

Н.А. Хонина<sup>1</sup>, Н.В. Селедцова<sup>2</sup>, М.А. Тихонова<sup>1</sup>, Т.В. Овсянникова<sup>2</sup>, Е.Р. Черных<sup>1</sup>

## СОДЕРЖАНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ЭНДОМЕТРИАЛЬНОЙ ТКАНИ В ДИНАМИКЕ МЕНСТРУАЛЬНОГО ЦИКЛА

<sup>1</sup> НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

<sup>2</sup> Центр новых медицинских технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск)

В работе исследовано содержание  $CD4^+CD25^{+/high}$  и  $CD4^+CD25^+CD127^-$  регуляторных Т-клеток в периферической, менструальной крови и эндометриальной ткани в разные фазы менструального цикла. Показано, что в фазу средней секреции регистрируется увеличение числа регуляторных Т-клеток, при этом в периферической циркуляции возрастает количество  $CD4^+CD25^{+/high}$  клеток, а в эндометриальной ткани нарастает число  $CD4^+CD25^+CD127^-$  клеток.

**Ключевые слова:** регуляторные  $CD4^+CD25^+CD127^-$  Т-клетки, репродукция, гормоны, менструальный цикл

## CONTENTS OF REGULATORY T-CELLS IN PERIPHERAL BLOOD AND ENDOMETRIAL TISSUE IN DYNAMIC OF MENSTRUAL CYCLE

N.A. Khonina, N.V. Seledtsova, M.A. Tikhonova, T.V. Ovsyannikova, E.R. Chernykh

Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk

Center of New Medical Technologies of Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAMS, Novosibirsk

The maintenance of  $CD4^+CD25^{+/high}$  and  $CD4^+CD25^+CD127^-$  regulatory T-cells in a peripheral, menstrual blood and an endometrial tissue in different phases of a menstrual cycle is investigated. It is shown that in a phase of average secretion the number of regulatory T-cells is increased. Thus quantity of  $CD4^+CD25^{+/high}$  increased in peripheral circulation, and in an endometrial tissue number of  $CD4^+CD25^+CD127^-$  cells grew.

**Key words:** regulatory  $CD4^+CD25^+CD127^-$  T-cells, reproduction, hormone, menstrual cycle

По современным представлениям одним из важных условий наступления и сохранения беременности является индукция иммунологической толерантности к аллоантигенам эмбриона [2, 3]. В этом аспекте особое значение отводится регуляторным Т-клеткам, которые представляют собой гетерогенную популяцию клеток, которые участвуют в поддержании периферической толерантности к собственным антигенам, ингибируют ответ на аллоантигены, а также подавляют воспалительную реакцию [8, 15]. Недавно проведенные исследования показали важную роль Т-рег для физиологического течения беременности, что связано с их способностью контролировать Т-клетки, распознающие аллоантигены плода, и ингибировать активацию НК-клеток [3]. В частности, было показано, что физиологическая беременность сопровождается возрастанием численности Т-рег, а осложненное течение беременности (угроза выкидыша) ассоциировано со снижением их количества в циркуляции и децидуальной ткани [12, 15].

Экспрессия рецептора к IL-2 (CD25) является маркером не только естественных регуляторных Т-клеток, но также активированных Т-лимфоцитов, что затрудняет идентификацию естественных Т-рег. Ранее предположение, что экспрессия транскрипционного фактора FoxP3 характерна только для Т-рег, впоследствии также не подтвердилось. В последние годы появились данные, показывающие, что низкая экспрессия рецептора IL-7 (CD127) с коэкспрессией CD25 характерна только для регуля-

торных Т-клеток, что позволяет дифференцировать их от активированных Т-лимфоцитов [6, 11, 13].

Наряду с супрессорной перестройкой иммунитета на системном уровне, наиболее сложные изменения в перивуляторный период происходят в эндометрии. Так, известно, что рецептивность эндометрия повышается в период «открытия имплантационного окна», который соответствует фазе средней секреции менструального цикла. При этом период имплантационной компетентности достигается за счет сложных взаимодействий молекул клеточной адгезии, цитокинов и иммунокомпетентных клеток в эндометрии [1]. Известно, что продукция репродуктивных гормонов значительно меняется в динамике менструального цикла. Вероятно, содержание Т-рег также находится под контролем репродуктивных гормонов, о чем свидетельствуют данные Arruvito с соавторами, которые выявили значимые изменения в содержании циркулирующих  $CD4^+CD25^+$  Т-рег в динамике менструального цикла [4].

Вместе с тем сравнительные исследования содержания  $CD4^+CD25^+CD127^-$  Т-рег в периферической циркуляции и эндометриальной ткани в зависимости от фазы менструального цикла в современной литературе отсутствуют. Целью работы явилось исследование регуляторных Т-клеток в эндометрии, менструальной и периферической крови, что позволит оценить в динамике состояние системного и локального иммунитета у женщин в различные фазы цикла.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

В исследование были включены 17 женщин в возрасте от 23 до 39 лет ( $29,8 \pm 0,8$ ) с регулярным менструальным циклом. У 9 из 17 женщин были роды в анамнезе, у 3 пациенток — медицинские аборт, у 1 женщины — замершая беременность, у 1 женщины — искусственное прерывание беременности, у 3 женщин беременностей не было. На момент исследования женщины не имели острых воспалительных заболеваний любых локализаций. Все манипуляции осуществляли с информированного согласия пациентов. Факт овуляции оценивался с помощью динамической фолликулометрии.

Иммунологическое обследование проводили дважды — в фолликулярную фазу (2–4-й день) и фазу средней секреции (5–7-й день после овуляции) менструального цикла. Для исследования у женщин забирали венозную кровь, менструальную кровь с помощью стерильного шприца и биоптат эндометриальной ткани, который получали путем аспирации с помощью внутриматочного зонда «Пайпель» (на 5–7-й день после овуляции). Биоптаты помещали в холодный физиологический раствор, затем механически измельчали и фильтровали через стальное сито. Затем выделяли мононуклеарные клетки (МНК) в градиенте плотности фиколла-верографина. Количественное содержание регуляторных Т-клеток ( $CD4^+CD25^+CD127^-$ ) оценивали методом проточной цитометрии с использованием коктейля антител (Becton Dickinson, США) с применением программы Cell Quest. В соответствии с инструкцией производителя в число  $CD4^+CD25^+CD127^-$  клеток включались как  $CD127^{low}CD25^{+high}$ , так и  $CD127^{low}CD25^{intermediate}$  субпопуляции. По данным разработчиков метода количественной оценки Т-рег дополнительное исследование экспрессии  $CD127$  помимо  $CD25$  увеличивает выявляемость  $CD25^{intermediate}$  Т-рег. Вследствие этого может быть более чем двукратное увеличение определяемых Т-рег ( $CD4^+CD25^+CD127^-$ ), тогда как при обычном исследовании  $CD25^{intermediate}$  Т-клетки из определения элиминируются. Таким образом, выявляемое нами большее относительное количество

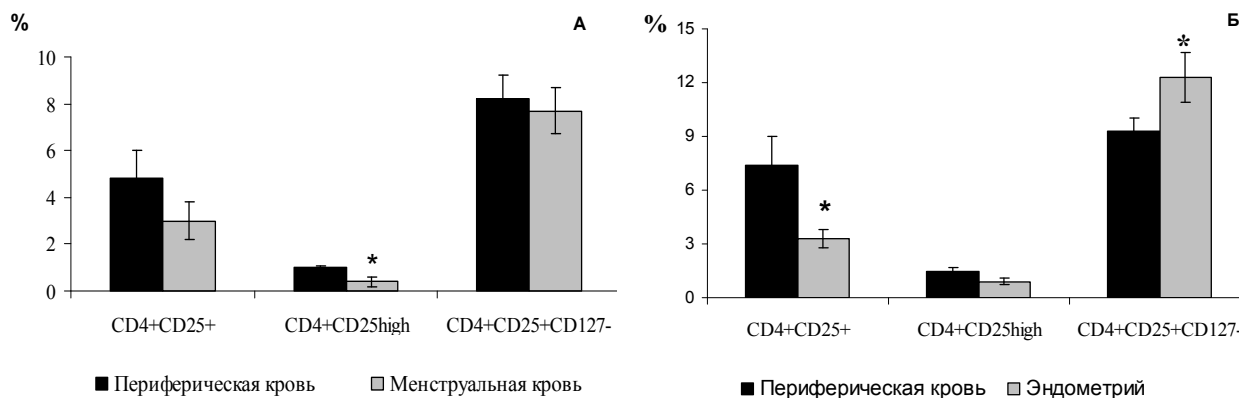
$CD4^+CD25^+CD127^-$  по сравнению с  $CD4^+CD25^+$  связано с особенностями метода и распределения  $CD4^+CD25^+CD127^-$  клеток в отдельном регионе.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программы «STATISTICA 6.0». Сравнение вариационных рядов осуществлялось с помощью непараметрического U-критерия Вилкоксона — Манна — Уитни.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

На первом этапе было проведено сравнительное исследование субпопуляций регуляторных Т-клеток в менструальной и периферической крови в фолликулярной фазе менструального цикла в группе женщин (рис. 1). Как видно из рисунка 1а, в менструальной крови по сравнению с периферической кровью регистрировалась тенденция к более низкому относительному содержанию  $CD4^+CD25^+$  клеток ( $3,0 \pm 0,8$  vs  $4,8 \pm 1,2$  %) и  $CD4^+CD25^+CD127^-$  -клеток ( $7,7 \pm 1,0$  vs  $8,2 \pm 1,0$  %). Более значимые различия регистрировались при исследовании количества  $CD4^+$ -клеток с высоким уровнем экспрессии  $CD25$ -антигена ( $CD4^+CD25^{high}$ ), обладающих наибольшей супрессорной активностью. Так, содержание  $CD4^+CD25^{high}$  клеток в менструальной крови было в среднем в 2,5 раза меньше, чем в периферической крови ( $0,4 \pm 0,2$  vs  $1,0 \pm 0,1$  %,  $p < 0,05$ ). В обзоре литературы отсутствуют какие-либо данные, характеризующие содержание Т-рег в менструальной и периферической крови у женщин в зависимости от фазы менструального цикла. Поэтому полученные нами данные впервые демонстрируют, что в фолликулярной фазе менструального цикла содержание Т-рег преобладает в периферической крови относительно менструальной крови, что в большей степени характерно для  $CD4^+CD25^{high}$  популяции Т-рег.

На следующем этапе оценивали распределение Т-рег в периферической циркуляции и эндометриальной ткани в фазе средней секреции менструального цикла в группе женщин. Как следует из рисунка 1б, в эндометрии по сравнению с периферической кровью содержится досто-



**Рис. 1.** Сравнительный анализ содержания регуляторных Т-клеток в менструальной, периферической крови и эндометрии в фолликулярную фазу (А) и фазу средней секреции (Б) менструального цикла. \* –  $P_U < 0,05$  – достоверность различий между содержанием регуляторных Т-клеток в периферической крови и менструальной крови/эндометрии.

верно меньшее количество CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-клеток ( $3,3 \pm 0,5$  vs  $7,4 \pm 1,6$  %,  $P < 0,01$ ) на фоне преобладания CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>-клеток ( $12,3 \pm 1,4$  vs  $9,3 \pm 0,7$  %,  $P < 0,05$ ). Различия в количестве CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> клеток выявлялись в виде тенденции и также свидетельствовали о снижении их содержания в эндометрии ( $0,9 \pm 0,2$  vs  $1,5 \pm 0,2$  %). Таким образом, в фазе средней секреции менструального цикла, по-видимому, происходит перераспределение регуляторных клеток в сторону преобладания в эндометрии CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> – Т-рег и уменьшения количества клеток, экспрессирующих CD25<sup>+</sup> антиген. Сопоставляя полученные результаты с данными литературы, следует отметить, что у женщин генерация CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Т-рег в периферической крови регистрируется в течение поздней фолликулярной фазы менструального цикла, что коррелирует с пиком эстрадиола, и снижается в лютеиновую фазу [4]. Мы, в свою очередь, показали, что в лютеиновую фазу происходит перераспределение Т-рег в сторону преобладания в эндометрии CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>-клеток. Как известно, в лютеиновую фазу возрастает концентрация прогестерона, продуцируемого желтым телом при овуляторном менструальном цикле, что, теоретически, должно способствовать преобладанию Th2 – ответа и генерации регуляторных Т-клеток. Учитывая, что у всех женщин, включенных в исследование, регистрировался по данным фолликулометрии овуляторный цикл, динамика содержания Т-рег может в большей степени зависеть от уровня репродуктивных гормонов, в частности прогестерона. Об этом свидетельствуют данные о способности прогестерона повышать содержание CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> клеток и продукцию IL-10 [7].

К настоящему времени механизмы индукции толерантности к эмбриону, опосредуемые Т-рег, изучены недостаточно. Ключевым моментом в формировании толерантности может быть индукция экспрессии индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) дендритными клетками, которая запускается Т-рег. Не менее важным условием для имплантации эмбриона является участие Т-рег в подавлении пролиферации аллоантигенреактивных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, усилении продукции иммуносупрессорных цитокинов – IL-10 и TGF-β, а также экспрессии CTLA-4 [14].

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Следует отметить важность проведения дальнейших исследований роли Т-рег в репродуктивном процессе не только с целью получения новых теоретических данных, так и в практических целях. Так, недавно было показано, что аллоиммунизация лимфоцитами партнера может способствовать увеличению содержания CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> в периферической крови у женщин со спонтанными абортными неясной этиологии [9]. Кроме того, работы *in vitro* по влиянию иммуноглобулина на генерацию Т-рег показали значительное увеличение экспрессии mPNC TGF-β, IL-10 и FOXP3 [10]. В

одном из исследований была продемонстрирована способность аналога витамина Д (TX527) непосредственно усиливать супрессорные свойства CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>-клеток [5]. Таким образом, дальнейшее исследование гормонально-опосредованной регуляции Т-рег может способствовать не только более полному пониманию иммунных механизмов патогенеза заболеваний репродуктивного тракта, но и в ближайшем будущем может являться предпосылкой эффективной коррекции выявленных изменений.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ольховская М.А. Биомаркеры «имплантационного окна» // Проблемы репродукции. – 2007. – № 1. – С. 72–77.
2. Хонина Н.А., Тихонова М.А., Дзуцева И.Б., Пасман Н.М. и др. Иммунные дисфункции у женщин с бесплодием неясного генеза и метод их коррекции // Мед. иммунология. – 2010. – Т. 12, № 6. – С. 511–520.
3. Aluvihare V. R., Kallikourdis M., Betz A.G. Regulatory T-cells mediate maternal tolerance to the fetus // Nature Immunology. – 2004. – N 5. – P. 266–271.
4. Arruvito L., Sanz M., Banham A.H., Fainboim L. Expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and FOXP3<sup>+</sup> regulatory T-cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction // J. Immunol. – 2007. – Vol. 178. – P. 2572–2578.
5. Baeke F., Korf H., Overbergh L., Verstuyf A. et al. The vitamin D analog, TX527, promotes a human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> regulatory T cell profile and induces a migratory signature specific for homing to sites of inflammation // J. Immunol. – 2011. – Vol. 186, N 1. – P. 132–142.
6. Bayer A.L., Lee J.Y., de la Barrera A., Surh C.D. et al. A function for IL-7R for CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells // J. Immunol. – 2008. – Vol. 181, N 1. – P. 225–234.
7. Guanping Mao, Junpeng Wang, Youmin Kang, Ping Tai et al. Progesterone Increases Systemic and Local Uterine Proportions of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg Cells during Midterm Pregnancy in Mice // Endocrinology. – 2010. – Vol. 151. – P. 5477–5488.
8. Gueri L.R., Prins J.R., Robertson S.A. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? // Human Reprod. Update. – 2009. – Vol. 1. – P. 1–19.
9. Hui Yang, Lihua Qui, Wen Di, Aiming Zhao et al. Proportional change of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells after lymphocyte therapy in unexplained recurrent spontaneous abortion patients // Fertil. Steril. – 2009. – Vol. 92. – P. 301–305.
10. Kessel A., Ammuri H., Peri R., Pavlotzky E.R. et al. Intravenous immunoglobulin therapy affects T regulatory cells by increasing their suppressive function // J. Immunol. – 2007. – Vol. 179, N 8. – P. 5571–5575.
11. Liu W., Putnam A.L., Xu-Yu Z., Szot G.L. et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> Treg cells // J. Exp. Med. – 2006. – Vol. 203, N 7. – P. 1701–1711.

12. Mei S., Tan J., Chen H., Chen Y. et al. Changes of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells and FOXP3 expression in unexplained recurrent spontaneous abortion patients // Fertil. Steril. – 2010. – Vol. 94, N 6. – P. 2244 – 2247.

13. Seddiki N., Santner-Nanan B., Martinson J. Zunders J. et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells // J. Exp. Med. – 2006. – Vol. 203, N 7. – P. 1693 – 1700.

14. Trabanelli S., Ocadlikova D., Evangelisti C., Parisi S. et al. Induction of regulatory T cells by dendritic cells through indoleamine 2,3-dioxygenase: a potent mechanism of acquired peripheral tolerance // Curr. Med. Chem. – 2011. – Vol. 18, N 15. – P. 2234 – 2239.

15. Winger E.E., Reed J.L. Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> low circulating CD4<sup>+</sup> T-regulatory cell levels predict miscarriage risk in newly pregnant women with a history of failure // Am. J. Reprod. Immunol. – 2011. – Vol. 66, N 4. – P. 320 – 328.

#### Сведения об авторах

**Хонина Наталья Алексеевна** – ведущий научный сотрудник ФБГУ НИИКИ СО РАМН, доктор медицинских наук (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14, НИИКИ; e-mail: nkxonina@mail.ru)

**Селедцова Наталья Владимировна** – научный сотрудник ЦНМТ ИХБФМ СО РАН, кандидат медицинских наук

**Овсянникова Татьяна Викторовна** – руководитель Центра репродуктивного здоровья АНО «ЦНМТ в Академгородке», доктор медицинских наук

**Тихонова Марина Александровна** – ведущий научный сотрудник ФБГУ НИИКИ СО РАМН, кандидат биологических наук

**Черных Елена Рэмовна** – заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии, заместитель директора НИИКИ СО РАМН, чл.-корр. СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор (630110, г. Новосибирск, ул. Б. Хмельницкого, 62, кв. 4; тел.: 8-(383)-228-57-49; e-mail: bmt-novosibirsk@mail.ru)