

Фактор роста плаценты модулирует ответ активированных *in vitro* Т-клеток

Сметаненко Е.А.¹, Леплина О.Ю.¹, Тихонова М.А.¹, Пасман Н.М.², Останин А.А.¹, Черных Е.Р.¹

¹ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ) Россия, 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет (ННИГУ) Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Недавние исследования выявили иммуносупрессивные свойства фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A) и его ключевую роль в опухоль-индуцированной иммуносупрессии. Плацентарный фактор роста (PlGF) является еще одним представителем семейства VEGF, резкое возрастание которого ассоциировано с эффективной иммунной адаптацией при успешной беременности, тогда как низкие концентрации PlGF являются предиктором гестационных осложнений на фоне активации иммунной системы. Ранее нами показано, что активированные Т-клетки экспрессируют рецепторы VEGF 1-го типа (VEGFR-1) и PlGF через связывание с VEGFR-1 ингибирует пролиферацию Т-клеток.

Цель. Дальнейшее изучение влияния PlGF на Т-клеточный ответ *in vitro*.

Материалы и методы. Мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови здоровых доноров стимулировали моноклональными анти-CD3-антителами (α-CD3) в отсутствие и присутствии рекомбинантного PlGF и оценивали продукцию интерлейкина-10 (IL-10), уровень апоптоза и экспрессию ингибиторных рецепторов (PD-1, CTLA-4, Tim-3) в субпопуляциях CD4+ и CD8+ Т-клеток.

Результаты. Активация МНК α-CD3 в присутствии PlGF приводила к возрастанию относительного содержания CD4+ и CD8+ Т-клеток, продуцирующих IL-10. Кроме того, PlGF усиливал апоптоз активированных CD8+ Т-лимфоцитов, не влияя значительно на уровень запрограммированной клеточной гибели CD4+ Т-клеток. Характерно, что активация Т-клеток α-CD3 в присутствии PlGF сопровождалась возрастанием PD-1 экспрессирующих клеток в субпопуляции CD8+ Т-клеток и Tim-3-экспрессирующих клеток среди CD4+ и CD8+ Т-клеток, а также повышением уровня экспрессии PD-1 и Tim-3 на Т-клетках.

Заключение. PlGF способен ингибировать Т-клеточный ответ посредством усиления продукции IL-10 и активационно-индуцированного апоптоза CD8+ Т-клеток, а также экспрессии ингибиторных рецепторов. Учитывая повышенный уровень PlGF при физиологической беременности и его снижение при гестационных осложнениях, полученные данные позволяют предполагать, что ингибиторный эффект PlGF на Т-клеточный ответ может являться еще одним механизмом, обеспечивающим защиту плода от иммунной системы матери.

Ключевые слова: PlGF, Т-клетки, апоптоз, IL-10, ингибиторные рецепторы, PD-1, CTLA-4, Tim-3.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Новосибирской области (проект № 18-44-54005р-а).

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИФКИ (протокол № 107 от 15.06.2018).

✉ Черных Елена Рэмовна, e-mail: ct_lab@mail.ru.

Для цитирования: Сметаненко Е.А., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Пасман Н.М., Останин А.А., Черных Е.Р. Фактор роста плаценты модулирует ответ активированных *in vitro* Т-клеток. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 158–166. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-158-166>.

Placental growth factor exerts modulatory effects on *in vitro* activated T cells

Smetanenko E.A.¹, Leplina O.Yu.¹, Tikhonova M.A.¹, Pasman N.M.², Ostanin A.A.¹, Chernykh E.R.¹

¹ *Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (RIFCI)
14, Yadrintsevskaya Str., Novosibirsk, 630099, Russian Federation*

² *Institute of Medicine and Psychology, Novosibirsk National Research State University
2, Pirogova Str., Novosibirsk, 630090, Russian Federation*

ABSTRACT

Background. Recent studies demonstrated immunosuppressive properties of vascular endothelial growth factor (VEGF-A) and identified VEGF-A as a key mediator of tumor-induced immunosuppression. Placental growth factor (PIGF) is another member of VEGF family in which dramatic elevation is associated with effective immune adaptation in successful pregnancy, whereas low concentrations are related to pregnancy complications resulting from the activation of immune system. Previously, we have shown that activated T cells express VEGF receptor type 1 (VEGFR-1), and PIGF inhibits T cell proliferation in VEGFR-1–dependent manner.

The aim of the present study was to further characterize PIGF effects on T cell responses *in vitro*.

Materials and methods. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors were stimulated with anti-CD3 monoclonal antibodies (a-CD3) in the absence or presence of PIGF and assessed for IL-10 production, programmed cell death and the expression of inhibitory receptors (PD-1, CTLA-4, Tim-3) in CD4+ and CD8+ T cell subsets.

Results. The addition of PIGF to PBMC cultures activated with a-CD3 resulted in increased percentages of IL-10-producing CD4+ and CD8+ T cells. Besides, PIGF promoted CD8+ T cells apoptosis while did not affect programmed cell death within CD4+ T cells. Notable, T cell activation with a-CD3 in the presence of PIGF was accompanied by the enhancement of PD-1-expressing cells in CD8+ T cell subset and Tim-3-expressing cells in both CD4+ and CD8+ T cells, and by the increased expression of PD-1 and Tim-3 on T cells.

Conclusion. Our *in vitro* findings indicate that PIGF can inhibit T cell responses due to the increasing interleukin-10 (IL-10) production, promoting CD8+ T cell apoptosis and enhancing the expression of PD-1 and Tim-3 inhibitory receptors. Given the elevated levels of PIGF in successful pregnancy and its decrease in gestation complications, the obtained data also suggest that PIGF-mediated suppression may be implicated into the governing immune evasion in pregnancy.

Key words: PIGF, T cells, apoptosis, IL-10, inhibitory receptors, PD-1, CTLA-4, Tim-3.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research and the government of Novosibirsk region (Project No. 18-44-54005r-a).

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee of RICFI (Protocol No. 107 of 15.06.2018).

For citation: Smetanenko E.A., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Pasman N.M., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Placental growth factor exerts modulatory effects on *in vitro* activated T cells. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 158–166. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-158-166>.

ВВЕДЕНИЕ

Белки семейства факторов роста эндотелия сосудов (VEGF) играют ключевую роль в формировании новых сосудов в норме и при патологии. Наиболее активным и изученным членом этого семейства является VEGF-A, который опосредует проангиогенную активность через активацию двух рецепторов с тирозин-киназной активностью – VEGFR-1 (Flt-1) и VEGFR-2 (KDR/Flk-1) [1]. Другим фактором с выраженной проангиогенной активностью является фактор роста плаценты (PlGF), который связывается исключительно с VEGFR-1 [2, 3].

Недавние исследования показали, что наряду с проангиогенными свойствами VEGF-A обладает иммуномодулирующим действием, индуцирует накопление регуляторных Т-клеток и миелоидных супрессорных клеток, ингибирует созревание дендритных клеток (ДК) и функции Т-клеток [4] и является ключевым фактором опухоль-индуцированной иммуносупрессии [5]. Иммуномодулирующие эффекты PlGF исследованы в значительно меньшей степени. Известно, что PlGF стимулирует поляризацию макрофагов в M2 направлении, подавляет созревание ДК, а также индуцирует регуляторные В-клетки [3, 6]. Однако влияние PlGF на функции Т-клеток остается неисследованным. Согласно данным литературы, эффект VEGF на Т-лимфоциты опосредуется через VEGFR-2 [7]. В то же время PlGF является селективным лигандом для VEGFR-1, роль которого в регуляции функциональной активности Т-клеток остается неясной.

Изучение иммуномодулирующих свойств PlGF мотивировано возможным участием фактора в ускользании опухоли от иммунного надзора, поскольку повышенный уровень PlGF при большинстве форм рака ассоциирован с дисфункциями иммунных клеток и коррелирует с опухолевой прогрессией [8, 9]. Еще больший интерес вызывает изучение иммуномодулирующей активности PlGF при беременности, которая сопровождается резким возрастанием уровня сывороточного PlGF при физиологическом течении и снижением концентрации PlGF при развитии гестационных осложнений [10].

При беременности иммунная система претерпевает существенную перестройку (так называемую иммунную адаптацию) [11], которая направлена на индукцию толерантности к аллоантигенам плода и предупреждение избыточных воспалительных реакций. Механизмы, лежащие в основе иммунной адаптации, включают деплецию аллоантиген-реактивных Т-клеток, Th1→Th2 переключение и индукцию регуляторных Т-лимфоцитов [11]. Недавние исследования продемонстрировали также роль Т-клеточного истощения в подавлении цитотоксической активно-

сти материнских Т-лимфоцитов [12, 13]. С этой точки зрения иммуномодулирующая активность PlGF может представлять один из механизмов, посредством которого развивающийся плод избегает реакций отторжения со стороны иммунной системы матери.

Недавно нами показано, что активированные Т-лимфоциты экспрессируют VEGFR-1 и связывание PlGF с VEGFR-1 в культурах мононуклеарных клеток ингибирует пролиферацию CD4+ и CD8+ Т-клеток [14]. Целью настоящей работы стало дальнейшее изучение влияния PlGF на Т-клеточный ответ *in vitro*, а именно на продукцию Т-клетками иммуносупрессорных цитокинов (интерлейкина-10, IL-10), апоптоз Т-лимфоцитов и экспрессию ингибиторных рецепторов (PD-1, CTLA-4, Tim-3), опосредующих Т-клеточное истощение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 35 здоровых доноров крови обоего пола в возрасте 20–54 лет. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколла-верографина ($\rho = 1,078$). МНК культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах в среде RPMI-1640, дополненной 10%-й инактивированной сывороткой доноров АВ (IV) группы, 2 мМ HEPES-буфера, 0,3 мг/мл глутамина (все реактивы – производства Sigma-Aldrich, США) и гентамицином (100 мкг/мл) при температуре 37 °С и содержании CO₂ на уровне 5%. Для стимуляции клеток использовали моноклональные анти-CD3 антитела (a-CD3, ICO-90, Медбио-спектр, г. Москва, Россия) в концентрации 1 мкг/мл, PlGF в концентрации 0,1–100 нг/мл (R&D System, США). Интенсивность пролиферации оценивали на 5-е сут по включению ³H-тимидина (1 мкКю/луночка), вносимого за 18 ч до окончания культивирования с использованием жидкостного сцинтилляционного счетчика SL-30 (Intertechnic, Франция).

В отдельной серии экспериментов исследовали влияние нейтрализующих анти-VEGFR-1 антител (a-VEGFR-1) на супрессорный эффект PlGF. Для этого в культуры МНК, стимулированные a-CD3, добавляли PlGF (5 нг/мл) и выращивали в отсутствие и присутствии нейтрализующих a-VEGFR-1 или a-VEGFR-2 антител (Human VEGFR1/Flt-1; VEGFR2/KDR/Flk-1 антитела 2,5 мкг/мл; R&D System, США), вносимых совместно с PlGF либо через 24 ч после начала культивирования.

Продукцию IL-10 оценивали по относительному содержанию IL-10-секретирующих клеток в гейтах CD4+ и CD8+ лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии (BD FACSCalibur) с использовани-

ем а-CD3(PE), CD8+(FITC), CD4(PerCP), IL-10(PE) антител (BD Biosciences, США) в 48-часовых культурах МНК, активированных а-CD3 в отсутствие и присутствии PIGF. Фиксацию и пермеабиллизацию МНК для оценки внутриклеточной экспрессии IL-10 проводили после инкубации клеток с моноклональными антителами против поверхностных антигенов с помощью набора растворов для фиксации/пермеабиллизации Transcription Factor Buffer Set в соответствии с инструкцией (BD Biosciences, США). Анализ проводили в пробах после накопления не менее 30 тыс. событий в регионе Т-клеток.

Апоптоз активированных Т-клеток оценивали цитофлуориметрически. МНК, стимулированные а-CD3 (1 мкг/мл), культивировали в присутствии или отсутствие PIGF (5 нг/мл). Через 48 ч культивирования МНК метили анти-CD4(FITC) или анти-CD8(FITC) антителами (BD Biosciences, США) и затем Annexin V/7-ADD (PE-conjugated Annexin V/7-ADDkit) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. В каждом образце оценивали 10 тыс. событий. Процентное содержание CD4+ и CD8+ Т-клеток, позитивных по аннексину V и (или) 7-ADD, измеряли, используя программное обеспечение CellQuest (BD Biosciences, США).

Экспрессию ингибиторных рецепторов (PD-1, CTLA-4, Tim-3) на Т-клетках оценивали цитофлуориметрически, используя анти-CD4(PE), анти-CD8(FITC), анти-CTLA-4(PE-Cy5), анти-PD-1(APC), анти-TIM-3(PerCP/Cy5.5) и соответствующие контрольные изотип-специфические антитела (BD PharMingen, США). Относительное содержание и среднюю интенсивность флуоресценции (MIF) PD-1, CTLA-4, Tim-3 оценивали в гейтах CD4+ и CD8+ Т-клеток. Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха $Me [Q_1-Q_3]$. Статистическую значимость различий оценивали с помощью непараметрического W -критерия Вилкоксона для зависимых выборок с поправкой Бонферрони. Различия считали статистически значимыми при значениях $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ингибиторный эффект PIGF на а-CD3-активированные Т-клетки является VEGF-независимым. Ранее нами показано, что блокирование VEGFR-1 отменяет супрессорный эффект PIGF на пролиферацию Т-клеток в а-CD3-стимулированных культурах МНК [14]. Это позволило предположить, что PIGF оказывает прямой ингибирующий эффект на Т-клетки через связывание с VEGFR-1. В то же

время известно, что PIGF способен активировать МНК к продукции VEGF [15], который также может ингибировать пролиферацию Т-клеток [7]. Согласно данным литературы, супрессорный эффект VEGF проявляется с 7-х сут и требует концентраций VEGF [7], существенно превышающих уровень продукции VEGF в культурах МНК [15].

Для того чтобы полностью исключить участие VEGF в реализации ингибиторного эффекта PIGF, мы сравнили блокирующий эффект а-VEGFR-1 и а-VEGFR-2 на супрессорную активность PIGF. Учитывая низкий уровень экспрессии VEGFR на нестимулированных Т-клетках и существенное их возрастание в течение суток, блокирующие антитела добавляли в двух режимах: вместе с PIGF и через 24 ч после начала культивирования (рис. 1).

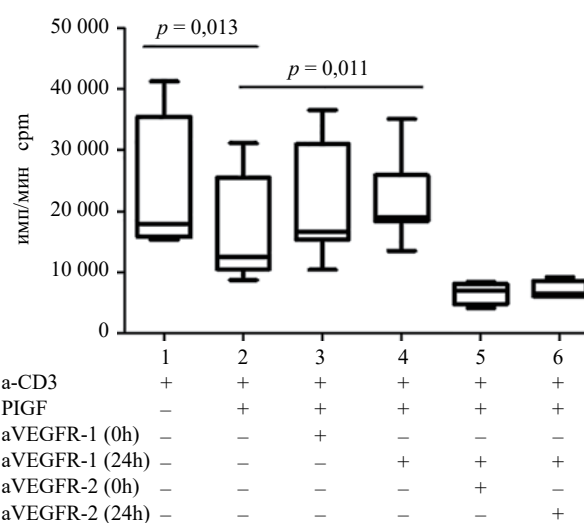


Рис. 1. Нейтрализующие а-VEGFR-1 антитела отменяют ингибиторный эффект PIGF на пролиферацию Т-клеток: МНК стимулировали а-CD3-антителами в отсутствие (1) и присутствии 5 нг/мл PIGF(2-6); нейтрализующие а-VEGFR-1 (3, 4) или а-VEGFR-2 (5, 6) антитела добавляли в дозе 2,5 мкг/мл одновременно с PIGF (3, 5) или через 24 ч от начала культивирования (4, 6), имп/мин, $Me [Q_1-Q_3]$, $Min-Max$, $n = 8$

Как видно из рис. 1, в присутствии PIGF уровень пролиферативного ответа Т-клеток на стимуляцию а-CD3-антителами снижался на 31% (26–38%; $p = 0,013$). Нейтрализующие а-VEGFR-1 антитела снижали супрессорный эффект PIGF до 9% (3–25%) при добавлении совместно с фактором и до 3% (0–16%) – при добавлении через 24 ч от начала культивирования. Более выраженное подавление супрессорной активности PIGF в данном случае было, по-видимому, связано с более высокой экспрессией VEGFR-1 на Т-клетках через 24 ч после анти-CD3-стимуляции. В то же время блокирование VEGFR-2 не отменяло супрессорный эффект PIGF.

Влияние PIGF на продукцию IL-10 а-CD3-активированными CD4+ и CD8+ Т-клетками. Для оценки влияния PIGF на способность Т-клеток продуцировать IL-10, исследовали относительное содержание CD4+ и CD8+ Т-клеток с внутриклеточным содержанием IL-10 в культурах, а-CD3-стимулированных МНК в отсутствие и присутствии PIGF (рис. 2).

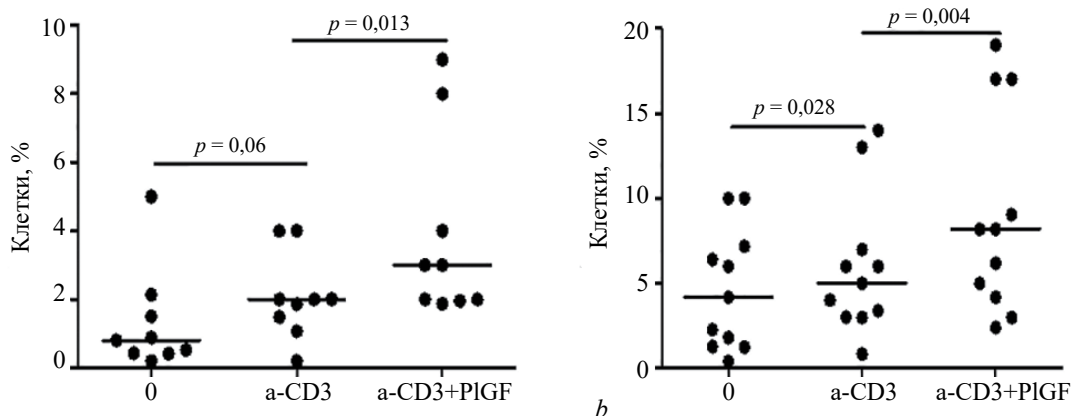


Рис. 2. PIGF повышает внутриклеточную IL-10 экспрессию CD4+ (a) и CD8+ (b) Т-лимфоцитами: МНК культивировали в среде (0) или стимулировали а-CD3 в отсутствие (а-CD3) и присутствии 5 нг/мл PIGF (а-CD3+PIGF). Через 48 ч культивирования оценивали внутриклеточную экспрессию IL-10 в субпопуляциях CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов методом проточной цитометрии. Данные представлены в виде индивидуальных значений и *Me*, $n = 9-11$

Добавление в культуры PIGF приводило к возрастанию доли IL-10+ клеток как среди CD4+, так и CD8+ Т-лимфоцитов по сравнению с МНК стимулированными а-CD3-антителами в отсутствие PIGF. При этом относительное количество CD8+IL-10+ Т-клеток в культурах МНК, содержащих PIGF, в 2,7 раза превышало количество CD4+IL-10+ Т-клеток ($p = 0,018$).

PIGF усиливает апоптоз а-CD3-активированных Т-клеток. Для оценки возможного участия PIGF в регуляции программированной клеточной гибели исследовали влияние фактора на уровень активационно-индуцированного апоптоза CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов. Для идентификации апоптотических

Активация МНК а-CD3 сопровождалась увеличением относительного содержания IL-10+ клеток в субпопуляции CD8+ Т-лимфоцитов ($p = 0,028$). Прирост количества IL-10-продуцирующих клеток среди CD4+ Т-лимфоцитов отмечался также у большей части обследованных доноров, хотя эти изменения не были статистически значимы ($p = 0,06$).

и некротических клеток использовали трехцветную проточную цитофлуориметрию. Клетки в состоянии раннего апоптоза не включают ядерный краситель (7-ADD) и определяются как $Ann^+/7ADD^-$. Клетки в состоянии позднего апоптоза или некроза, включающие ядерный краситель, идентифицируются как $Ann^+/7-ADD^+$. В популяции свежее выделенных МНК большинство CD4+ и CD8+ Т-клеток были жизнеспособными ($Ann^-/7-ADD^-$) и содержали очень низкое количество апоптотических клеток. 48-часовая активация МНК а-CD3-антителами сопровождалась возрастанием уровня апоптоза в субпопуляциях CD4+ и CD8+ Т-клеток (рис. 3).

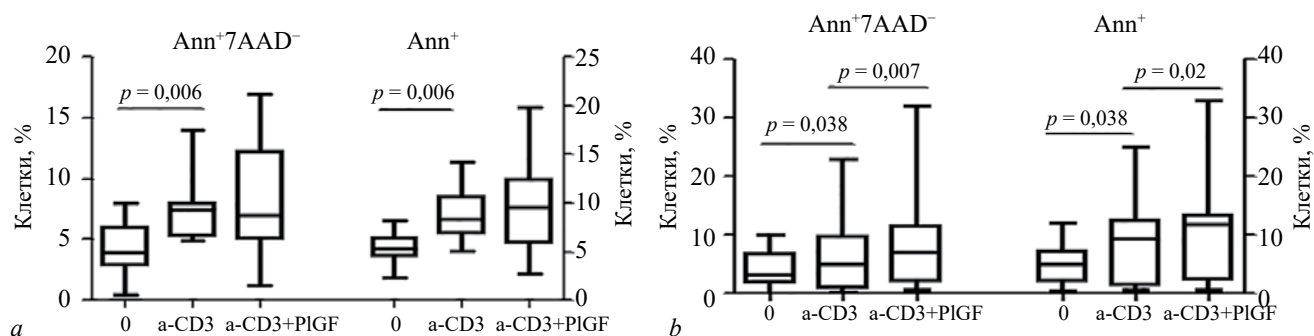


Рис. 3. PIGF усиливает апоптоз а-CD3-активированных CD8+ Т-клеток: представлены суммированные данные относительного содержания клеток в стадии раннего апоптоза ($Ann^+/7AAD^-$) и общего количества апоптотических клеток (Ann^+) в гейтах CD4+ (a) и CD8+ (b) Т-лимфоцитов. Данные четырех независимых экспериментов проанализированы с помощью парного критерия Вилкоксона, $n = 10$

Влияние PIGF на экспрессию чек-пойнт молекул на а-CD3-активированных CD4+ и CD8+ Т-клетках, Me [Q₁-Q₃], n = 8

МНК	CD4+ Т-клетки, %			CD8+ Т-клетки, %		
	PD-1	CTLA-4	Tim-3	PD-1	CTLA-4	Tim-3
0	3,7 [2,2–4,3]	4,6 [2,1–7,1]	2,9 [2,0–3,6]	2,3 [1,6–2,8]	0,4 [0,1–0,8]	0,7 [0,1–1,6]
а-CD3	6,0* [3,0–8,5]	7,0* [2,4–10,2]	3,7* [2,7–5,3]	3,2* [2,4–4,2]	0,3 [0,1–0,7]	2,4* [1,6–3,2]
а-CD3+PIGF	5,5* [4,5–8,1]	7,3* [4,2–10,0]	5,0*# [3,3–6,6]	3,8*# [2,9–4,5]	0,5 [0,3–0,7]	5,1*# [3,3–6,1]

Примечание. Относительное содержание PD-1, CTLA-4 и Tim-3-позитивных клеток в гейтах CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов оценивали в 48-часовых культурах нестимулированных МНК (0) и МНК, активированных анти-CD3-антителами в отсутствие (а-CD3) и присутствии 5 нг/мл PIGF (а-CD3+PIGF).

* $p < 0,05$ – по сравнению с нестимулированными МНК; # $p < 0,05$ – по сравнению с а-CD3-активированными МНК.

Добавление в культуры PIGF приводило к усилению апоптоза CD8+ Т-клеток ($p < 0,05$), не влияя на уровень гибели CD4+ Т-лимфоцитов. Поскольку количество Ann⁺/7ADD⁻ клеток отражает только проксимальные (ранние) события апоптотического процесса, дополнительно проанализировали общее количество Ann⁺ Т-клеток (Ann⁺/7ADD^{-/+}). Относительное содержание Ann⁺CD8+ Т-лимфоцитов среди МНК, активированных а-CD3 в присутствии PIGF, было выше, чем в контрольных а-CD3-стимулированных культурах. В то же время различий в содержании Ann⁺CD4+ Т-клеток в присутствии и отсутствии PIGF не наблюдалось.

PIGF повышает экспрессию ингибиторных рецепторов на активированных Т-клетках. Повышенная экспрессия ингибиторных рецепторов (также получивших название ингибиторных чек-пойнт молекул) рассматривается в качестве важного механизма ограничения Т-клеточного ответа вследствие Т-клеточного истощения [12]. Чтобы оценить влияние PIGF на экспрессию ингибиторных рецепторов, исследовали экспрессию PD-1, CTLA-4 и Tim-3 на CD4+ и CD8+ Т-клетках в 48-часовых культурах МНК (таблица).

Стимуляция МНК а-CD3 приводила к возрастанию доли Т-лимфоцитов, экспрессирующих чек-пойнт молекулы. Так, относительное количество CD4+PD-1+ и CD8+PD-1+ Т-клеток в ответ на анти-CD3-стимуляцию статистически значимо превышало их содержание среди нестимулированных МНК. При этом добавление в культуру PIGF увеличивало число PD-1-позитивных CD8+ Т-клеток ($p < 0,05$), но не оказывало такого эффекта в отношении CD4+PD-1+ Т-лимфоцитов. Связывание Т-клеточных рецепторов с а-CD3-антителами приводило к возрастанию доли CD4+ Т-лимфоцитов, экспрессирующих CTLA-4, однако PIGF не оказывал влияния на количество CTLA-4-экспрессирующих CD4+ или CD8+ Т-клеток. Относительно экспрессии Tim-3, а-CD3-стимуляция также повышала долю Tim-3-позитивных клеток в субпопуляциях CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, при этом в присутствии PIGF количе-

ство как CD4+Tim3+, так и CD8+Tim3+ Т-лимфоцитов статистически значимо увеличивалось ($p < 0,05$).

Важно отметить, что PIGF не только повышал долю PD-1- и Tim-3-позитивных Т-клеток, но и усиливал экспрессию указанных рецепторов на Т-клетках. Так, в присутствии PIGF средняя интенсивность флуоресценции PD-1 на CD4+ Т-клетках возрастала с ($37,1 \pm 3,5$) до ($47,8 \pm 5,8$), а в субпопуляции CD8+ Т-клеток – с ($38 \pm 3,3$) до ($47,0 \pm 4,1$) ($p < 0,05$). Средняя интенсивность флуоресценции Tim-3 под действием PIGF возрастала на CD4+ Т-клетках с ($41,0 \pm 4,2$) до ($49,0 \pm 4,9$) и на CD8+ Т-клетках – с ($44,0 \pm 4,5$) до ($49,0 \pm 5,3$) ($p < 0,05$). Таким образом, присутствие в культуре PIGF приводило к умеренному, но статистически значимому возрастанию уровня экспрессии PD-1 и Tim-3 на CD4+ и CD8+ Т-клетках.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами данные показали, что ингибирующий эффект PIGF на пролиферацию Т-клеток в а-CD3-стимулированных культурах МНК реализуется через VEGFR-1 и не связан с возможным усилением продукции VEGF активированными МНК [15], поскольку блокирование VEGFR-2 не отменяло супрессорный эффект PIGF. Установлено также, что PIGF повышает продукцию IL-10 активированными CD4+ и CD8+ Т-клетками, усиливает апоптоз CD8+ Т-клеток и повышает экспрессию ингибиторных рецепторов PD-1 и Tim-3 на Т-клетках, что свидетельствует о важной роли PIGF/VEGFR-1 сигнального пути в модуляции Т-клеточных функций.

Согласно данным литературы, VEGFR-1 обладает низкой тирозинкиназной активностью, что долгое время позволяло рассматривать VEGFR-1 исключительно как рецептор-ловушку [2]. Однако позже выяснилось, что данный рецептор экспрессируется гемопоэтическими предшественниками, моноцитами/макрофагами и ДК и VEGFR-1 сигнальный путь вовлечен в процессы мобилизации костномозговых предшественников, активации и миграции моноцитов, регуляцию созревания ДК и клеточной пролиферации [3, 16, 17]. Более того, недавние исследования показали, что сигналинг

через VEGFR-1 в гипоксических условиях активирует STAT3 [8], который играет важную роль в регуляции Т-клеточных функций, ингибируя пролиферацию Т-лимфоцитов и их способность продуцировать IL-2 [18]. Эти факты согласуются с нашими данными об ингибирующем эффекте PlGF на пролиферацию Т-клеток через связывание с VEGFR-1.

Одним из выявленных эффектов PlGF явилось стимулирующее действие данного фактора на продукцию IL-10 активированными Т-клетками. Y.L. Lin и соавт. продемонстрировали способность PlGF модулировать цитокин-секреторную функцию Т-клеток опосредованно через ДК. Так, в смешанной культуре лейкоцитов PlGF-модифицированные ДК усиливали продукцию аллогенными Т-клетками IL-13 и IL-5, но при этом не влияли на секрецию IL-10 [6]. Эти данные подчеркивают различия между прямым и ДК-опосредованным действием PlGF.

J.Y. Shin и соавт. описали усиление продукции IL-10 при активации VEGFR-1 на Т-клетках селезенки и линии CD4+ Т-лимфоцитов в результате связывания с VEGF [19], что подтверждает способность VEGFR-1 опосредовать прямой эффект на Т-клетки. Однако авторы не выявили подавления пролиферации Т-клеток при активации VEGFR-1. По-видимому, этот факт объясняется тем, что PlGF и VEGF могут оказывать различные эффекты при связывании с VEGFR-1 в силу активации различных транскрипционных факторов [17].

Как известно, IL-10 является ключевым иммуносупрессорным цитокином, участвующим в ограничении иммунного ответа и индукции толерантности при беременности [20]. Супрессорный эффект IL-10 реализуется через генерацию толерогенных ДК, индукцию регуляторных Т-клеток и активацию JAK1/STAT3 сигнального пути в Т-лимфоцитах [21]. Ингибирующее действие IL-10 наиболее четко продемонстрировано в отношении CD4+ Т-клеток, в которых эндогенная продукция данного цитокина является важным регуляторным механизмом ограничения функций CD4+ Т-лимфоцитов [22].

Влияние IL-10 на функции CD8+ Т-клеток не так однозначно. При опухолевом росте IL-10 может активировать и стимулировать экспансию цитотоксических CD8+ Т-клеток [23], тогда как при хронической инфекции описан прямой ингибирующий эффект IL-10 на CD8+ Т-лимфоциты [24]. Полученные нами результаты свидетельствуют о способности PlGF усиливать продукцию IL-10 не только в популяции CD4+, но и CD8+ Т-клеток. Однако является ли повышенная продукция IL-10 причиной подавления пролиферации Т-клеток и, особенно, CD8+ Т-клеток в присутствии PlGF, остается открытым и требует дальнейших исследований.

Другим важным результатом работы являются данные о способности PlGF усиливать апоптоз CD8+ Т-клеток и экспрессию на Т-клетках ингибиторных рецепторов (PD-1 и Tim-3). Способность PlGF модулировать уровень апоптоза была недавно продемонстрирована в модели эмфиземы легких [25]. Авторы показали, что PlGF повышает апоптоз легочного эпителия через активацию c-JunN-терминальной киназы и протеин киназы С. В нашем исследовании впервые показано, что PlGF усиливает апоптоз активированных CD8+ Т-клеток.

Поскольку PlGF также стимулировал возрастание доли PD-1+ клеток, причем только в субпопуляции CD8+, но не CD4+ Т-лимфоцитов, мы предположили, что усиление апоптоза CD8+ Т-клеток может быть связано с повышенной экспрессией PD-1. Роль ингибиторного рецептора PD-1 в подавлении функций цитотоксических Т-клеток убедительно продемонстрирована при раке [26], а недавно выявлена и при беременности [27]. Сигналинг через PD-1 оказывает ингибиторный эффект на Т-лимфоциты через различные механизмы, включая индукцию апоптоза [28]. Кроме того, повышенная экспрессия ингибиторных чек-пойнт молекул может отражать состояние Т-клеточного истощения [12].

Нами показано также, что наряду с молекулой PD-1 PlGF стимулировал увеличение числа Tim-3-позитивных клеток, причем как в CD8+, так и CD4+ субпопуляциях Т-лимфоцитов. Tim-3 является еще одной чек-пойнт молекулой, которая вовлечена в Т-клеточное истощение и играет важную роль в ослаблении иммунного ответа матери на аллоантигены плода при успешной беременности [29]. Т. Voron и соавт. впервые продемонстрировали способность VEGF-A усиливать через VEGFR-2 сигнальный путь экспрессию различных ингибиторных чек-пойнт молекул (PD-1, CTLA-4, Tim-3) на CD8+ Т-клетках мышей-опухоленосителей [30]. Авторы также обнаружили одновременную экспрессию нескольких ингибиторных рецепторов на CD8+ Т-клетках в присутствии высоких концентраций VEGF.

Полученные нами результаты показали стимулирующее действие ангиогенных факторов на экспрессию чек-пойнт молекул на Т-лимфоцитах человека и, в частности, способность PlGF усиливать экспрессию PD-1 и Tim-3 на Т-клетках. Причем если стимулирующий эффект PlGF в отношении PD-1 отмечался только в популяции CD8+ Т-клеток, то эффект PlGF на экспрессию Tim-3 выявлялся в обеих (CD4+ и CD8+) субпопуляциях Т-клеток. К сожалению, нами не было проведено анализа ко-экспрессии ингибиторных рецепторов, что является ограничением исследования. Тем не менее увеличение доли CD8+ Т-клеток, экс-

прессорирующих как минимум два типа ингибиторных рецепторов (PD-1 и Tim-3), ассоциированное со снижением пролиферации CD8⁺ Т-клеток в присутствии PlGF, позволяет предполагать, что появление чек-пойнт молекул на поверхности Т-клеток может опосредовать ингибирующий эффект PlGF на Т-клетки.

Полученные данные позволяют рассматривать PlGF в качестве нового иммунного модулятора при беременности. Концентрация PlGF в сыворотке крови при нормальной беременности прогрессивно возрастает, в то время как снижение уровня PlGF при гипоксии плаценты является предиктором преэклампсии и задержки роста плода [10]. Несмотря на высокую прогностическую значимость уровня PlGF, патофизиологическое значение этого фактора до конца не осмыслено. Учитывая важную роль иммунной адаптации при успешной беременности и выраженные иммунные нарушения у женщин с преэклампсией [31, 32], разумно предположить, что PlGF причастен к иммунной модуляции при физиологической беременности, а снижение уровня этого фактора способствует активации иммунной системы и развитию гестационных осложнений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, PlGF повышает продукцию IL-10 активированными CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками, усиливает апоптоз CD8⁺ Т-лимфоцитов и повышает экспрессию ингибиторных рецепторов PD-1 и Tim-3 на Т-клетках, что свидетельствует о важной роли PlGF/VEGFR-1 сигнального пути в модуляции Т-клеточных функций. Учитывая повышенный уровень PlGF при физиологической беременности и его снижение при гестационных осложнениях, полученные данные позволяют предполагать, что ингибиторный эффект PlGF на Т-клеточный ответ может являться еще одним механизмом, обеспечивающим защиту плода от иммунной системы матери.

ЛИТЕРАТУРА

- Stuttfield E., Ballmer-Hofer K. Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB Life*. 2009; 61 (9): 915–922. DOI: 10.1002/iub.234.
- De Falco S. The discovery of placenta growth factor and its biological activity. *Exp. Mol. Med.* 2012; 44 (1): 1–9. DOI: 10.3858/em.2012.44.1.025.
- Dewerchin M., Carmeliet P. PlGF: a multitasking cytokine with disease-restricted activity. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012; 2 (8): a011056. DOI: 10.1101/cshperspect.a011056.
- Voron T., Marcheteau E., Pernot S., Colussi O., Tartour E., Taieb J., Terme M. Control of the immune response by pro-angiogenic factors. *Front. Oncol.* 2014; 4: 70. DOI: 10.3389/fonc.2014.00070.
- Lapeyre-Prost A., Terme M., Pernot S., Pointet A.L., Voron T., Tartour E., Taieb J. Immunomodulatory activity of VEGF in cancer. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2017; 330: 295–342. DOI: 10.1016/bs.ircmb.2016.09.007.
- Lin Y.L., Liang Y.C., Chiang B.L. Placental growth factor down-regulates type 1 T helper immune response by modulating the function of dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 2007; 82 (6): 1473–1480. DOI: 10.1189/jlb.0307164.
- Ziogas A., Gavalas N., Tsiatas M., Tsitsilonis O., Politi E., Terpos E., Rodolakis A., Vlahos G., Thomakos N., Haidopoulos D., Antsaklis A., Dimopoulos M., Bamias A. VEGF directly suppresses activation of T cells from ovarian cancer patients and healthy individuals via VEGF receptor Type 2. *Int. J. Cancer.* 2012; 130 (4): 857–864. DOI: 10.1002/ijc.26094.
- Albonici L., Giganti M., Modesti A., Manzari V., Bei R. Multifaceted role of the placental growth factor (PlGF) in the antitumor immune response and cancer progression. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20 (12): e2970. DOI: 10.3390/ijms20122970.
- Meng F.-J., Xiao S.-X., Zhang Y., Wang W., Wang B., Fan X.-Y. Prognostic significance of placenta growth factor expression in patients with multiple cancers: a meta-analysis. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015; 8 (8): 12726–12735.
- Lecarpentier É., Vieillefosse S., Haddad B., Fournier T., Leguy M., Guibourdenche J., Tsatsaris V. Placental growth factor (PlGF) and sFlt-1 during pregnancy: physiology, assay and interest in preeclampsia. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. 2016; 74 (3): 259–267. DOI: 10.1684/abc.2016.1158.
- Morelli S., Mandal M., Goldsmith L.T., Kashani B.N., Ponzio N.M. The maternal immune system during pregnancy and its influence on fetal development. *Research and Reports in Biology*. 2015; 6: 171–189. DOI: 10.2147/RRB.S80652.
- Slutsky R., Romero R., Xu Y., Galaz J., Miller D., Done B., Tarca A.L., Gregor S., Hassan S.S., Leng Y., Gomez-Lopez N. Exhausted and senescent T cells at the maternal-fetal interface in preterm and term labor. *J. Immunol. Res.* 2019; 3128010. DOI: 10.1155/2019/3128010.
- Xu Y., Wang S., Lin Y., Li D., Du M. Tim-3 and PD-1 regulate CD8⁺ T cell function to maintain early pregnancy in mice. *J. Reprod. Dev.* 2017; 63 (3): 289–294. DOI: 10.1262/jrd.2016-177.
- Черных Е.Р., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Баторов Е.В., Останин А.А. Сигналинг через рецептор к фактору роста эндотелия сосудов 1-го типа как новый механизм подавления Т-клеток при опухолевом неоваскулогенезе. *Медицинская иммунология*. 2019; 21 (4): 653–660. DOI: 10.15789/1563-0625-2019-4-653-660.
- Bottomley M., Webb N., Watson C., Holt L., Bukhari M., Denton J., Freemont A., Brenchley P. Placenta growth factor (PlGF) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from mononuclear cells and is co-expressed with VEGF in synovial fluid. *Clin. Exp. Immunol.* 2000; 119 (1): 182–188. DOI: 10.1046/j.1365-2249.2000.01097.x.
- Dikov M., Ohm J., Ray N., Tchekneva E.E., Burlison J., Moghanaki D., Nadaf S., Carbone D.P. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in dendritic cell differentiation. *J. Immunol.* 2005; 174 (1): 215–222. DOI: 10.4049/jimmunol.174.1.215.
- Koch S., Tugues S., Li X., Gualandi L., Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem. J.* 2011; 437 (2): 169–183. DOI: 10.1042/BJ20110301.

18. Oh H., Yu C.R., Golestaneh N., Amadi-Obi A., Lee Y.S., Esequon A., Mahdi R.M., Ekwuagu C.E. STAT3 protein promotes T-cell survival and inhibits interleukin-2 production through up-regulation of Class O Forkhead transcription factors. *J. Biol. Chem.* 2011; 286 (35): 30888–30897. DOI: 10.1074/jbc.M111.253500.
19. Shin J.Y., Yoon I.H., Kim J.S., Kim B., Park C.G. Vascular endothelial growth factor-induced chemotaxis and IL-10 from T cells. *Cell Immunol.* 2009; 256 (1–2): 72–78. DOI: 10.1016/j.cellimm.2009.01.006.
20. Mobini M., Mortazavi M., Nadi S., Zare-Bidaki M., Pourtalebi S., Arababadi M.K. Significant roles played by interleukin-10 in outcome of pregnancy. *Iran J. Basic Med. Sci.* 2016; 19 (2): 119–124.
21. Sabat R., Grütz G., Warszawska K., Kirsch S., Witte E., Wolk K., Geginat J. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010; 21 (5): 331–344. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2010.09.002.
22. Jankovic D., Kugler D., Sher A. IL-10 production by CD4+ effector T cells: a mechanism for self-regulation. *Mucosal Immunol.* 2010; 3 (3): 239–246. DOI: 10.1038/mi.2010.8.
23. Emmerich J., Mumm J.B., Chan I.H., LaFace D., Truong H., McClanahan T., Gorman D.M., Oft M. IL-10 directly activates and expands tumor-resident CD8(+) T cells without de novo infiltration from secondary lymphoid organs. *Cancer Research.* 2012; 72 (14): 3570–3581. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0721.
24. Smith L.K., Boukhaled G.M., Condotta S.A., Mazouz S., Guthmiller J.J., Vijay R., Butler N.S., Bruneau J., Shoukry N.H., Krawczyk C.M., Richer M.J. Interleukin-10 directly inhibits CD8+ T cell function by enhancing N-glycan branching to decrease antigen sensitivity. *Immunity.* 2018; 48 (2): 299–312. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.01.006.
25. Hou H., Cheng S., Chung K., Wei S., Tsao P., Lu H., Wang H., Yu C. PlGF mediates neutrophil elastase-induced airway epithelial cell apoptosis and emphysema. *Respir. Res.* 2014; 15 (1): 106. DOI: 10.1186/s12931-014-0106-1.
26. Chiu Y.M., Tsai C.L., Kao J.T., Hsieh C.T., Shieh D.C., Lee Y.J., Tsay G.J., Cheng K.S., Wu Y.Y. PD-1 and PD-L1 up-regulation promotes T-cell apoptosis in gastric adenocarcinoma. *Anticancer Res.* 2018; 38 (4): 2069–2078. DOI: 10.21873/anticancer.12446.
27. Meggyes M., Miko E., Szigeti B., Farkas N., Szereday L. The importance of the PD-1/PD-L1 pathway at the maternal-fetal interface. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2019; 19 (1): 74. DOI: 10.1186/s12884-019-2218-6.
28. Shi F., Shi M., Zeng Z., Qi R., Liu Z., Zhang J., Yang Y., Tien P., Wang F.S. PD-1 and PD-L1 up-regulation promotes CD8(+) T-cell apoptosis and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients. *Int. J. Cancer.* 2011; 128 (4): 887–896. DOI: 10.1002/ijc.25397.
29. Banerjee H., Kane L.P. Immune regulation by Tim-3. *Front Immunol.* 2018; 9: 316. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01.006.
30. Voron T., Colussi O., Marcheteau E., Pernot S., Nizard M., Pointet A., Latreche S., Bergaya S., Benhamouda N., Tanchot C., Stockmann C., Combe P., Berger A., Zinzindohoue F., Yagita H., Tartour E., Taieb J., Terme M. VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors. *J. Exp. Med.* 2015; 212 (2): 139–148. DOI: 10.1084/jem.20140559.
31. Laresgoiti-Servitje E. A leading role for the immune system in the pathophysiology of preeclampsia. *J. Leukoc. Biol.* 2013; 94 (2): 247–257. DOI: 10.1189/jlb.1112603.
32. Geldenhuys J., Rossouw T., Lombaard H., Ehlers M., Kock M. Disruption in the regulation of immune responses in the placental subtype of preeclampsia. *Front Immunol.* 2018; 9: 1659. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01659.

Вклад авторов

Черных Е.Р., Останин А.А. – разработка концепции и дизайна. Сметаненко Е.А., Леплина О.Ю. – культуральные работы. Тихонова М.А. – пробоподготовка для цитометрического анализа, цитометрический анализ проб. Леплина О.Ю., Пасман Н.М., Черных Е.Р. – анализ и интерпретация данных. Останин А.А., Черных Е.Р., – подготовка текста статьи. Черных Е.Р. – окончательное утверждение для публикации рукописи.

Сведения об авторах

Сметаненко Екатерина Александровна, аспирант, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск.
Леплина Ольга Юрьевна, д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID 0000-0003-3169-8643.

Тихонова Марина Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID 0000-0002-2366-1667.

Пасман Наталья Михайловна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой акушерства и гинекологии, Институт медицины и психологии, ННИГУ, г. Новосибирск.

Останин Александр Анатольевич, д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID 0000-0001-6895-938X.

Черных Елена Рэмовна, д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, зав. лабораторией клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID 0000-0003-2346-6279.

✉ Черных Елена Рэмовна, e-mail: ct_lab@mail.ru.

Поступила в редакцию 11.12.2019

Подписана в печать 30.04.2020