3 (Рисунок 7).

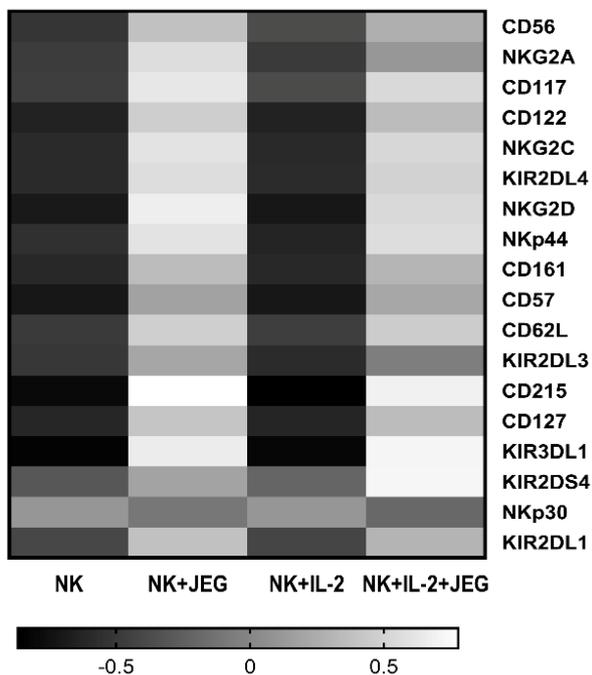


Рисунок 6 - Тепловая карта медиан стандартизированных значений интенсивности флуоресценции рецепторов клетками линии NK-92: после культивирования без клеток линии JEG-3 и IL-2 (NK), с IL-2 (NK+IL-2), с клетками линии JEG-3 (NK+JEG), с IL-2 и клетками линии JEG-3 (NK+IL-2+JEG).

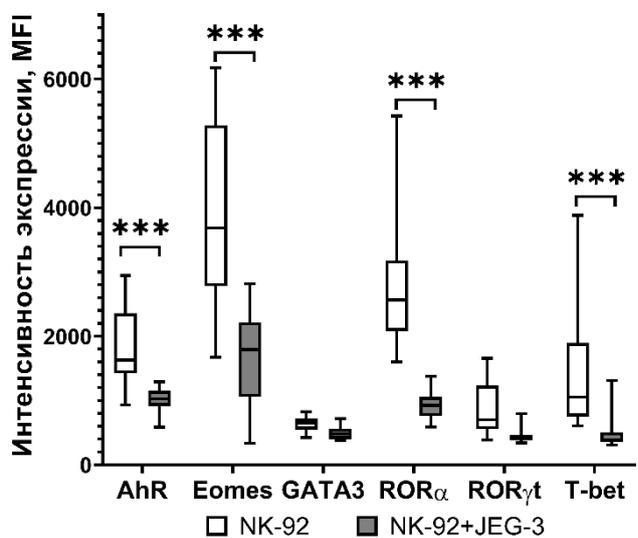


Рисунок 7 - Интенсивность экспрессии клетками линии NK-92 транскрипционных факторов AhR, Eomes, GATA3, ROR $\alpha$ , ROR $\gamma$ t, T-bet после культивирования без и в присутствии клеток линии JEG-3

Интенсивность экспрессии транскрипционных факторов AhR, Eomes, ROR $\alpha$ , T-bet в НК-клетках после совместного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3 снижена по сравнению с интенсивностью их экспрессии НК-клетками в монокультуре (Рисунок 7). Установлено сниженное содержание TGF $\beta$  в клетках линии JEG-3 после их совместно культивирования с клетками линии NK-92 (Рисунок 8) и увеличение содержания pSMAD2/3 в клетках линии NK-92 по сравнению с интактными клетками линии NK-92 (Рисунок 9). Полученные данные указывают на модулирующее действие клеток трофобласта в отношении НК-клеток, реализуемое посредством секреции TGF $\beta$  и выражающееся в подавлении экспрессии транскрипционных факторов, участвующих в регуляции дифференцировки естественных киллеров.

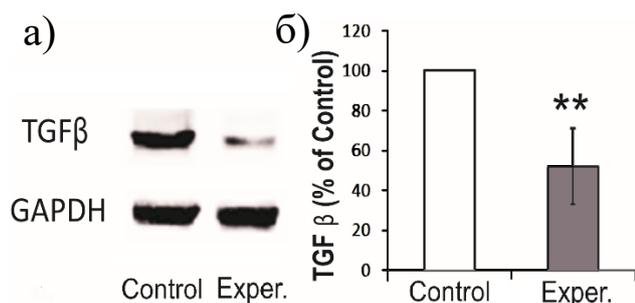


Рисунок 8 - Содержание TGF $\beta$  в клетках линии JEG-3. Репрезентативный иммуноблот интактных клеток линии JEG-3 (Control) и клеток после их контактного (Exper.) взаимодействия с клетками линии NK-92 (а); Содержание TGF $\beta$ , нормализованное по GAPDH, в клетках линии JEG-3 после контактного взаимодействия с клетками линии NK-92 (б)

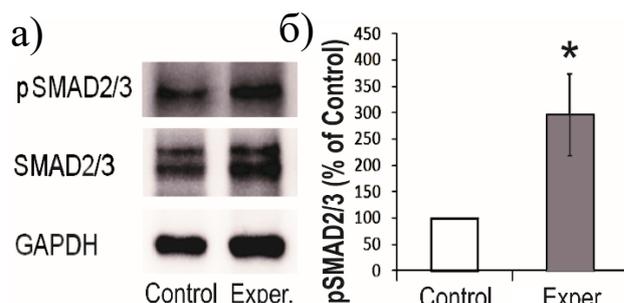


Рисунок 9 - Общее содержание белка SMAD2/3 и его фосфорилированной формы (pSMAD2/3). Репрезентативный иммуноблот интактных клеток линии NK-92 (Control) и НК-клеток после их культивирования с клетками линии JEG-3 (Exper.) (а); Содержание pSMAD2/3, нормализованное по GAPDH, в клетках линии NK-92 после их культивирования с клетками линии JEG-3 (б)

Цитокины микроокружения влияли на рецепторный профиль НК-клеток в присутствии клеток трофобласта (Рисунок 10). Интенсивность экспрессии НК-клетками рецепторов CD56, CD57, NKG2A, NKG2C, связанных с конечными этапами их дифференцировки, была повышена в сокультуре по сравнению с культивированием без клеток линии JEG-3. Провоспалительный цитокин TNF $\alpha$  к сокультуре стимулировал интенсивность экспрессии НК-клетками как активационного рецептора NKG2C, так и ингибиторного рецептора NKG2A (Рисунок 10 в,г), что свидетельствует об отсутствии неконтролируемой активации НК-клеток в условиях воспаления в присутствии клеток трофобласта.

Присутствующий в маточно-плацентарном микроокружении IL-18 стимулировал увеличение количества НК-клеток с фенотипом NKp44<sup>+</sup> (Рисунок 11а) в присутствии клеток трофобласта, по сравнению с сокультурой без IL-18. Внесение IL-15 в сокультуру способствовало повышению количества НК-клеток с фенотипом NKG2D<sup>+</sup> (Рисунок 11б). Интенсивность экспрессии CD127 НК-клетками в сокультуре в присутствии IL-15 была повышена по сравнению с сокультурой без IL-15 (Рисунок 11в). Так как экспрессия NKp44, NKG2D и CD127 характерна для различных популяций ИЛС, нельзя исключать возможности приобретения НК-клетками ИЛС-подобного фенотипа под влиянием цитокинов IL-15 и IL-18.

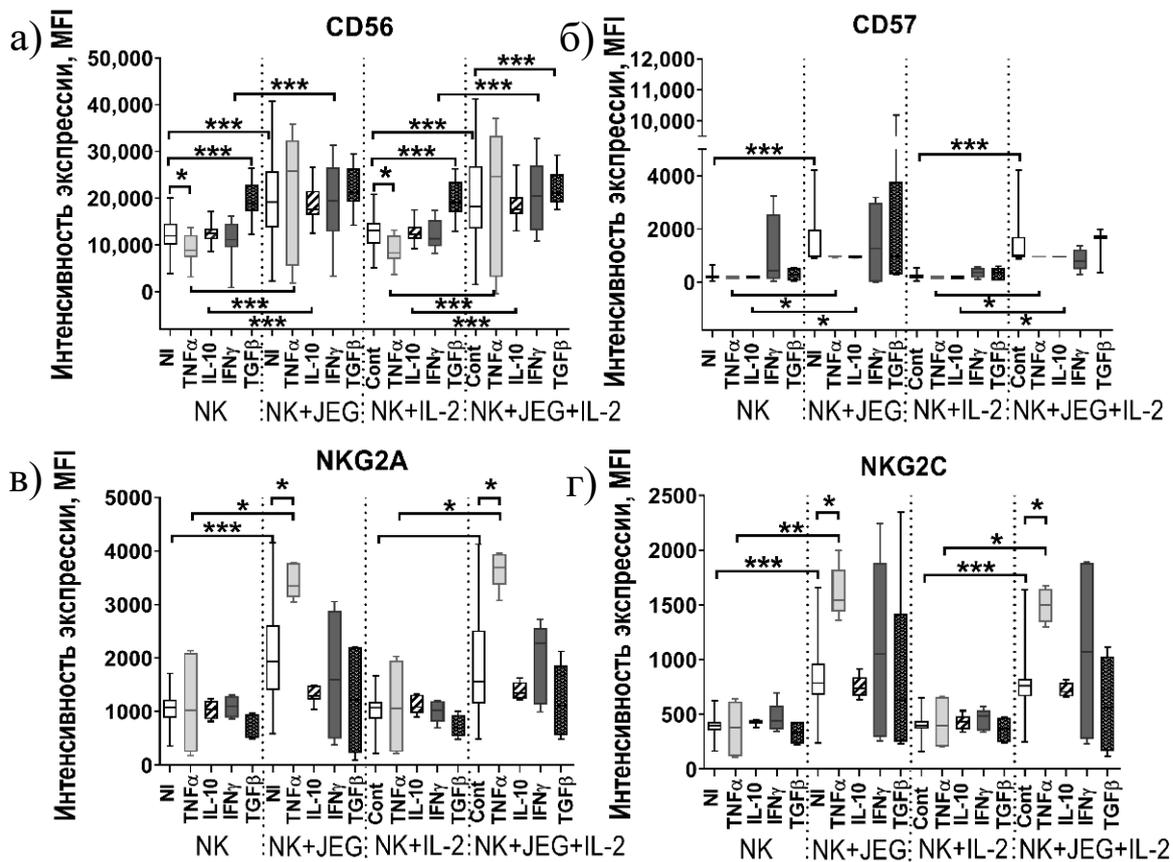


Рисунок 10 - Интенсивность экспрессии клетками линии NK-92 рецепторов CD56 (а), CD57 (б), NKG2A (в), NKG2C (г) после культивирования без клеток линии JEG-3 и IL-2, с IL-2, с клетками линии JEG-3, с IL-2 и клетками линии JEG-3, в присутствии цитокинов TNF $\alpha$ , IL-10, IFN $\gamma$  и TGF $\beta$ . NI - культивирование без индукторов. Cont - (control) культивирование в присутствии IL-2

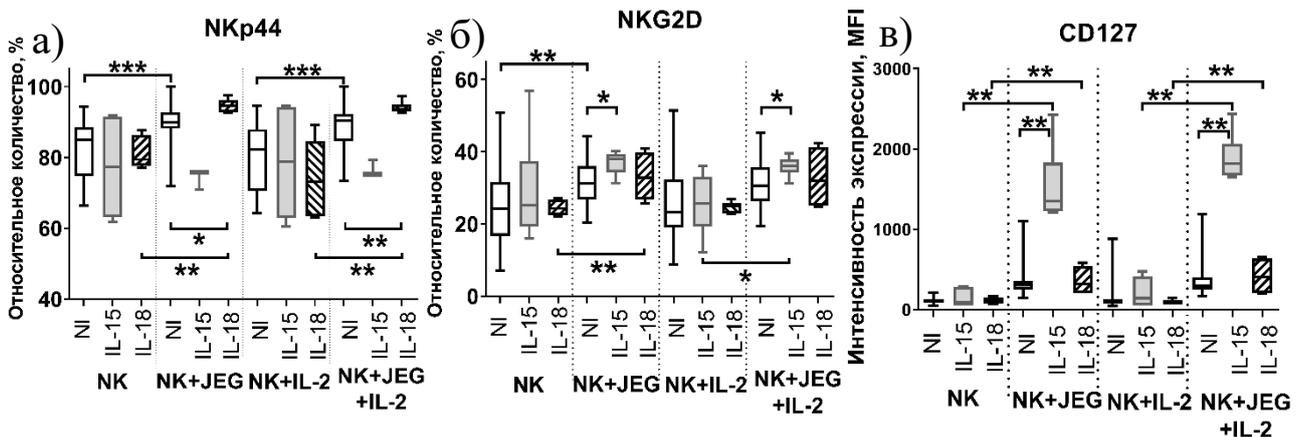


Рисунок 11 - Экспрессия клетками линии NK-92 рецепторов NKp44 (%), NKG2D (%), CD127 (MFI) после культивирования без клеток линии JEG-3 и IL-2, с IL-2, с клетками линии JEG-3, с IL-2 и клетками линии JEG-3, в присутствии цитокинов IL-15 и IL-18. NI - культивирование без индукторов. Cont - (control) культивирование в присутствии IL-2

Так как клетки децидуальной оболочки секретируют широкий спектр цитокинов, 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. Показано, что в сокультуре в

присутствии КС ворсин хориона I триместра по сравнению с сокультурой без КС повышена интенсивность экспрессии NK-клетками активационного рецептора NKG2D, связывающего лиганды MICA/B клеток трофобласта (Рисунок 12). В присутствии КС ворсин хориона III триместра в сокультуре снижена интенсивность экспрессии NK-клетками NKG2D по сравнению с сокультурой без КС (Рисунок 12). При этом интенсивность экспрессии NKG2D была ниже в сокультуре в присутствии КС ворсин хориона III триместра по сравнению с сокультурой в присутствии КС ворсин хориона I триместра (Рисунок 12), что может отражать изменение степени участия NK-клеток в регуляции инвазии клеток трофобласта в течение беременности.

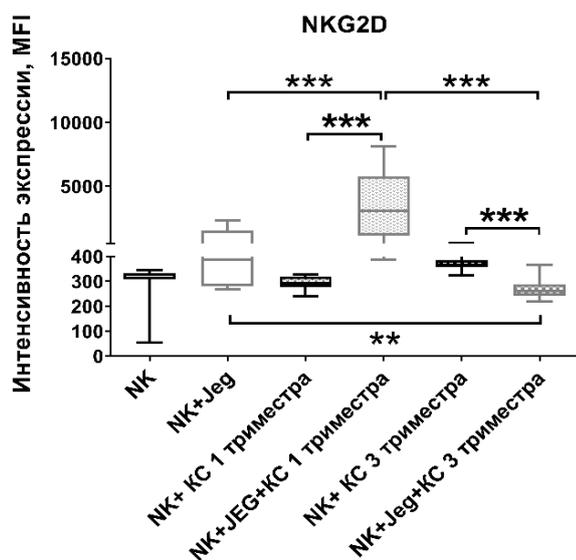


Рисунок 12 - Интенсивность экспрессии клетками линии NK-92 рецептора NKG2D после культивирования без и в присутствии клеток линии JEG-3, в присутствии КС ворсин хориона I и III триместров беременности

**Пролиферативная активность NK-клеток периферической крови в присутствии клеток трофобласта** была оценена для определения возможности рNK-клеток формировать пул dNK-клеток после миграции в децидуальную оболочку. Установлено, что до культивирования относительное количество NK-клеток в группах обследованных женщин не различалось. Длительное культивирование рNK-клеток в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3 приводило к подавлению интенсивности экспрессии Ki-67 NK-клетками во всех группах по сравнению со спонтанным уровнем экспрессии Ki-67 (Рисунок 13).

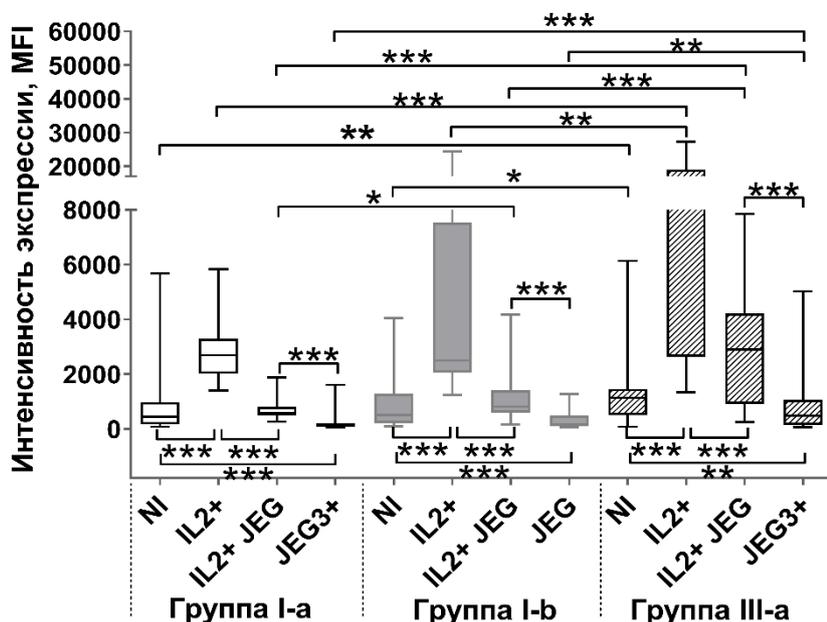


Рисунок 13 - Интенсивность экспрессии Ki-67 NK-клетками в составе мононуклеарной фракции после культивирования в течение 6 суток в различных условиях: без клеток трофобласта линии JEG-3 и без IL-2 (NI), с IL-2 (IL-2), в присутствии IL-2 и клеток трофобласта линии JEG-3 (IL-2+JEG), в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3 (JEG)

Однако, несмотря на ингибирующий эффект клеток трофобласта у женщин с физиологическим течением беременности интенсивность экспрессии Ki-67 pNK-клетками после инкубации с клетками трофобласта была повышена по сравнению с небеременными женщинами в обеих фазах менструального цикла (Рисунок 13), что может отражать участие процесса пролиферации pNK-клеток в формировании популяции dNK-клеток при беременности.

Анализ пролиферативной активности pNK-клеток также проводили у пациенток с ПНБ. Выявлены аналогичные различия, как и в отсутствии патологии: интенсивность экспрессии Ki-67 pNK-клетками в присутствии клеток трофобласта была снижена. Установлено, что до культивирования различий между группами по относительному количеству pNK-клеток, интенсивности экспрессии ими CD56 и CD16, а также относительному количеству субпопуляций NK-клеток (CD3-CD56+CD16- и CD3-CD56+CD16+) не выявлено. 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 14).

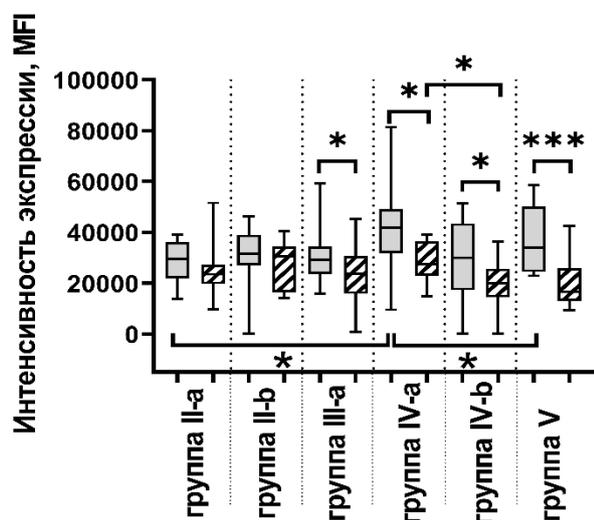


Рисунок 14 - Интенсивность экспрессии pNK-клетками CD56 после культивирования в течение 6 суток в присутствии IL-2 или IL-2 и клеток трофобласта линии JEG-3

Установлено, что в присутствии клеток трофобласта и IL-2 у женщин с ПНБ в секреторной фазе цикла интенсивность экспрессии CD56 была снижена по сравнению с интенсивностью экспрессии CD56 NK-клетками у женщин в пролиферативной фазе цикла (Рисунок 14). Сходных изменений в группах фертильных женщин в пролиферативной и секреторной фазах цикла выявлено не было. Таким образом, подавление пролиферации pNK-клеток со стороны клеток трофобласта может является универсальным свойством клеток трофобласта, которое облегчает *in vivo* их инвазию в матку. Снижение интенсивности экспрессии CD56 у небеременных женщин с ПНБ в секреторной фазе в присутствии клеток трофобласта может отражать нарушение трансформации pNK-клеток в dNK-клетки, что будет препятствовать имплантации и инвазии бластоцисты.

**Продукция NK-клетками цитокинов и микровезикул.** Для определения возможной дистантной регуляции NK-клеток была проанализирована секреция цитокинов NK-клетками. Показано, что цитокины IFN $\gamma$ , IL-10, RANTES TGF $\beta$  присутствуют в кондиционированных средах, полученных после культивирования клеток линии NK-92. Содержание IFN $\gamma$ , IL-10 и RANTES в КС клеток линии NK-92

было снижено после культивирования в присутствии цитокина  $TGF\beta$ , секреция которого продемонстрирована для клеток трофобласта, относительно содержания этих цитокинов в КС интактных НК-клеток (Рисунок 15).

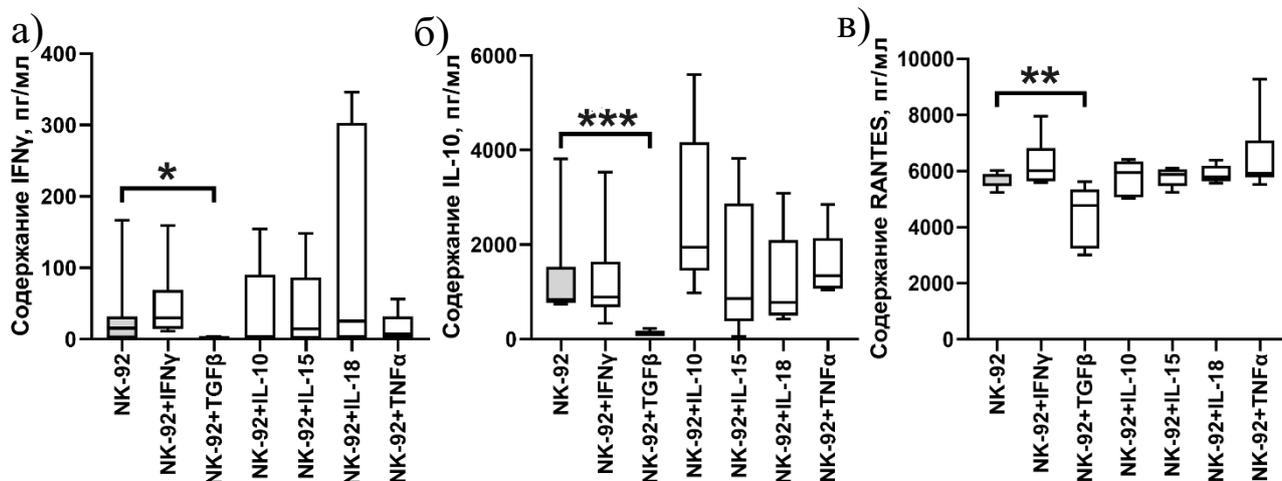


Рисунок 15 - Содержание цитокинов IFN $\gamma$  (а), IL-10 (б) и RANTES (в) в КС клеток линии NK-92, полученные после культивирования в течение 96 часов без индукторов и в присутствии IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ , IL-10, IL-15, IL-18, TNF $\alpha$

Учитывая возможное участие МВ в дистантных взаимодействиях НК-клеток и клеток трофобласта, проанализирована способность НК-клеток формировать МВ, их состав и возможные эффекты в отношении клеток трофобласта. С помощью гранулометрического анализа установлено, что размеры МВ, образуемых клетками линии NK-92, лежат в диапазоне от 169 нм до 512 нм, а пик распределения количества МВ приходится на 233 нм. Анализ частиц в супернатанте, полученном после осаждения МВ при 19800g, показал, что их размеры лежат в диапазоне от 12 нм до 35 нм. С помощью атомно-силовой микроскопии в поле зрения  $10 \times 10$  мкм на образцах 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. В качестве контроля использовали образцы, содержащие только раствор Хэнкса без  $CaCl_2$ . Установлено, что средний размер частиц в образцах контрольного раствора составлял до 22 нм, с медианой 8 нм.

Для верификации наличия МВ в образцах осадка, получаемого методом дифференциального центрифугирования КС клеток линии NK-92, проведена трансмиссионная электронная микроскопия образцов. Установлено, что образцы осадка содержат объекты сферической формы и диаметром от 120 до 800 нм (Рисунок 16 а). В поперечных срезах образцов осадка установлено наличие двух электронно-плотных слоев, характерных для клеточных мембран (Рисунок 16 б).

Микровезикулы НК-клеток могут оказывать влияние на клетки трофобласта, что было подтверждено экспериментально. Установлено, что при культивировании клеток линии JEG-3 в присутствии МВ клеток линии NK-92 в концентрации 20 мкг белка в 100 мкл среды отмечено снижение уровня пролиферации клеток трофобласта по сравнению с базовым уровнем (Рисунок 17 а). В результате культивирования клеток линии JEG-3 в присутствии МВ клеток линии NK-92 с общим содержанием белка 20 мкг в 100 мкл среды установлено увеличение миграции клеток линии JEG-3, выразившейся в увеличении количества мигрировавших клеток и площади, занятой клетками, по сравнению с культивированием без МВ (Рисунок 17 б, в).

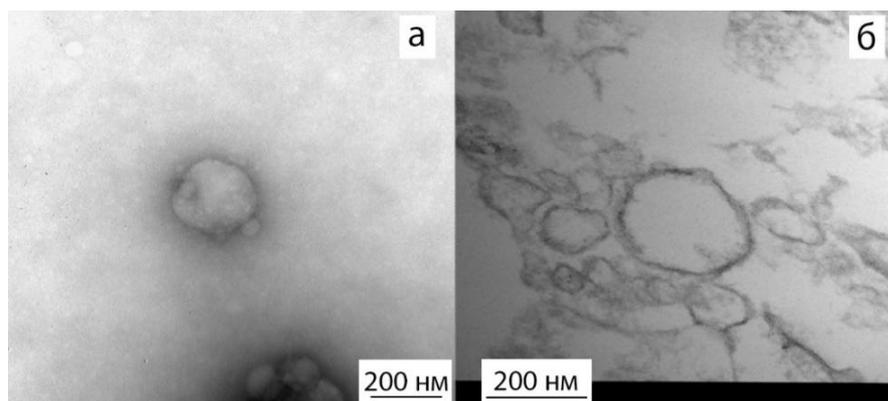


Рисунок 16 - Изображения образцов МВ клеток линии НК-92, полученные методом трансмиссионной электронной микроскопии. Осадок, полученный после дифференциального центрифугирования (а), срез МВ клеток линии НК-92 (б)

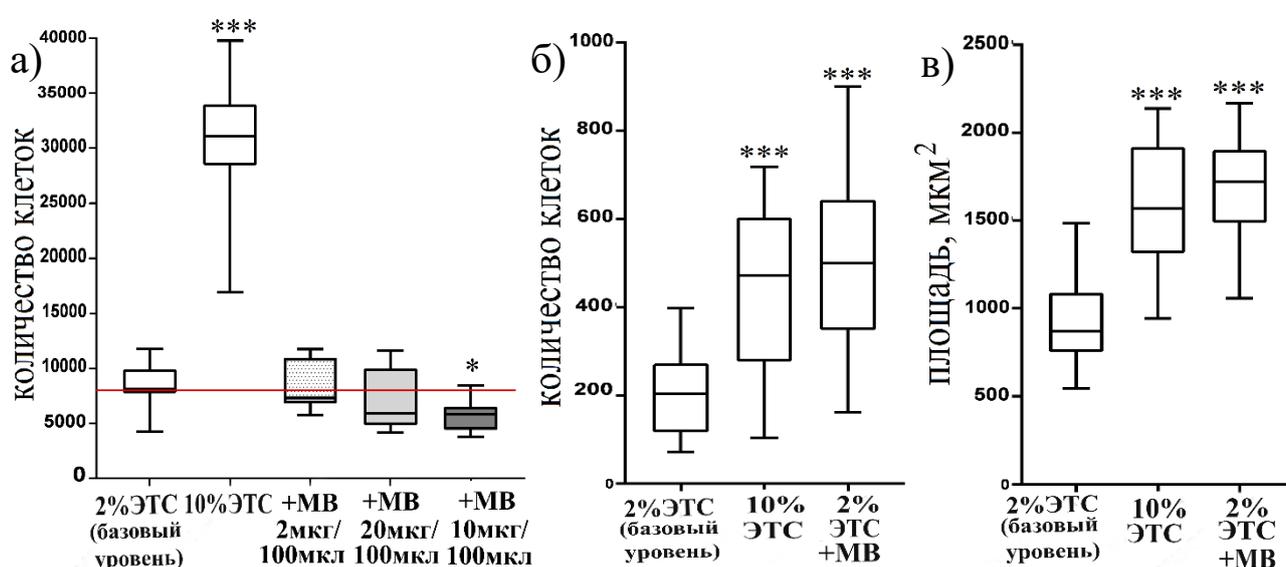


Рисунок 17 - Пролиферация (а) и миграция (количество (б) и занимаемая площадь (в)) клеток линии JEG-3 после культивирования в присутствии МВ. 2% ЭТС - базовый уровень пролиферации и миграции в присутствии среды с добавлением 2% ЭТС. 10 % ЭТС - уровень пролиферации и миграции в присутствии среды с добавлением 10% ЭТС. МВ 2мкг/100мкл, 10мкг/100мкл, 20мкг/100мкл - уровень пролиферации в присутствии МВ клеток НК-92 в концентрации, указанной по содержанию белка в мкг на 100 мкл среды с добавлением 2% ЭТС

Культивирование клеток линии JEG-3 в течение 24 часов, в присутствии МВ клеток линии НК-92 приводило к снижению содержания STAT3 в клетках линии JEG-3 (Рисунок 18 а, б). Отношение pSTAT3(Ser727)/STAT3 в клетках линии JEG-3 после культивирования в присутствии МВ клеток линии НК-92, было выше по сравнению с интактными клетками линии JEG-3 (Рисунок 18 в), что указывает активацию внутриклеточного пути передачи сигнала с участием белка STAT3 под влиянием МВ и характеризует МВ, как активных участников межклеточной коммуникации НК-клеток и клеток трофобласта.

Проведена оценка содержания цитотоксических белков в МВ НК-клеток. Установлено, что МВ, как и сами клетки линии НК-92 содержат GrzB и перфорин (Рисунок 19). Установлено, что влияние индукторов на содержание перфорина и GrzB

в МВ и клетках линии NK-92 различалось. При культивировании в присутствии PMA экспрессия GrzB и перфорина повышена в клетках линии NK-92 по сравнению со спонтанным уровнем их содержания (принят за 0 на графиках). Установлена повышенная экспрессия GrzB и сниженная экспрессия перфорина при культивировании NK-клеток в присутствии IL-1 $\beta$  (Рисунок 19 а,в). Культивирование в присутствии PMA вызывало повышение экспрессия перфорина в МВ клеток линии NK-92 (Рисунок 19 б).

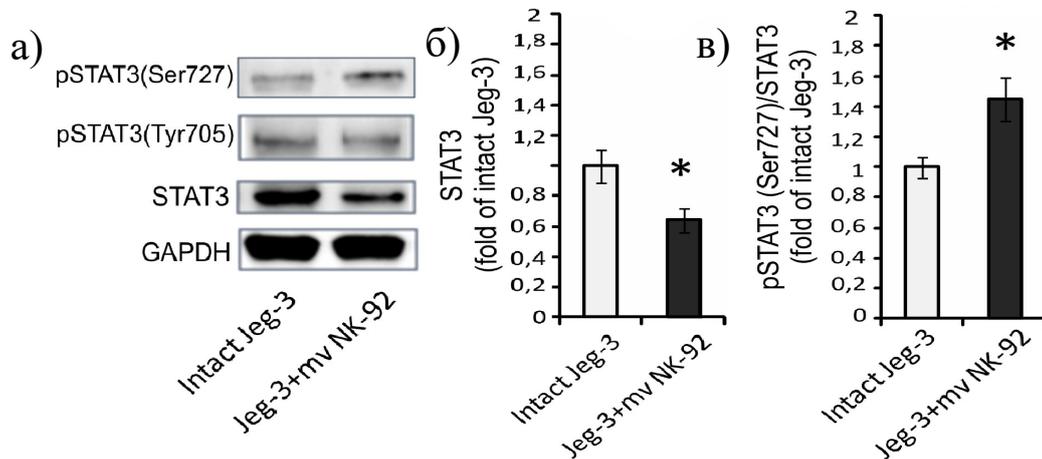


Рисунок 18 - Влияние МВ клеток линии NK-92 на содержание белков STAT3 и их фосфорилированных форм в лизатах клеток линии JEG-3. Иммуноблот, демонстрирующий содержание STAT3 (а) в интактных клетках линии JEG-3 (intact JEG-3) и после их взаимодействия с МВ клеток линии NK-92 (JEG-3+mv NK-92). Плотность бенда общего содержания белка STAT3 (б) в интактных клетках линии JEG-3 и после взаимодействия с МВ клеток линии NK-92, нормализованная по GAPDH. Соотношение phospho-STAT3 (pSTAT3(Ser727)) и общего STAT3 (в)

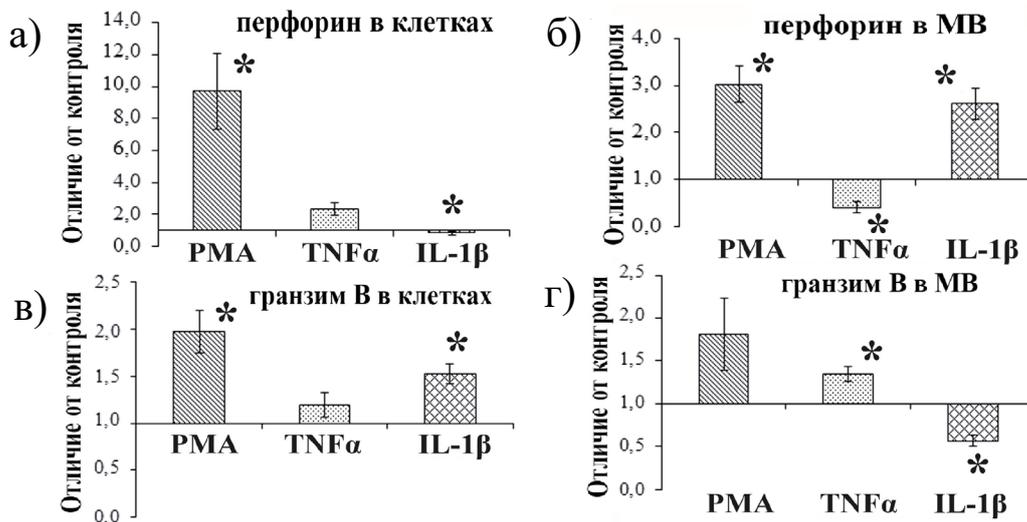


Рисунок 19 - Содержание перфорина и GrzB в лизатах клеток линии NK-92 (а, в) и их МВ (б, г), полученных при спонтанном культивировании клеток и в присутствии индукторов

Культивирование в присутствии TNF $\alpha$  приводило к увеличению содержания GrzB и снижению содержания перфорина в МВ, полученных от клеток линии NK-92 (Рисунок 19 б,г). Установлено сниженное содержание GrzB и повышенное содержание перфорина в МВ клеток линии NK-92, прокультивированных с IL-1 $\beta$  по сравнению с

МВ от нестимулированных НК-клеток (Рисунок 19 б,г). Полученные результаты свидетельствуют о наличии цитотоксических белков в МВ и изменении их состава в зависимости от влияния индукторов на клетки-источники МВ, что может вносить вклад в дистантную регуляцию цитотоксичности НК-клеток.

**Цитотоксическая функция клеток линии НК-92 в отношении клеток трофобласта.** Основной функцией НК-клеток, отражающей степень их зрелости, является цитотоксичность. Проанализировано содержание GrzB, прокаспазы 3 и активного фрагмента каспазы 3 в клетках трофобласта линии JEG-3 после контактного и дистантного сокультивирования с клетками линии НК-92. После контактного сокультивирования GrzB выявлен в клетках линии JEG-3 (Рисунок 20 а).

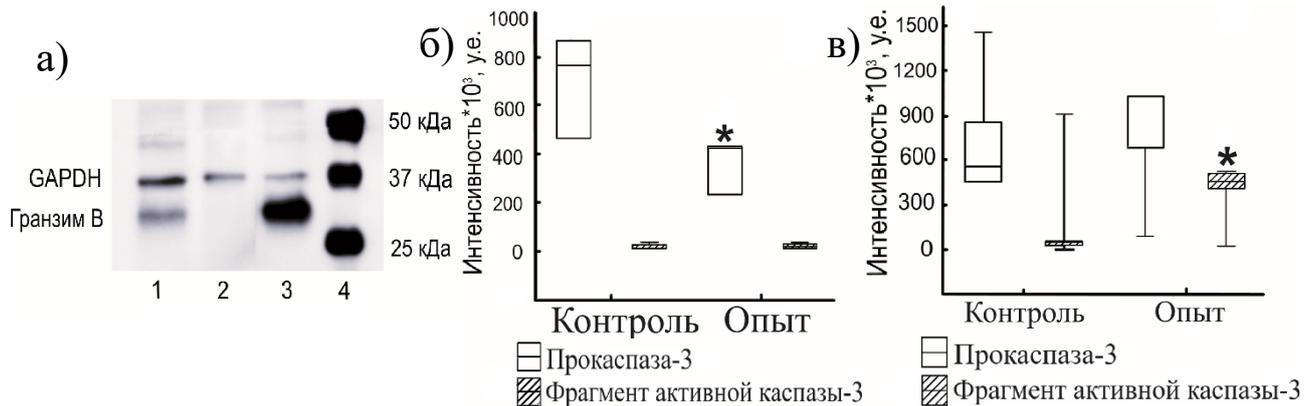


Рисунок 20 - Содержание GrzB, прокаспазы 3 и каспазы 3 в клетках трофобласта линии JEG-3 после сокультивирования с клетками линии НК-92. (а) Иммуноблот, демонстрирующий содержание GrzB в клетках линии JEG-3 после контактного сокультивирования с клетками линии НК-92: 1 - клетки линии JEG-3 после совместного культивирования с клетками линии НК-92; 2 - интактные клетки линии JEG-3; 3 - интактные клетки линии НК-92; 4 - маркеры молекулярной массы. Содержание каспазы 3 и прокаспазы 3 в клетках линии JEG-3 после дистантного сокультивирования (б) и после контактного сокультивирования (в)

После дистантного сокультивирования в клетках линии JEG-3 GrzB не выявлен, содержание прокаспазы-3 было снижено, а содержание фрагмента активной каспазы-3 не отличалось от показателя контрольных образцов клеток линии JEG-3 (Рисунок 20 б). После контактного сокультивирования установлено повышенное по сравнению с контролем содержание фрагмента активной каспазы-3 в клетках линии JEG-3 (Рисунок 20 в). Полученные результаты указывают на индукцию гибели клеток трофобласта НК-клетками только в случае контактного взаимодействия.

Естественные киллеры могут индуцировать рецептор-опосредованный механизм индукции гибели клеток-мишеней. Для оценки возможных изменений экспрессии НК-клетками проапоптотических рецепторов в результате взаимодействия с клетками трофобласта в работе оценена экспрессия Fas, FasL, TRAIL, DR4, DR5, DcR1 и CD107a клетками линии НК-92. Установлено, что интенсивность экспрессии TRAIL, DR5 и DcR1 клетками линии НК-92 также была снижена после контактного взаимодействия с клетками трофобласта по сравнению с интенсивностью экспрессии интактных НК-клеток (Рисунок 21).

Цитокины микроокружения могут оказывать влияние на жизнеспособность клеток трофобласта, а также стимулировать НК-клетки к реализации цитотоксичности.

В связи с этим нами предварительно оценено влияние цитокинов на жизнеспособность клеток трофобласта линии JEG-3. Установлено, что относительное количество погибших клеток линии JEG-3 по сравнению с их спонтанной гибелью было выше в присутствии цитокинов в следующих концентрациях: IL-1 $\beta$  (100Ед/мл и 1000Ед/мл,  $p < 0,05$ ), IL-6 (1нг/мл, 2,5нг/мл, 4нг/мл,  $p < 0,05$ ), IFN $\gamma$  (1000 Ед/мл,  $p < 0,01$ ), IL-4 (1нг/мл, 10нг/мл, 20нг/мл,  $p < 0,01$ ), TGF $\beta$  (5нг/мл, 10нг/мл,  $p < 0,05$ ), bFGF (1нг/мл, 10нг/мл, 20 нг/мл,  $p < 0,05$ ), PLGF (20нг/мл,  $p < 0,01$ ).

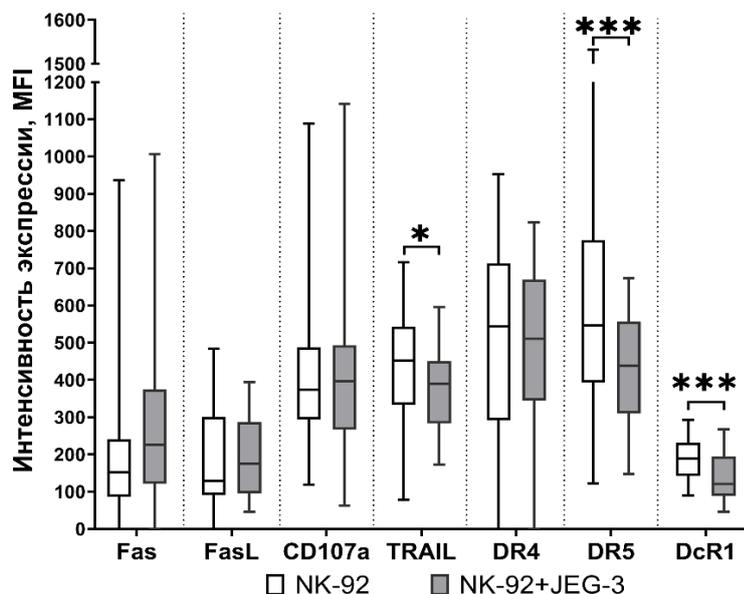


Рисунок 21 - Интенсивность экспрессии клетками линии NK-92 рецепторов и лигандов, связанных с цитотоксической функцией, в модели реализации NK-клетками цитотоксической активности

Далее нами был оценен эффект, который цитокины оказывали на цитотоксичность клеток линии NK-92 к клеткам трофобласта. Показано, что в присутствии цитокинов IL-1 $\beta$  ( $p < 0,05$ ), IL-6 ( $p < 0,01$ ), IFN $\gamma$  ( $p < 0,01$ ), IL-8 ( $p < 0,05$ ), IL-4 ( $p < 0,001$ ), TGF $\beta$  ( $p < 0,01$ ), bFGF ( $p < 0,001$ ) во всех использованных концентрациях, а GM-CSF в концентрации (1000 Ед/мл,  $p < 0,05$ ), и NK-клеток гибель клеток трофобласта возрастала. Отмечено, что в присутствии NK-клеток и PLGF в концентрации 1нг/мл и 5нг/мл гибель клеток линии JEG-3 была ниже спонтанной гибели.

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, насколько указанные цитокины влияли на NK-клетки. В связи с этим нами рассмотрены варианты эксперимента, в которых жизнеспособность клеток трофобласта на фоне присутствия цитокина отличалась до и после внесения NK-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 спонтанной, однако при совместной инкубации с NK-клетками гибель клеток трофобласта была повышена. Так как представленные цитокины присутствуют в цитокиновом микроокружении маточно-плацентарного комплекса, установленная под их влиянием активация NK-клеток может отражать участие популяции NK-клеток с цитотоксическим потенциалом в сдерживании чрезмерной инвазии клеток трофобласта. Это предположение подкрепляется данными, полученными с использованием КС 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 22). 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 22).

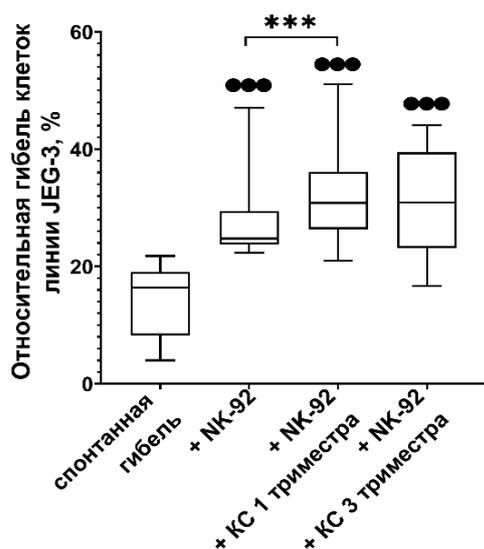


Рисунок 22 - Относительная гибель клеток трофобласта линии JEG-3 в присутствии клеток линии NK-92 и КС ворсин хориона I и III триместров. Статистическая значимость отличия от спонтанной гибели клеток линии JEG-3: \*\*\* -  $p < 0,001$

Так как после длительного контактного сокультивирования с клетками трофобласта линии JEG-3 NK-клетки изменяли фенотип и экспрессию транскрипционных факторов, в работе также оценена их цитотоксическая функция в стандартной модели с использованием клеток линии K562. Установлено, что после 96 часов сокультивирования клетки линии NK-92 остаются способны вызывать гибель клеток-мишеней. Установлено, что цитотоксическая активность клеток линии NK-92 после сокультивирования с клетками трофобласта снижена по сравнению с таковой в случае использования интактных NK-клеток (Рисунок 23).

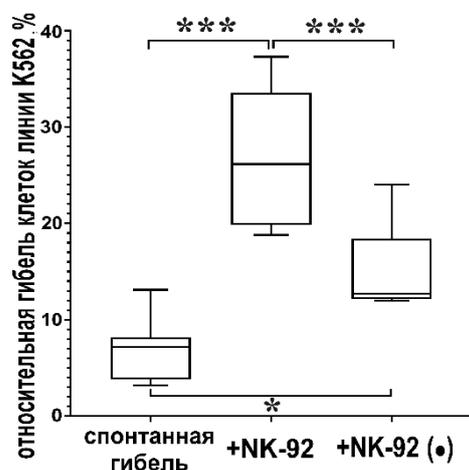


Рисунок 23 - Гибель клеток линии K-562 после инкубации с интактными клетками линии NK-92 (+NK-92) и клетками линии NK-92, предварительно прокультивированными с клетками трофобласта линии JEG-3 (+NK-92 (•))

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 длительного сокультивирования с клетками трофобласта (Рисунок 24). Установлено, что интенсивность экспрессии GrzA клетками линии NK-92 была снижена после культивирования в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3 относительно монокультуры NK-клеток (Рисунок 24 а). Цитокины IL-15, IL-18, IL-10, IFN $\gamma$ , 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 24 а).

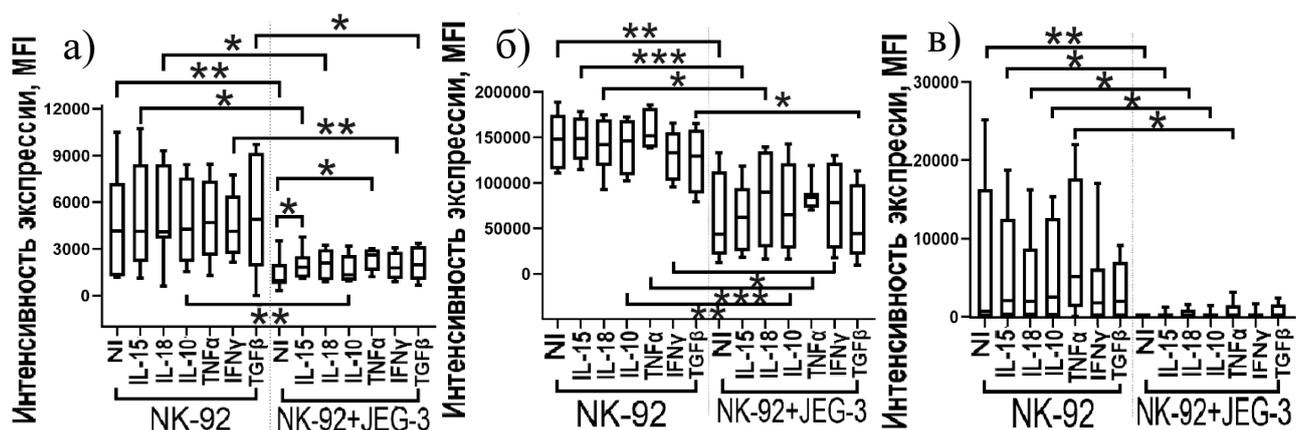


Рисунок 24 - Интенсивность экспрессии GrzA (а), GrzB (б), перфорина (в) в клетках линии NK-92 после культивирования в течение 96 часов в присутствии цитокинов IL-15, IL-18, IL-10, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  или TGF $\beta$ . NI - культивирование без индукторов

Цитокины IL-15 и TNF $\alpha$  в сокультуре клеток линии NK-92 и клеток трофобласта линии JEG-3 стимулировали повышение интенсивности экспрессии GrzA в NK-клетках по сравнению с параметром в сокультуре без индукторов (Рисунок 24 а). 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 24 б). 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 24в). Так как для dNK-клеток характерно сниженное по сравнению в pNK-клетками содержание GrzB и перфорина, полученные нами результаты подтверждают предположение о вкладе клеток трофобласта в приобретение естественными киллерами характеристик dNK-клеток. По-видимому, это влияние носит динамический характер, на которое могут воздействовать факторы микроокружения, в частности, цитокины.

Также был проведен анализ количества клеток трофобласта, содержащих цитотоксические белки после взаимодействия с NK-клетками. Установлено, что 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 25 а). Только 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, прокультивированными в присутствии клеток линии NK-92, но без цитокинов (Рисунок 25 а). Так как в присутствии TGF $\beta$  содержание GrzA в NK-клетках в условиях сокультуры не было снижено, вероятно, TGF $\beta$  поддерживает продукцию GrzA NK-клетками и транспортировку его в клетки трофобласта. 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, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  или TGF $\beta$  по сравнению с клетками линии JEG-3, прокультивированными в присутствии цитокинов (Рисунок 25 б). Добавление IL-10 или IFN $\gamma$  к сокультуре клеток трофобласта линии JEG-3 и клеток линии NK-92 приводило к повышению количества клеток трофобласта, содержащих GrzB, относительно сокультуры без цитокинов (Рисунок 25 б).

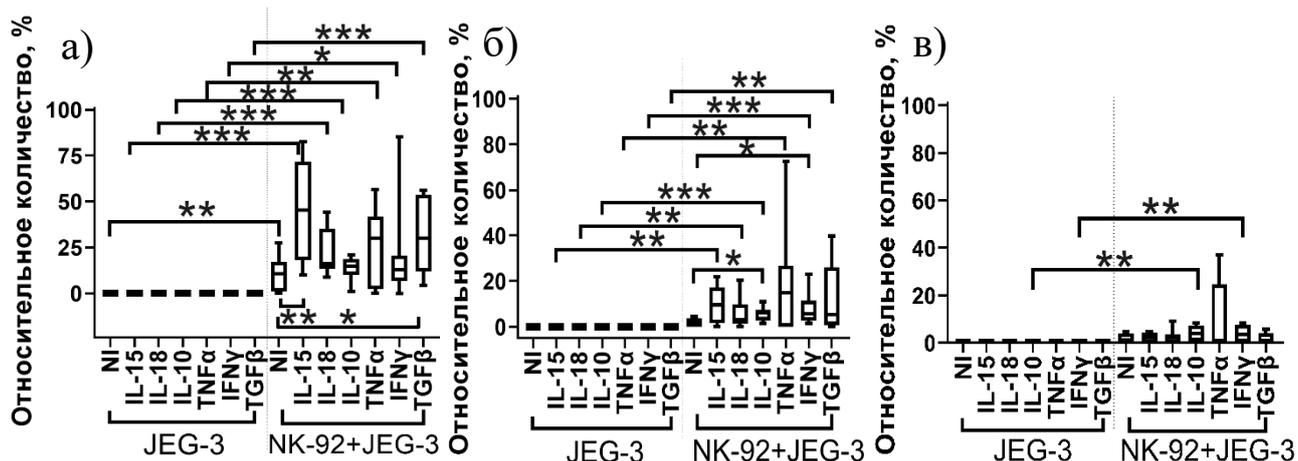


Рисунок 25 - Относительное количество клеток линии JEG-3, содержащих GrzA (а), GrzB (б), перфорин (в) после культивирования в течение 96 часов в присутствии NK-клеток и цитокинов IL-15, IL-18, IL-10, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  или TGF $\beta$ . NI - культивирование без индукторов

Относительное количество клеток трофобласта линии JEG-3, содержащих перфорин, было повышено после культивирования в присутствии клеток линии NK-92 и цитокинов IL-10 или IFN $\gamma$  относительно клеток трофобласта, прокультивированных в присутствии этих цитокинов в монокультуре (Рисунок 25 в), что подтверждает роль цитокинов в стимулировании цитотоксичности NK-клеток в отношении клеток трофобласта.

Установлено, что клетки линий NK-92 и JEG-3 экспрессируют белок-ингибитор сериновых протеаз - серпин В9, который необратимо связывается с GrzB и приводит к его инактивации. Интенсивность экспрессии серпина В9 в клетках линии NK-92 снижена в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3 относительно монокультуры (Рисунок 26 а), этот эффект сохранялся в присутствии цитокинов IL-15, IL-18 или TGF $\beta$  (Рисунок 26 а), что согласуется с результатами о снижении содержания GrzA и GrzB в NK-клетках после сокультивирования с трофобластом.

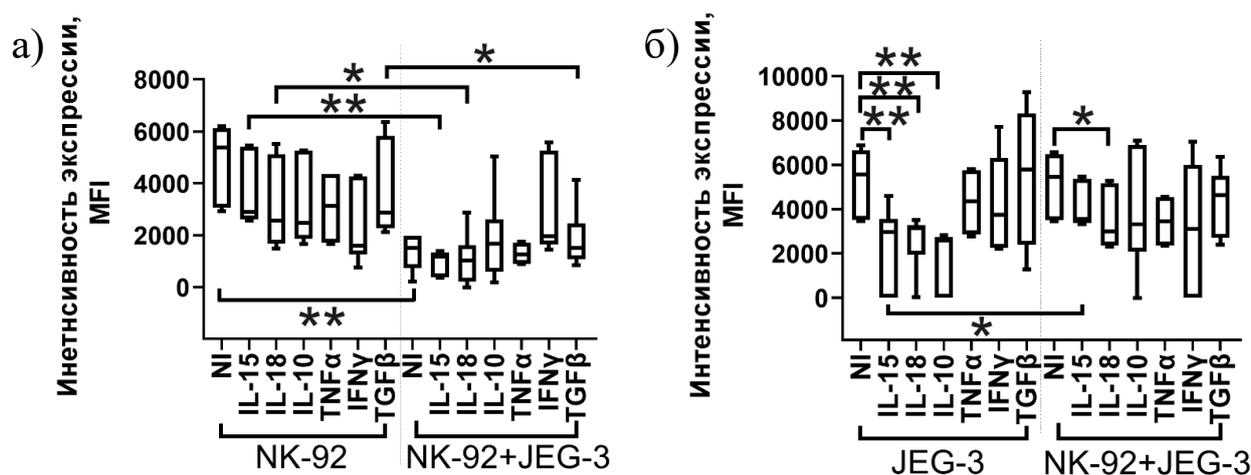


Рисунок 26 - Интенсивность экспрессии серпина В9 в клетках линии NK-92 (а) и клетках линии JEG-3 (б) после культивирования в течение 96 часов в присутствии цитокинов IL-15, IL-18, IL-10, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  или TGF $\beta$ . NI - культивирование без индукторов

Интенсивность экспрессии серпина В9 в клетках линии JEG-3 была снижена после культивирования в присутствии цитокинов IL-15, IL-18 или IL-10 относительно

интактных клеток трофобласта (Рисунок 26 б). 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 26 б). Добавление IL-18 к сокультуре клеток трофобласта и клеток линии NK-92 приводило к снижению интенсивности экспрессии серпина В9 в клетках трофобласта (Рисунок 26 б). Таким образом, клетки трофобласта обладают механизмом защиты от индукции апоптоза NK-клетками, который связан с экспрессией серпина В9. В зависимости от цитокинов микроокружения баланс взаимодействия NK-клеток и клеток трофобласта может меняться как в сторону усиления цитотоксических реакций, так и индукции регуляторной кооперации.

**Цитотоксическая функция NK-клеток периферической крови в отношении клеток трофобласта при физиологической беременности и при ПНБ.** Для проверки результатов, полученных с использованием клеточной линии NK-92, нами была оценена цитотоксическая активность рNK-клеток и spNK-клеток. Установлено, что гибель клеток трофобласта линии JEG-3 как в присутствии NK-клеток в составе мононуклеарной фракции (Рисунок 27 а), так и предварительно изолированных из периферической крови spNK-клеток (Рисунок 27 б) здоровых небеременных и беременных женщин в I триместре, была повышена по сравнению со спонтанной гибелью клеток линии JEG-3.

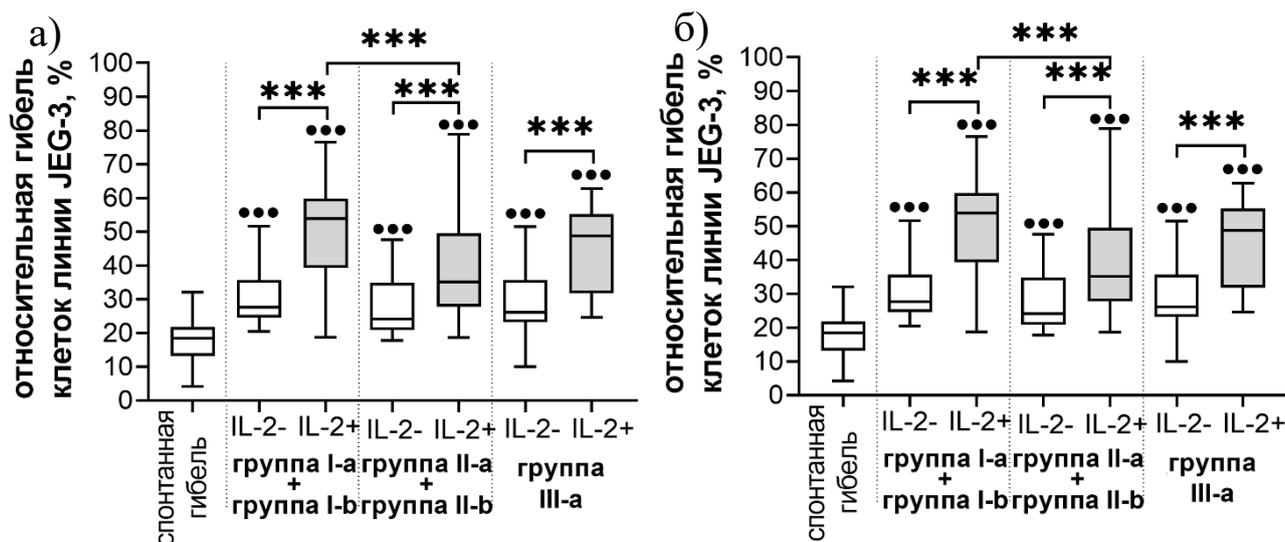


Рисунок 27 - Относительная гибель клеток линии JEG-3 после инкубации с предварительно проинкубированными без IL-2 (IL-2 -) и в присутствии IL-2 (IL-2+): а) рNK-клетками в составе мононуклеарной фракции, б) spNK-клетками, изолированными из мононуклеарной фракции. Статистическая значимость отличия от спонтанной гибели: \*\*\* -  $p < 0,001$

Полученные результаты согласуются с данными, полученными нами с использованием клеток линии NK-92, и свидетельствуют о способности рNK-клеток реализовывать цитотоксичность в отношении клеток трофобласта линии JEG-3. Эти изменения отмечены при использовании мононуклеаров и spNK-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 27 а) или spNK-клеток (Рисунок 27 б), 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 фертильных женщин (группа II-a+группа II-b) (Рисунок 27 а). В случае использования spNK-клеток гибель клеток трофобласта линии JEG-3 была снижена у фертильных женщин (группа II-a + группа II-b) по сравнению с показателями группы небеременных женщин (группа I-a + группа I-b). В то же время spNK-клетки женщин с физиологической беременностью (группа III-a) не демонстрировали различий в цитотоксической активности от spNK-клеток здоровых небеременных женщин (Рисунок 27 б). Установленные различия, вероятно, связаны с модулированием цитотоксичности НК-клеток при беременности, в которой принимают участие мононуклеарные клетки периферической крови, а также секретируемые ими цитокины.

Затем группы небеременных женщин разделили на подгруппы в зависимости от фазы менструального цикла. Установлено, что в случае использования мононуклеарных фракций, содержащих pNK-клетки, предварительно не проинкубированных с IL-2, полученных от здоровых небеременных женщин группы I-a, гибель клеток трофобласта линии JEG-3 была выше, чем в случае использования pNK-клеток женщин с физиологической беременностью (группа III-a) и небеременных женщин группы I-b (Рисунок 28). 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 28). Различий между группами I-b и III-a, а также группами II-b и III-a не выявлено.

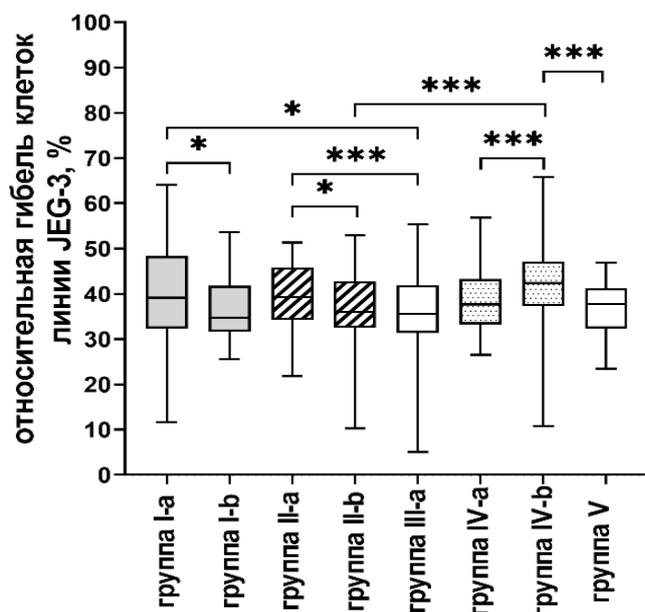


Рисунок 28 - Относительная гибель клеток трофобласта линии JEG-3 после инкубации с мононуклеарными фракциями, содержащими pNK-клетки, групп здоровых небеременных и беременных женщин и женщин с ПНБ

Установлено, что гибель клеток трофобласта линии JEG-3 повышена в случае инкубации с мононуклеарами, полученными от небеременных женщин с ПНБ в пролиферативной фазе цикла (группа IV-b) по сравнению с группой женщин с ПНБ в секреторной фазе цикла (группа IV-a) (Рисунок 28). Кроме того, гибель клеток трофобласта линии JEG-3 была повышена в случае инкубации с мононуклеарами, полученными от женщин группы IV-b по сравнению с соответствующим показателем

для фертильных женщин в секреторной фазе менструального цикла (группа II-b) (Рисунок 28). 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 28).

Таким образом, у небеременных фертильных женщин наблюдается снижение цитотоксической активности НК-клеток в секреторной фазе цикла, что может определять успешность имплантации бластоцисты и наступление беременности. В группе небеременных женщин с ПНБ в анамнезе цитотоксичность возрастает, что в свою очередь может вносить вклад в патогенез потери беременности.

## 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 [Gaynor L.M. et al., 2017, Liu S. et al., 2017, de Mendonca Vieira R. et al., 2020, Wang F. et al., 2021, Du M. et al., 2022, Xu X. et al., 2022], актуально определение механизмов формирования пула dNK-клеток. Полученные в настоящем исследовании данные позволяют утверждать, что миграция НК-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 НК-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 НК-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 НК-клетками (Рисунок 29). Таким образом, можно предположить, что секреторные факторы клеток ворсин хориона могут стимулировать миграцию НК-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 29).

Традиционно увеличение представительства НК-клеток в матке рассматривают в качестве прогностического признака нарушения имплантации и инвазии, что в свою очередь может приводить к развитию ПНБ [Giuliani E. et al., 2014, Liu H. et al., 2021, Тао

Y. et al., 2021, Von Woon E. et al., 2022]. В связи с этим актуально исследование функций НК-клеток матки и их роли в развитии репродуктивных патологий, в том числе ПНБ.

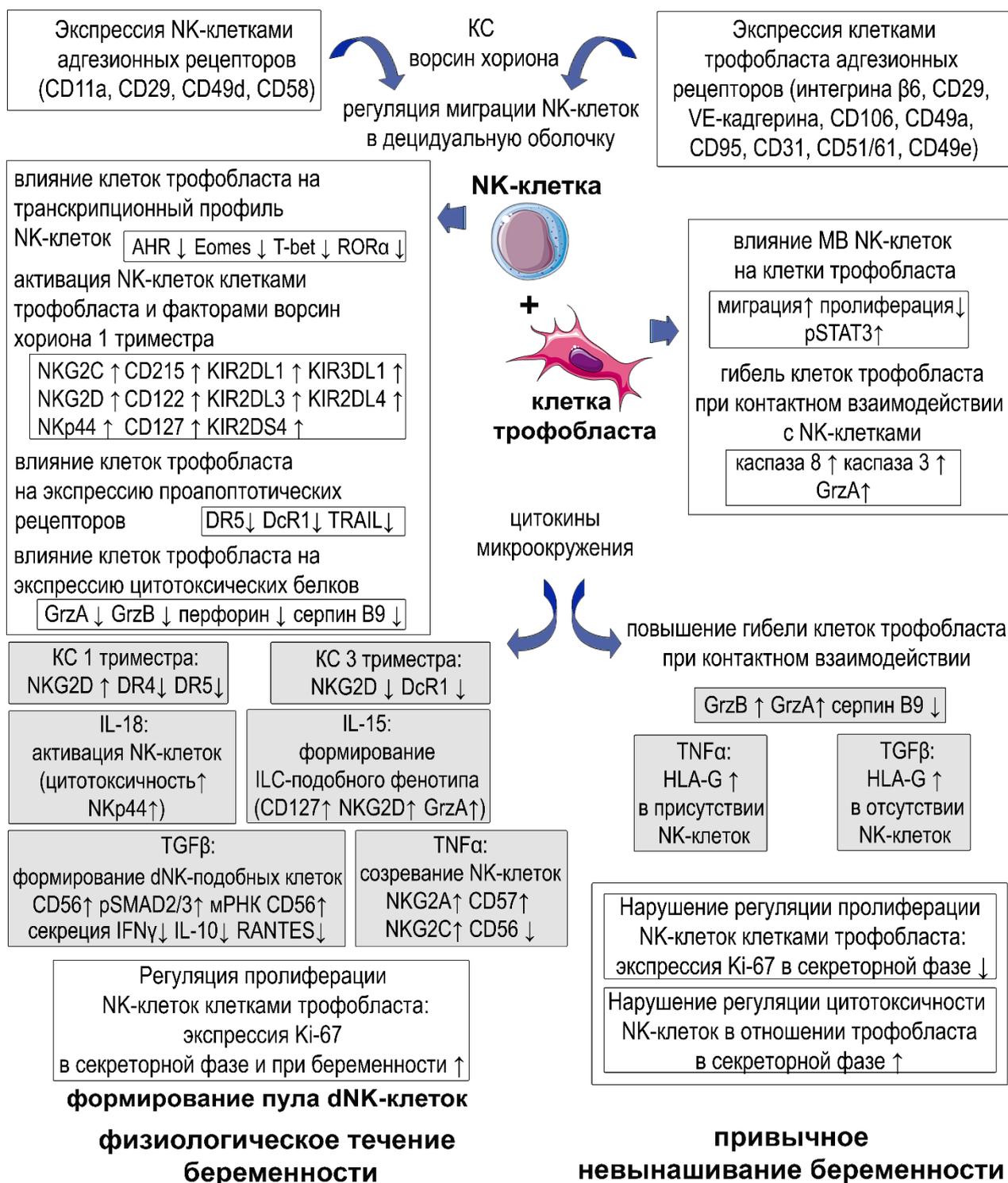


Рисунок 29 – Предполагаемая схема взаимодействия НК-клеток с клетками трофобласта при беременности

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 NK-клеток, включавший активационные и ингибиторные рецепторы и рецепторы, связанные с дифференцировкой NK-клеток, используя клетки линии NK-92. Впервые экспериментально установлено, что в случае длительного культивирования с клетками трофобласта линии JEG-3 фенотип NK-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 [Saito S. et al., 2008, Huhn O. et al., 2020, Whettlock E.M. et al., 2022], а в децидуальной оболочке выявлены разные популяции ILC [Vacca P. et al., 2019, Huhn O. et al., 2020, Pelosi A. et al., 2020]. Полученные в настоящем исследовании данные указывают на то, что клетки трофобласта могут стимулировать трансформацию NK-клеток и сближать их с другими популяциями ILC.

В работе продемонстрировано, что TGF $\beta$  является цитокином, секретируемым 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 секретируют dNK-клетки и pNK-клетки при беременности [Higuma-Myojo S. et al., 2005, Hu Y. et al., 2006, Chiba H. et al., 2016, Du M. et al., 2022, Liu J. et al., 2022], эти цитокины влияют не только на клетки трофобласта, но и на активность NK-клеток [Taub D.D. et al., 1995, Loetscher P. et al., 1996, Maghazachi A.A. et al., 1996, Driessler F. et al., 2004, Sharma S. et al., 2016]. Соответственно, снижение их секреции отражает возможный механизм регуляции количества NK-клеток в децидуальной оболочке и их функционального состояния под влиянием цитокинов клеток трофобласта.

Взаимодействие NK-клеток с клетками трофобласта приводит не только к изменениям фенотипа NK-клеток, но затрагивает и активацию каскадов внутриклеточной передачи сигнала. Впервые в настоящей работе экспериментально продемонстрировано, что в NK-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<sup>+</sup> ILC3, и

ROR $\alpha$ , регулирующего формирование популяции ИС2 (Рисунок 29). Полученные данные указывают на влияние клеток трофобласта на процесс дифференцировки НК-клеток. Однако так как границы популяции dNK-клеток и ИС 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 ИЛ-15 и ИЛ-18. В настоящей работе показано, что в присутствии клеток трофобласта ИЛ-15 повышал экспрессию клетками линии НК-92 рецепторов NKG2D и CD127, что указывает на формирование ИС-подобного фенотипа. В присутствии клеток трофобласта цитокин ИЛ-18 стимулировал экспрессию клетками линии НК-92 рецептора NKp44, который по данным литературы также присутствует на dNK-клетках и других ИС [Siewiera J. et al., 2015, Simoni Y. et al., 2018, Takahashi H. et al., 2018]. Так как нами установлено, что в присутствии ИЛ-15 или ИЛ-18 содержание мРНК гена *NCAMI*, кодирующего CD56, в НК-клетках не изменялось, был сделан вывод о необходимости контактного взаимодействия с клетками трофобласта для ИС-трансформации.

В работе продемонстрировано, что провоспалительный цитокин TNF $\alpha$  в случае воздействия на НК-клетки вызывал снижение содержания в них мРНК гена *NCAMI*, кодирующего CD56, а также стимулировал цитотоксичность НК-клеток. При ПНБ НК-клетки секретируют TNF $\alpha$  [Liu J. et al., 2022]. Полученные нами данные согласуются с представлением о провоспалительной трансформации НК-клеток при ПНБ. Однако в присутствии клеток трофобласта TNF $\alpha$  стимулировал экспрессию НК-клетками как рецептора активации NKG2C, так и ингибиторного рецептора NKG2A (Рисунок 29). 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 НК-92. Продемонстрировано, что КС I триместра стимулируют экспрессию активационного рецептора NKG2D НК-клетками в присутствии клеток трофобласта, в то время как в присутствии растворимых факторов ворсин хорионов III триместра экспрессия НК-клетками этого рецептора снижена (Рисунок 29). Выявленная динамика экспрессии рецептора активации NKG2D свидетельствует о стимуляции активации НК-клеток гуморальными факторами в начале беременности. Это предположение подкрепляется установленной повышенной цитотоксической активностью клеток линии НК-92 в отношении клеток трофобласта в модели *in vitro* в присутствии КС ворсин хориона I триместра беременности.

Для проверки результатов, полученных на клеточной линии НК-92, в настоящей работе был проанализирован фенотипический профиль рНК-клеток. Нам удалось установить, что изменения фенотипа рНК-клеток частично воспроизводят изменения, показанные для клеток линии НК-92. Так, в присутствии клеток трофобласта и ИЛ-18, секреция которого установлена для клеток плаценты, экспрессия активационного рецептора NKp44 рНК-клетками фракций мононуклеаров здоровых небеременных женщин была повышена, что было продемонстрировано и для клеток линии НК-92. В

то же время, в присутствии TGF $\beta$  клетки трофобласта вызывали снижение экспрессии активационных рецепторов NKp44 и KIR2DS4 и экспрессии CD56 pNK-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 [Ding J. et al., 2021].

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 pNK-клетки здоровых небеременных и беременных женщин, а также женщин с ПНБ. Впервые установлено, что клетки трофобласта подавляют пролиферацию pNK-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 29).

В настоящем исследовании впервые продемонстрировано, что в присутствии клеток трофобласта pNK-клетки женщин с ПНБ в секреторной фазе цикла в меньшей степени экспрессируют CD56, чем pNK-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 pNK-клетками здоровых женщин и пациенток с ПНБ в присутствии клеток трофобласта. Соответственно, подавление пролиферации популяций NK-клеток со стороны клеток трофобласта может является 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 NK-клеток клеткам трофобласта. Неотъемлемым фрагментом дистантного взаимодействия клеток являются МВ. В работе продемонстрировано, что клетки линии NK-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 NK-клетками цитотоксической активности. Продемонстрировано, что МВ NK-клеток стимулируют миграцию клеток трофобласта с участием фактора STAT3 (Рисунок 29). Экстраполируя полученные данные на физиологические процессы, можно предполагать, что помимо регуляции клетками трофобласта формирования пула dNK-клеток, непосредственно NK-клетки могут контролировать инвазию трофобласта с участием МВ.

В проведенном исследовании впервые разработана и апробирована модель оценки цитотоксической активности NK-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 NK-92 и pNK-клеток можно предположить, что взаимодействие NK-клеток с клетками трофобласта не приводит к полной утрате естественными киллерами цитотоксических свойств. Кроме того, цитокины преимущественно стимулировали цитотоксическую активность NK-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 [Straszewski-Chavez S.L. et al., 2005, Ferretti C. et al., 2007], который в свою очередь снижает цитотоксичность NK-клеток [Kalkunte S.S. et al., 2009, Wallace A.E. et al., 2012].

Продемонстрировано, что естественные киллеры линии NK-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 NK-92 в случае контактного взаимодействия с клетками трофобласта может отражать способность клеток трофобласта ингибировать отдельные пути реализации цитотоксичности NK-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 NK-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 29). 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 перфорина, 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 [Liu J. et al., 2022], 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 29). Полученные данные отражают определенную способность клеток трофобласта к защите от активности естественных киллеров.

В диссертационном исследовании оценена цитотоксическая активность рНК-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 рНК-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 рНК-клеток была повышена. Таким образом, в работе экспериментально продемонстрировано, что ПНБ ассоциировано с нарушением функциональных взаимодействий НК-клеток с клетками трофобласта (Рисунок 29).

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 НК-клеток в матку, а также вызывают изменения рецепторного профиля НК-клеток и экспрессию ими транскрипционных факторов, сближая их с dNK-клетками и другими ИС, 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 НК-клеток через трофобластический барьер и стимулируют их цитотоксическую активность. Можно предположить, что сохранение цитотоксичности НК-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 НК-клетки. Результаты диссертационной работы позволяют говорить о более сложном взаимодействии НК-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» НК-клеток с клетками трофобласта, в котором НК-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 НК-клеток. В связи с этим представляет интерес исследование молекулярных и эпигенетических механизмов взаимодействия НК-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 НК-клетками характеристик клеток смежных линий дифференцировки лимфоцитов врожденного иммунитета. Перспективно рассмотрение механизмов, обеспечивающих трансдифференцировку НК-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 НК-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 персонализированный 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 NK-92 через трофобласт.

2. Взаимодействие клеток линии NK-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 NK-92 в присутствии клеток трофобласта частично воспроизводятся в модели с использованием НК-клеток периферической крови.

3. Влияние клеток трофобласта на клетки линии NK-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<sup>+</sup> NKp44<sup>+</sup> NKG2D<sup>+</sup>, 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<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> и CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> НК-клеток периферической крови снижена в присутствии клеток трофобласта, что отражает универсальный ингибирующий эффект клеток трофобласта в отношении НК-клеток.

6. Клетки линии NK-92 секретируют цитокины  $IFN\gamma$ , IL-10 и RANTES и образуют микровезикулы, содержащие цитотоксические белки GrzB и перфорин. Микровезикулы клеток линии NK-92 стимулируют миграцию и подавляют пролиферацию клеток трофобласта, что сопровождается фосфорилированием белка STAT3 и отражает способность NK-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 NK-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 NK-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 NK-клеток в пролиферативной фазе цикла. При ПНБ цитотоксичность NK-клеток периферической крови в отношении клеток трофобласта линии JEG-3 повышена в секреторной фазе менструального цикла по сравнению с цитотоксичностью NK-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 NK-клеток, а также определяют изменения ими фенотипических характеристик. Взаимодействие NK-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 NK-клеток рекомендуется проводить подбор клеток-мишеней, используемых в моделях *in vitro*, приближенных по своим характеристикам к клеткам, выступающим в качестве мишеней для NK-клеток *in vivo*. Для определения функционального статуса NK-клеток рекомендуется дополнять оценку непосредственно цитотоксической активности NK-клеток определением их секреторной активности и формирования ими микровезикул, а также определением пролиферативной активности в присутствии клеток-мишеней.

2. Рекомендуется оценивать цитотоксическую активность NK-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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. **Mikhailova, V.A.** Peculiarities of NK cells differentiation: CD56dim and CD56bright NK cells at pregnancy and in non-pregnant state / V.A. Mikhailova, K.L. Belyakova, S.A. Selkov, D.I. Sokolov // *Medical Immunology (Russia)*. – 2017. – Vol.19, №1. – P. 19-26.
2. **Михайлова, В.А.** Взаимодействие НК-клеток и клеток трофобласта. Методические аспекты / В.А. Михайлова, Д.О. Баженов, М.Е. Беликова, Викнянщук А.Н., Коган И.Ю., Сельков С.А., Соколов Д.И. // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. – 2018. – №2. – С.91-97. *версия: Mikhailova, V.A. Interactions of NK cells and trophoblast cells. methodological aspects / V.A. Mikhailova, D.O. Bazhenov, M.E. Belikova, A.N. Viknyanshchuk, I.Y. Kogan, S.A. Sel'kov, D.I. Sokolov // Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2018. – Vol.165, №4. – P. 548-553.
3. **Mikhailova, V.A.** Evaluation of microvesicles formed by natural killer (NK) cells using flow cytometry / V.A. Mikhailova, K.L. Belyakova, L.P. Vyazmina, A.R. Sheveleva, S.A. Selkov, D.I. Sokolov // *Medical Immunology (Russia)*. – 2018. – Vol.20. – P. 251-254.
4. Sokolov, D.I. Phenotypic and functional characteristics of microvesicles produced by natural killer cells / D.I. Sokolov, K.L. Markova, **V.A. Mikhailova**, L.P. Viazmina, Y.P. Milyutina, A.R. Kozyreva, A.A. Zhdanova, D.A. Malygina, K. Onohin, A.N. Ivanova, A.V. Korenevsky, S.A. Selkov // *Medical Immunology (Russia)*. – 2019. – Vol.21, №4. – P. 669 - 688.
5. **Михайлова, В.А.** Цитотоксическая активность НК-клеток периферической крови в отношении клеток трофобласта при беременности / Михайлова, В.А., Баженов Д.О., Вязьмина Л.П., Агнаева А.О., Беспалова О.Н., Сельков С.А., Соколов Д.И. // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. – 2018. – №4. – С.254-261. *версия: Mikhailova, V.A. Cytotoxic activity of peripheral blood NK cells towards trophoblast cells during pregnancy / V.A. Mikhailova, D.O. Bazhenov, L.P. Viazmina, A.O. Agnaeva, O.N. Bepalova, S.A. Selkov, D.I. Sokolov // Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2019. – Vol.166. – P. 567-573.
6. Милютин, Ю.П. Роль каспаз в проявлении цитотоксичности клеток НК-92 в различных моделях их сокультивирования с клетками трофобласта / Ю.П. Милютин, **В.А. Михайлова**, К.М. Пятыхина, Е.С. Демидова, Д.А. Мальгина, Т.Е.Тертычная, А.В. Арутюнян, Д.И. Соколов, С.А. Сельков // *Биохимия*. – 2019. – Т. 84, № 10. – С. 1460-1472. *версия: Milyutina, Y.P. Role of caspases in the cytotoxicity of NK-92 cells in various models of coculturing with trophoblasts / Y.P. Milyutina, V.A. Mikhailova, K.M. Pyatygina, E.S. Demidova, D.A. Malygina, T.E. Tertychnaia, A.V. Arutjunyan, D.I. Sokolov, S.A. Selkov // Biochemistry (Moscow)*. – 2019. – Vol.84, №10. – P. 1460-1472.
7. **Mikhailova, V.A.** Changes in expression of Ki-67, CD16 and CD56 by natural killer cells from peripheral blood mononuclear cells in the setting of recurrent miscarriage after *in vitro* culturing in the presence of trophoblast cells and IL-2 / V.A. Mikhailova, E.V. Khokhlova, D.O. Bazhenov, A.O. Agnaeva, A.R. Kozyreva, O.N. Bepalova, S.A. Selkov, D.I. Sokolov // *Cytotechnology*. – 2019. – Vol. 71, №4. – P. 861-871.
8. Bazhenov, D.O. Receptor expression by JEG-3 trophoblast cells in the presence of placenta secreted factors / D.O. Bazhenov, K.N. Furaeva, O.I. Stepanova, L.P. Viazmina, A.R. Sheveleva,

E.V. Khokhlova, **V.A. Mikhailova**, S.A. Selkov, D.I. Sokolov // *Gynecological Endocrinology*. – 2019. – Vol.35, №sup 1. – P. 35-40.

9. Sokolov, D.I. NK and trophoblast cells interaction: cytotoxic activity on recurrent pregnancy loss / D.I. Sokolov, **V.A. Mikhailova**, A.O. Agnayeva, D.I. Bazhenov, E.V. Khokhlova, O.N. Beshpalova, A.M. Gzgzryan, S.A. Selkov // *Gynecological Endocrinology*. – 2019. – Vol.35, №sup 1. – P. 5-10.

10. **Михайлова, В.А.** Лимфоциты врожденного иммунитета эндометрия и децидуальной оболочки человека / В.А. Михайлова // *Иммунология*. – 2019. – Vol.40, №3. – P. 83-92.

11. **Mikhailova, V.A.** Differentiation of NK cells. A look through the prism of transcription factors and intercellular messengers / V.A. Mikhailova, D.O. Bazhenov, K.L. Belyakova, S.A. Selkov, D.I. Sokolov // *Medical Immunology (Russia)*. – 2019. – Vol.21, №1. – P. 21-38.

12. **Mikhailova, V.A.** Trophoblast cell influence on peripheral blood natural killer cell proliferation and phenotype in non-pregnant women and women in early pregnancy / V.A. Mikhailova, I.V. Kudryavtsev, M.K. Serebryakova, Y.P. Milyutina, E.S. Demidova, A.N. Panina, D.O. Bazhenov, M.E. Belikova, S.A. Selkov, D.I. Sokolov // *Immunobiology*. – 2020. – Vol.225, №3. – P. 151910.

13. Маркова, К.Л. Использование различных методических подходов для оценки размера и морфологии микровезикул клеточных линий / К.Л. Маркова, А.Р. Козырева, А.А. Горшкова, Е.П. Александрова, М.Э. Березкина, **В.А. Михайлова**, А.Н. Иванова, С.Ю. Капуткина, К.В. Онохин, К.А. Бенкен, С.А. Сельков, Д.И. Соколов // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. – 2020. – №2. – С.129-138. *версия: Markova, K.L. Methodological approaches to assessing the size and morphology of microvesicles of cell lines / K.L. Markova, A.R. Kozyreva, A.A. Gorshkova, E.P. Aleksandrova, M.E. Berezkina, V.A. Mikhailova, A.N. Ivanova, S.Y. Kaputkina, K.V. Onokhin, K.A. Benken, S.A. Sel'kov, D.I. Sokolov // Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2020. – Vol.169, №4. – P. 586-595.

14. Bazhenov, D.O. Characteristics of Natural Killer cell interaction with trophoblast cells during pregnancy / D.O. Bazhenov, E.V. Khokhlova, L.P. Viazmina, K.N. Furaeva, **V.A. Mikhailova**, N.A. Kostin, S.A. Selkov, D.I. Sokolov // *Current Molecular Medicine*. – 2020. – Vol.20, №3. – P. 202-219.

15. Bazhenov, D. The uteroplacental contact zone cytokine influence on NK cell cytotoxicity to trophoblasts / D. Bazhenov, **V. Mikhailova**, I. Nikolaenkov, K. Markova, Z. Salloum, I. Kogan, A. Gzgzryan, S. Selkov, D. Sokolov // *Gynecological Endocrinology*. – 2020. – Vol.36, №S1. – P. S1-S6.

16. **Mikhailova, V.** NK-92 cells change their phenotype and function when cocultured with IL-15, IL-18 and trophoblast cells / V. Mikhailova, E. Khokhlova, P. Grebenkina, Z. Salloum, I. Nikolaenkov, K. Markova, A. Davidova, S. Selkov, D. Sokolov // *Immunobiology*. – 2021. – Vol.226, №5. – P. 152125.

17. Markova, K. Effects of microvesicles derived from NK cells stimulated with IL-1 $\beta$  on the phenotype and functional activity of endothelial cells / K. Markova, **V. Mikhailova**, Y. Milyutina, A. Korenevsky, A. Sirotskaya, V. Rodygina, E. Tyshchuk, P. Grebenkina, A. Simbirtsev, S. Selkov, D. Sokolov // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol.22. – P. 13663.

18. **Mikhailova, V.A.** Phenotypic profile of peripheral blood NK cells under culturing with trophoblast cells and IL-15 and IL-18 cytokines / V.A. Mikhailova, P.V. Grebenkina, E.V. Tyshchuk, A.A. Davydova, V.A. Zagaynova, I.Y. Kogan, S.A. Selkov, D.I. Sokolov // *Medical Immunology (Russia)*. – 2021. – Vol.23, №6. – P. 1383-1388.

19. Тыщук, Е.В. Естественные киллеры: происхождение, фенотип, функции / Е.В. Тыщук, **В.А. Михайлова**, С.А. Сельков, Д.И. Соколов // Медицинская иммунология. – 2021. – Vol.23, №6. – P. 1207-1228.
20. **Mikhailova, V.** Pro- and anti-inflammatory cytokines in the context of NK cell-trophoblast interactions / V. Mikhailova, P. Grebenkina, E. Khokhlova, A. Davydova, Z. Salloum, E. Tyshchuk, V. Zagainova, K. Markova, I. Kogan, S. Selkov, D. Sokolov // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol.23, №4. – P.2387.
21. Баженов, Д. О. Роль цитокинов в поддержании динамики межклеточных взаимодействий НК-клеток и клеток трофобласта / Д.О. Баженов, **В.А. Михайлова**, К.Л. Фураева, Л.П. Вязьмина, Д.И. Соколов, С.А. Сельков // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2021. – №4. – С.217-227. *версия: Bazhenov, D.O. The role of cytokines in maintaining the dynamics of cell-cell interaction between Natural Killer cells and trophoblast cells / D.O. Bazhenov, V.A. Mikhailova, K.L. Furaeva, L.P. Vязьmina, D.I. Sokolov, S.A. Sel'kov // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2022. – Vol.172, №5. – P.622-631.*
22. **Михайлова, В.А.** Модуляция внутривенными иммуноглобулинами взаимодействия НК-клеток и трофобласта / В.А. Михайлова, А.А. Давыдова, Д.О. Баженов, А.А. Ковалева, В.А. Загайнова, И.Ю. Коган, О.Н. Беспалова, А.М. Гзгзян, Д.И. Соколов, С.А. Сельков // Акушерство и гинекология. – 2022. – Т.6. – С. 105-113.
23. Гребенкина, П.В. Децидуальные естественные киллеры и клетки трофобласта: клеточные, гуморальные и молекулярные механизмы взаимодействия / П.В. Гребенкина, **В.А. Михайлова**, А.А. Ошколова, С.О. Вершинина, М.С. Духинова, Д.О. Баженов, С.А. Сельков, Д.И. Соколов // Медицинская иммунология. – 2022. – Т.24, №6. – С. 1085-1108.
24. Sokolov, D. Natural Killer cell derived microvesicles affect the function of trophoblast cells / D. Sokolov, A. Gorshkova, K. Markova, Y. Milyutina, K. Pyatygina, M. Zementova, A. Korenevsky, **V. Mikhailova**, S. Selkov // Membranes. – 2023. – Vol.13, №2. – P. 213

### Патенты

1. Патент на изобретение №2632109 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. Дата государственной регистрации в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 02 октября 2017г.
2. Патент на изобретение №2657433 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. Дата государственной регистрации в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 13 июня 2018г.
3. Патент на изобретение №2768461 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. Дата государственной регистрации в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 24 марта 2022 г.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

КС - кондиционированные среды	ПНБ - привычное невынашивание
МВ - микровезикулы	беременности
мРНК - матричная РНК	УЗИ - ультразвуковое исследование

- ЭКО - экстракорпоральное оплодотворение
- ЭТС - эмбриональная телячья сыворотка
- bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) - фактор роста фибробластов
- CD - кластеры дифференцировки
- DMEM - (Dulbecco's Modified Eagle Medium) модифицированная по способу Дульбекко культуральная среда Игла
- DcR - рецептор-ловушка, связывающий TRAIL (Death decoy Receptor)
- DR - рецептор смерти
- Fas - рецептор суперсемейства TNF $\alpha$
- FasL - лиганд для рецептора Fas, экспрессируемый на поверхности клетки
- FIGO - Международная федерация акушерства и гинекологии (The International Federation of Gynecology and Obstetrics)
- GAPDH - глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа
- GM-CSF - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (Granulocyte - Macrophage Colony-Stimulating Factor)
- Grz - гранзим
- NK-клетки - естественные киллеры (Natural Killer cells)
- NCR - рецепторы естественной цитотоксичности (Natural Cytotoxicity Receptors)
- 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)
- IFN $\gamma$  - интерферон гамма
- IL - интерлейкин (interleukin)
- ILC - лимфоциты врожденного иммунитета (Innate Lymphoid Cells)
- ILT - рецепторы иммуноглобулиноподобные транскрипты (Immunoglobulin-Like Transcript)
- KIR - группа иммуноглобулиноподобных рецепторов NK-клеток (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor)
- MFI - средняя интенсивность флуоресценции (Medium Fluorescence Intensity)
- PLGF - (Placental Growth Factor) плацентарный фактор роста
- PMA - фобол 12-миристат 13-ацетат (Phorbol 12 Myristate 13 Acetate)
- pNK-клетки - NK-клетки периферической крови (decidual Natural Killer cells)
- RANTES - цитокин, регулируемый при активации, экспрессируемый и секретлируемый нормальными Т-лимфоцитами (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted)
- SDF-1 - стромальный клеточный фактор (Stromal cell-Derived Factor-1)
- SMAD - белки внутриклеточной передачи сигнала от TGF $\beta$  (Sma and MAD-related protein)
- spNK-клетки - отсортированные NK-клетки периферической крови (sorted pNK cells)
- STAT - сигнальный белок и активатор транскрипции (Signal Transducer and Activator of Transcription)
- TGF $\beta$  - Трансформирующий фактор роста бета (Transforming Growth Factor beta)
- TNF - фактор некроза опухоли (Tumor Necrosis Factor)
- TRAIL - цитокин семейства факторов некроза опухоли, лиганд, вызывающий апоптоз (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand)
- VCAM - сосудистая молекула клеточной адгезии (Vascular Cell Adhesion Molecule)
- 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)