
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИХ МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ
И ЦИТОТОКСИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ РАЗНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ
НАТУРАЛЬНЫХ КИЛЛЕРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ
ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ**

© 2024 г. Е. Г. Орлова^{1,*}, О. А. Логинова¹, О. Л. Горбунова¹, С. В. Ширшев¹

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

* E-mail: orlova_katy@mail.ru

Поступила в редакцию 21.11.2023 г.

После доработки 02.02.2024 г.

Принята к публикации 05.02.2024 г.

При беременности функции натуральных киллеров (НК-клеток) периферической крови существенно меняются, что главным образом связано с угнетением их цитотоксичности. Функциональная активность НК-клеток напрямую взаимосвязана с их метаболическим статусом, однако эти изменения при физиологической беременности не исследованы. Цель данной работы – изучить экспрессию молекул Glut-1, CD94 и CD107a, характеризующих метаболическую и цитотоксическую активность, а также массу митохондрий разных субпопуляций НК-клеток периферической крови в I и III триместрах физиологической беременности. Объектом исследования являлась периферическая кровь практически здоровых женщин в I и III триместрах физиологической беременности. Группу сравнения составили практически здоровые небеременные женщины в фолликулярной фазе менструального цикла. Экспрессию молекул Glut-1, CD94, CD107a и массу митохондрий оценивали методом проточной цитофлуориметрии на регуляторных (CD16⁺CD56^{bright}), цитотоксических (CD16⁺CD56^{dim}), минорных цитотоксических (CD16^{hi}CD56⁺) НК-клетках. Установлено, что у небеременных минорные цитотоксические CD16^{hi}CD56⁺НК обладают наибольшей экспрессией Glut-1, CD107a и наименьшей экспрессией CD94 по сравнению с остальными субпопуляциями НК-клеток. На регуляторных CD16⁺CD56^{bright}НК и цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}НК экспрессия этих молекул сравнима между собой, как и масса митохондрий во всех исследуемых субпопуляциях. В I триместре экспрессия Glut-1 была выше на регуляторных CD16⁺CD56^{bright}НК, а масса митохондрий и экспрессия CD94, CD107a на всех НК-клетках не отличалась от небеременных. В III триместре в цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}НК масса митохондрий была выше, а экспрессия CD94 ниже, чем у небеременных, а на регуляторных CD16⁺CD56^{bright}НК экспрессия CD94 была выше по сравнению с таковой в I триместре. Экспрессия CD107a в минорных цитотоксических CD16^{hi}CD56⁺НК была ниже, чем у небеременных, а в остальных субпопуляциях не менялась, как и экспрессия Glut-1. Таким образом, разные субпопуляции НК-клеток периферической крови гетерогенны по экспрессии Glut-1, CD107a, CD94. Экспрессия этих молекул при физиологической беременности меняется по триместрам. Полученные результаты важны для понимания механизмов регуляции функций НК-клеток при беременности.

Ключевые слова: НК-клетки, беременность, Glut-1, масса митохондрий, CD94, CD107a

ВВЕДЕНИЕ

Натуральные киллеры (НК-клетки) являются эффекторами врожденного иммунитета лимфоидного происхождения и играют важную роль в противовирусной и противоопухолевой защите организма человека [1, 2]. Более 90% НК-клеток периферической крови имеют фенотип $CD16^+CD56^{dim}$ и обладают высокой цитотоксичностью, а около 10% являются регуляторными $CD16-CD56^{bright}$ НК-клетками с ограниченной цитотоксичностью, но способными к активной продукции цитокинов [1, 2]. Также присутствует минорная субпопуляция цитотоксических $CD16^{hi}CD56$ НК-клеток, которая, по-видимому, является терминальной стадией дифференцировки НК-клеток, однако ее функциональные особенности остаются неизученными [3, 4]. НК-клетки не имеют специфических антиген-распознающих рецепторов, гены которых подвергаются реаранжировке, как у Т- и В-лимфоцитов, но экспрессируют большое количество активирующих и ингибирующих рецепторов, регулирующих их активность [1, 2]. С помощью активирующих рецепторов НК-клетки распознают поверхностные молекулы, экспрессия которых обнаруживается только при инфицировании, опухолевой трансформации или повреждении клеток собственного организма. Среди ингибирующих рецепторов на НК-клетках наиболее часто присутствуют гетеродимеры $CD94-NKG2A$ суперсемейства лектиноподобных белков С-типа, которые распознают молекулы главного комплекса гистосовместимости I типа HLA-E (human leukocyte antigen) на клетках-мишенях, что инициирует угнетающий сигнал, подавляет активацию и препятствует цитолизу клеток-мишеней [5–8]. При отсутствии или трансформации молекул HLA-I типа на клетках-мишенях активированные НК-клетки осуществляют цитолиз, секретируя гранулы с перфорином и гранзимами, но также и путем контактного взаимодействия и индукции апоптоза [6, 7]. Следствием дегрануляции является появление на НК-клетках белка мембраны литических гранул $CD107a$ [9]. Также НК-клетки с помощью рецептора $CD16$ распознают конститутивный Fc-фрагмент антител на поверхности клеток-мишеней и лизируют их [10]. Таким образом, изучение экспрессии вышеупомянутых молекул важно для понимания механизмов регуляции цитотоксической функции НК-клеток.

НК-клетки активно участвуют в иммуно-эндокринных взаимодействиях, поскольку экспрессируют рецепторы к гормонам [11, 12]. Так, при физиологической беременности под влиянием гормонов, продуцируемых плацентой, происходит трансформация фенотипа и функций НК-клеток, что необходимо для благополучного исхода беременности [12]. Разные trimestры отличаются по направленности изменений иммунореактивности организма матери [12]. Первый триместр характеризуется наибольшей частотой спонтанных аборт в связи с началом экспрессии молекул HLA клетками трофобласта и «лютеоплацентарной сменой» [13]. При этом цитотоксический потенциал НК-клеток, продукция провоспалительных цитокинов снижаются, а выработка противовоспалительных цитокинов увеличивается [14–17]. Регуляторные НК-клетки периферической крови в ранние сроки беременности мигрируют в матку, где формируют пул децидуальных НК-клеток, которые являются основными эффекторами иммунной толерантности в зоне фетоплацентарного контакта, ограничивают цитотоксические реакции к антигенам плода, продуцируют факторы, способствующие инвазивному росту трофобласта [15, 18, 19]. Увеличение общего количества и цитотоксической активности НК-клеток периферической крови и децидуальных НК-клеток ассоциировано со спонтанными абортами и другими патологиями беременности (преэклампсией) [14, 19, 20]. В третьем триместре беременности иммунореактивность организма матери определяется подготовкой к родам и восстановлением измененных функций [13, 15, 19].

Беременность сопровождается глубокими изменениями метаболического обмена в организме матери. Функциональная активность НК-клеток напрямую взаимосвязана с их метаболическим статусом. Основным источником энергии для НК-клеток являет-

ся глюкоза, которая попадает в клетку с помощью белков-транспортеров (Glut-1) [21, 22]. Метаболизм глюкозы в клетке включает гликолиз и окислительное фосфорилирование [21, 22]. Незрелые НК-клетки обладают высокой метаболической активностью и преимущественно используют гликолиз даже при достаточном присутствии кислорода [22–24]. По мере созревания НК-клеток поглощение глюкозы, экспрессия ферментов гликолиза снижаются, а окислительное фосфорилирование становится основной метаболической программой зрелых нестимулированных НК-клеток [22, 23, 24]. При активации зрелых НК-клеток увеличиваются экспрессия Glut-1 и потребление глюкозы, интенсивность гликолиза и окислительного фосфорилирования, нарастает масса митохондрий [21, 22, 24]. Однако взаимосвязь функций НК-клеток с их метаболическим статусом при физиологической беременности не исследованы. Поэтому цель работы – изучить экспрессию молекул Glut-1, CD94 и CD107a, характеризующих метаболическую и цитотоксическую активность и массу митохондрий разных субпопуляций НК-клеток периферической крови в I и III триместрах физиологической беременности. Учитывая высокую частоту патологий беременности иммунного генеза, а также широкое использование НК-клеток для иммунотерапии онкологических заболеваний, значимость изучения механизмов, регулирующих их функциональную активность, не вызывает сомнений.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Объекты исследования

Исследовали периферическую кровь условно здоровых женщин в I и III триместрах физиологической беременности. В группу сравнения вошли практически здоровые небеременные женщины в фолликулярной фазе менструального цикла. Критериями включения являлись следующие характеристики: наличие одной и более успешно завершившихся беременностей; отсутствие патологий беременности в прошлом и настоящем; отсутствие острых и хронических соматических, эндокринных, аутоиммунных, генетических заболеваний; отрицание диет, приема контрацептивных, гормональных, противовоспалительных или антибактериальных препаратов; наличие добровольного информированного согласия на использование биологического материала. Клиническая и демографическая характеристика участниц исследования представлена в табл. 1. Исследуемые группы не отличались по возрасту.

Таблица 1. Клиническая и демографическая характеристика участниц исследования

Исследуемые группы	<i>n</i>	Возраст	Срок беременности, недель
Небеременные женщины	7	29 (20–37)	-
Беременные, I триместр	7	26 (21–35)	10 (5–12)
Беременные, III триместр	7	33 (27–41)	35 (28–39)

Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха, Me (Q1 – Q3); *n* = количество проведенных исследований.

2. Анализ фенотипа клеток

Венозную кровь забирали из локтевой вены утром натощак в объеме 2 мл в вакуумные пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой. Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) выделяли методом седиментации в градиенте плот-

ности фиколл-урографина (1.077 г/см^3) по стандартной методике. РВМС дважды отмывали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), содержащем 2мМ ЭДТА и 0.1% бычьего сывороточного альбумина (БСА), затем определяли количество регуляторных $\text{CD16}^- \text{CD56}^{\text{bright}} \text{NK}$, цитотоксических $\text{CD16}^+ \text{CD56}^{\text{dim}} \text{NK}$ и $\text{CD16}^{\text{hi}} \text{CD56}^- \text{NK}$ методом проточной цитометрии. Характеристика используемых антител представлена в табл. 2.

Таблица 2. Характеристика моноклональных антител

Моноклональные антитела	Флюорохром	Клон	Изотип	Компания-производитель
CD3	PE	ОКТ3	Mouse/IgG2a, κ	eBioscience, США
CD14	PE	M5E2	Mouse/IgG2a, κ	BioLegend, США
CD19	PE	H1B19	Mouse/IgG1, κ	BioLegend, США
CD56 (NCAM)	Brilliant Violet 605™	HCD56	Mouse/IgG1, κ	BioLegend, США
CD16	Pacific blue™	3G8	Mouse/IgG1, κ	BioLegend, США
Glut-1	PE-Cy5.5	polyclonal	Rabbit/IgG	Biorbyt, Великобритания
CD94	APC/Fire™ 750	DX22	Mouse/IgG1, κ	BioLegend, США
CD107a (LAMP-1)	APC	H4A3	Mouse/IgG1, κ	BioLegend, США

Стратегия гейтирования представлена на рис. 1. Живые клетки (living cells) отделяли с использованием красителя Zombie UV™ (BioLegend, США). Фенотип клеток анализировали на проточном цитометре «CytoFlexS» с использованием программного обеспечения «CytExpert 2.0», Beckman Coulter, США). Для анализа фенотипа клеток использовали не менее 1×10^6 событий в каждой пробе. Для контроля неспецифического связывания и выделения негативного по флуоресценции окна использовали соответствующие контроли: негативный и изотипические. Затем в каждой субпопуляции NK-клеток определяли экспрессию молекулы Glut-1, CD94, CD107a (рис. 1). Для оценки массы митохондрий вносили митохондриальный зонд MitoSpy™ Green FM (BioLegend, США) в конечных концентрациях 250 нМ в соответствии с инструкцией производителя. Краситель MitoSpy Green избирательно накапливается в матриксе митохондрий, где ковалентно взаимодействует с белками митохондрий, связываясь со свободными тиоловыми группами остатков цистеина [25, 26]. Накопление этого флуоресцентного маркера в матриксе митохондрий прямо пропорционально их массе и объему, не зависит от их мембранного потенциала [25]. После окрашивания (37 °C, 30 мин) клетки отмывали центрифугированием в растворе ФСБ.

3. Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью программы «Prism 8.0.1.» (Graphpad, США). Для проверки нормальности распределения использовали критерий Колмогорова – Смирнова. Достоверность различий между группами: небеременные – NP (группа сравнения); беременные в I триместре (I); беременные в III триместре (III) – определяли с использованием критерия Крускала – Уоллиса для множественных сравнений независимых переменных. Взаимосвязь признаков оценивали, рассчитывая коэффициент корреляции Пирсона (r). Данные на рисунке представлены в виде медианы (Me), нижних (LQ) и верхних (UQ) квартилей. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

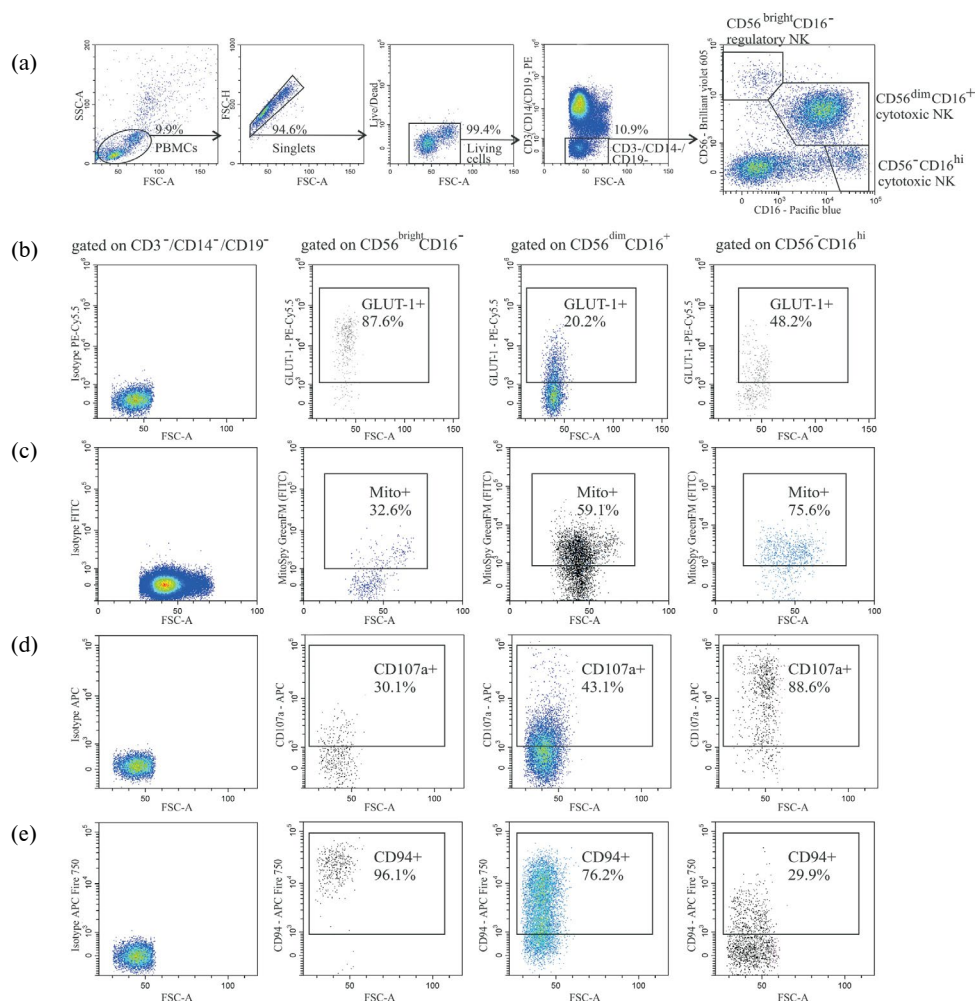


Рис. 1. Стратегия гейтирования, используемая для анализа разных субпопуляций NK-клеток периферической крови и экспрессии молекул Glut-1, CD94, CD107a, массы митохондрий

(a) – выделение гейта лимфоцитов по параметрам площади прямого (FSC-A) и высоты бокового (SSC-H) светорассеивания; дискриминация слипшихся клеток (дуплетов) по параметрам площади и высоты прямого светорассеивания (FSC-A/FSC-H); определение живых клеток (living cells), негативных по окрашиванию ZombieUV™ (ZombieUV™ Fixable Viability Kit, Bio Legend); выделение негативной популяции по маркерам CD3/CD14/CD19 в гейте живых PBMC; определение регуляторной субпопуляции (regulatory) NK-клеток как процента CD16⁻CD56^{bright} и цитотоксических субпопуляций (cytotoxic) NK-клеток как процента CD16^{dim}CD56⁺ и CD16^{hi}CD56⁻ – в гейте CD3/CD14/CD19-негативных PBMC. На рис. 1 представлены гистограммы одного репрезентативного эксперимента.

(b) Изотипический контроль и оценка экспрессии молекулы Glut-1 в исследуемых субпопуляциях NK-клеток.

(c) Негативный контроль и процент накапливающих MitoSpy Green (Mito⁺) клеток в разных субпопуляциях NK-клеток.

(d) Изотипический контроль и оценка экспрессии молекулы CD107a в разных субпопуляциях NK-клеток.

(e) Изотипический контроль и оценка экспрессии молекулы CD94 в исследуемых субпопуляциях NK-клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия транспортера глюкозы Glut-1

При изучении экспрессии транспортера глюкозы Glut-1 установлено, что у небеременных женщин проценты Glut-1-экспрессирующих регуляторных $CD16^-CD56^{bright}NK$ и цитотоксических $CD16^+CD56^{dim}NK$ не отличались между собой, а наибольшее количество Glut-1-позитивных клеток было обнаружено среди минорной субпопуляции цитотоксических $CD16^{hi}CD56^-NK$ (рис. 2а).

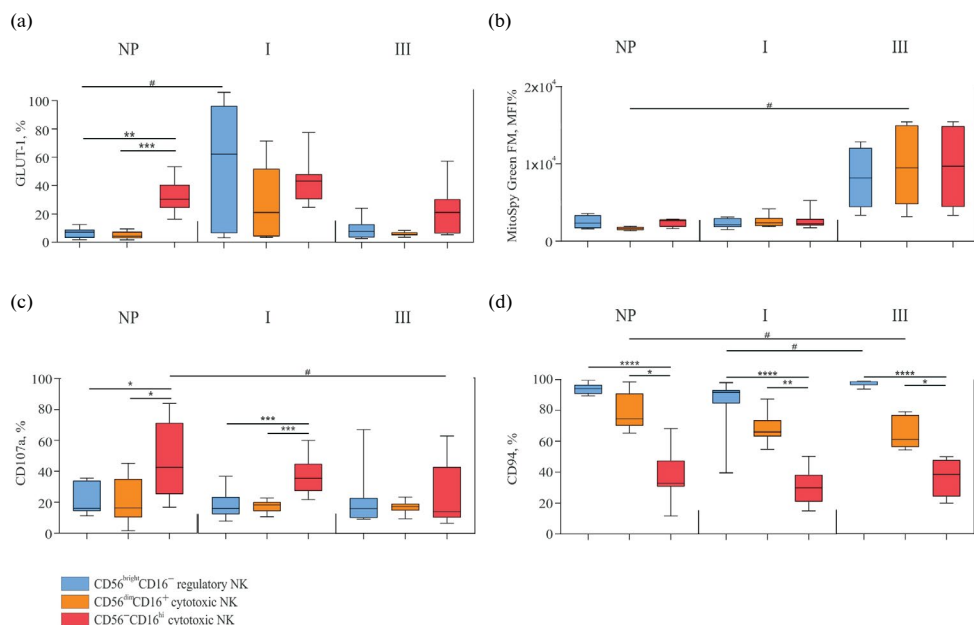


Рис. 2. Процент клеток, позитивных по экспрессии Glut-1, CD107a, CD94, включению митохондриального зонда MitoSpy Green FM в разных субпопуляциях NK-клеток периферической крови у небеременных (NP), беременных в I и III триместрах физиологической беременности.

$CD16^-CD56^{bright}NK$ – регуляторные NK-клетки; $CD16^+CD56^{dim}NK$ – цитотоксические NK-клетки; $CD16^{hi}CD56^-NK$ – минорная субпопуляция цитотоксических NK-клеток; данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха, Me (Q1 – Q3); на рис. 2b по оси ординат представлена медиана яркости флуоресценции (MFI, Median Fluorescence Intensity) в клетках, содержащих MitoSpy Green FM; # – $p < 0.05$ по отношению к группе небеременных (NP) по критерию Крускала – Уоллиса; * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$, **** – $p < 0.0001$ между процентом разных типов NK-клеток в одной группе по критерию Крускала – Уоллиса.

В I триместре беременности количество регуляторных $Glut-1^+CD16^-CD56^{bright}NK$ значительно выше, чем у небеременных (рис. 2а). Подобная тенденция присутствует и для цитотоксических $CD16^+CD56^{dim}NK$, но не является достоверной. В III триместре количество $Glut-1$ -экспрессирующих клеток в каждой субпопуляции NK-клеток не отличается от показателей небеременных. Можно полагать, что усиление экспрессии $Glut-1$ на регуляторных и цитотоксических NK-клетках свидетельствует об их активации в I триместре и, как следствие, повышенном потреблении глюкозы и усилении ее метаболизма. В то же время в III триместре уровень потребления глюкозы NK-клетка-

ми возвращается к значениям у небеременных. Количество Glut-1-экспрессирующих клеток среди минорной субпопуляции цитотоксических CD16^{hi}CD56-NK не меняется ни в I, ни в III триместре беременности, что, очевидно, объясняется исходно высокой экспрессией Glut-1 на этих клетках.

Анализ массы митохондрий с использованием MitoSpy Green FM

При анализе с использованием MitoSpy Green FM установлено, что как у небеременных, так и в I триместре беременности способность регуляторных CD16-CD56^{bright}NK, цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK и CD16^{hi}CD56-NK накапливать MitoSpy Green сравнима между собой, что свидетельствует о сходной массе и объеме митохондрий в обеих группах (рис. 2b). В III триместре беременности средняя интенсивность свечения усиливается во всех типах NK-клеток, но достоверно только в цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK. Можно заключить, что в III триместре беременности в цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK-клетках масса и объем митохондрий увеличиваются по сравнению с параметрами небеременных.

Экспрессия CD107a

CD107a является маркером дегрануляции и активации NK-клеток [10]. У небеременных цитотоксические CD16⁺CD56^{dim}NK и регуляторные CD16-CD56^{bright}NK обладают сравнимой экспрессией CD107a, а минорные цитотоксические CD16^{hi}CD56-NK имеют наибольшую экспрессию CD107a среди субпопуляций NK-клеток периферической крови, что свидетельствует об их высокой цитотоксической активности и согласуется с высокой экспрессией CD16 (рис. 1, 2с). В I и III триместрах беременности экспрессия CD107a не меняется на цитотоксических и регуляторных NK-клетках, несмотря на их активацию, о чем можно судить по экспрессии Glut-1 и увеличению массы митохондрий. А на минорных цитотоксических CD16^{hi}CD56-NK экспрессия CD107a выше в I триместре, а в III триместре ниже, чем у небеременных.

Экспрессия CD94

Установлено, что у небеременных женщин наименьшая экспрессия молекулы CD94 выявляется на минорных цитотоксических CD16^{hi}CD56-NK, тогда как на регуляторных CD16-CD56^{bright}NK и цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK экспрессии молекулы CD94 сравнимы между собой. В I триместре экспрессия CD94 на регуляторных и цитотоксических NK-клетках не меняется, в III триместре на цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK снижается по сравнению с небеременными, а на регуляторных CD16-CD56^{bright}NK, напротив, увеличивается по сравнению с показателями I триместра. Анализ корреляционных связей показывает, что экспрессия CD94 имеет обратную зависимость с присутствием CD107a на минорных цитотоксических CD16^{hi}CD56-NK ($r = -0.98$; $p < 0.05$), цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK ($r = -0.88$; $p < 0.05$) и регуляторных CD16-CD56^{bright}NK ($r = -0.93$; $p < 0.05$) как у небеременных, так и в I триместре беременности соответственно CD16^{hi}CD56-NK ($r = -0.95$; $p < 0.05$), цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK ($r = -0.86$; $p < 0.05$) и регуляторных CD16-CD56^{bright}NK ($r = -0.95$; $p < 0.05$), что подтверждает взаимосвязь экспрессии CD94 с ограничением цитотоксической функции NK-клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно современным представлениям, беременность сопровождается глубокими изменениями гормонально-цитокиновых ансамблей, что необходимо для поддержания толерантности иммунной системы организма матери к полуаллогенному плоду [12, 33]. Функции NK-клеток периферической крови при беременности также находятся под

контролем гормонов и других факторов, продуцируемых плацентой, поскольку они экспрессируют специфические рецепторы к ним [11–13, 34]. Функциональная активность НК-клеток напрямую взаимосвязана с их метаболическим статусом, однако эти изменения при физиологической беременности практически не изучены. В проведенных исследованиях установлено, что популяция НК-клеток периферической крови гетерогенна по экспрессии молекул Glut-1, CD107a и CD94. Так, у небеременных минорные цитотоксические CD16^{hi}CD56-NK обладают наибольшей экспрессией Glut-1 и CD107a, но имеют наименьшую экспрессию CD94 по сравнению с остальными субпопуляциями НК-клеток. Регуляторные CD16-CD56^{bright}NK имеют тенденцию к большей экспрессии CD94, чем цитотоксические CD16⁺CD56^{dim}NK, достоверность данных не достигнута. Подобные результаты описаны и другими авторами [6]. Цитотоксические CD16⁺CD56^{dim}NK и регуляторные CD16-CD56^{bright}NK не отличаются между собой по экспрессии Glut-1, CD107a. Масса митохондрий также сравнима у всех исследуемых субпопуляций. Анализируя полученные результаты, можно полагать, что гетерогенность по экспрессии CD94 связана, по-видимому, с разной степенью зрелости НК-клеток и обуславливает разную цитотоксичность [1, 2]. Известно, что экспрессия CD94 снижается по мере созревания НК-клеток, и преобладающими ингибирующими рецепторами становятся KIR (иммуноглобулиноподобные рецепторы клеток-киллеров) [5–8]. Регуляторные CD16-CD56^{bright}NK являются менее зрелыми по сравнению с цитотоксическими CD16⁺CD56^{dim}NK, а CD16^{hi}CD56-NK-клетки считаются конечной стадией их дифференцировки, что полностью согласуется с последовательной утратой CD94 по мере созревания НК-клеток [5–8] (рис. 2d). В то же время цитотоксическая активность субпопуляций НК-клеток изменяется в обратной зависимости, что подтверждается экспрессией CD107a и CD16 на разных субпопуляциях и выявленными корреляционными взаимосвязями. Согласно современным данным, взаимодействие рецепторного комплекса CD94-NKG2A с неклассическими молекулами HLA-E на клетках-мишенях подавляет цитотоксическую активность НК-клеток [30]. В ряде работ показано, что на НК-клетках периферической крови преобладают гетеродимерные рецепторы CD94-NKG2A, при этом экспрессия молекул NKG2A увеличивается при беременности [5–8], что дает возможность говорить о преобладающей ингибиторной функции CD94 на НК-клетках. Однако следует отметить, что CD94 образует гетеродимеры и с другими молекулами семейства NKG2 – C, B, E, причем гетеродимеры CD94-NKG2B являются ингибирующими, а CD94-NKG2C/E активирующими рецепторами [31].

Отличия по экспрессии Glut-1a отражают разную способность к потреблению глюкозы и, как следствие, разную метаболическую активность. Так, у небеременных наиболее метаболически активными, по-видимому, являются CD16^{hi}CD56-NK, которые обладают и наибольшей цитотоксичностью, судя по высокой экспрессии CD107a, CD16 и низкой экспрессии CD94. А регуляторные CD16-CD56^{bright}NK и цитотоксические CD16⁺CD56^{dim}NK сравнимы по показателям метаболической активности и интенсивности дегрануляции. Можно полагать, что реализация цитотоксической функции CD16^{hi}CD56-NK требует повышенного потребления глюкозы. Хотя функции CD16^{hi}CD56-NK до конца не изучены, полученные результаты делают их перспективным объектом для использования в иммунотерапии.

В I триместре беременности происходит активация в первую очередь регуляторных CD16-CD56^{bright}NK, что выражается в усилении экспрессии Glut-1. По-видимому, это связано с усилением миграционной способности этих клеток в этот период. Также прослеживается тенденция к увеличению экспрессии Glut-1 и на цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK, но не на CD16^{hi}CD56-NK, что, очевидно, объясняется исходно высокой экспрессией Glut-1 на них. Масса митохондрий не меняется ни на регуляторных CD16-CD56^{bright}NK, ни на цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK и CD16^{hi}CD56-NK. Поэтому можно полагать, что увеличение потребления глюкозы активирует главным образом гликолиз в регуляторных CD16-CD56^{bright}NK, поскольку они не являются зре-

лыми [22–24]. При этом, несмотря на тенденцию к активации метаболизма, цитотоксичность $CD16^+CD56^{dim}NK$, $CD16^{hi}CD56-NK$ не меняется, что подтверждается отсутствием изменений в экспрессии $CD107a$, $CD94$.

В III триместре происходит активация преобладающей субпопуляции цитотоксических $CD16^+CD56^{dim}NK$, что выражается в увеличении массы и объема митохондрий и, по-видимому, свидетельствует об усилении процессов окислительного фосфорилирования в этой субпопуляции. Экспрессия $Glut-1$ во всех исследуемых субпопуляциях NK -клеток возвращается к исходным значениям у небеременных женщин. Активация цитотоксических $CD16^+CD56^{dim}NK$ сопровождается снижением экспрессии $CD94$ на них, что, по-видимому, является следствием их активации и/или созревания, однако это не сопровождается усилением экспрессии $CD107a$. Для цитотоксических $CD16^{hi}CD56-NK$ также выявляется тенденция к увеличению массы и объема митохондрий, что вместе с высокой экспрессией $Glut-1$ на протяжении всей беременности характеризует их высокую метаболическую активность. Экспрессия $CD94$ на $CD16^{hi}CD56-NK$ остается низкой как в I, так и в III триместре беременности по сравнению с другими субпопуляциями NK -клеток, но экспрессия $CD107a$ в III триместре на них снижается, что свидетельствует об ограничении процессов дегрануляции, и, как следствие, цитотоксичности, характерной для физиологической беременности [29]. На регуляторных $CD16-CD56^{bright}NK$ экспрессия $CD94$ увеличивается в III триместре по сравнению с I триместром, что согласуется с их незрелым статусом и низкой цитотоксичностью. Можно заключить, что одним из возможных механизмов ограничения цитотоксичности NK -клеток при физиологической беременности является регуляция экспрессии $CD94$. Другим механизмом, ограничивающим дегрануляцию NK -клеток в поздние сроки беременности, является увеличение экспрессии $Tim-3$ (иммуноглобулиновый и муциновый домен T -клеток) и $CD9$, описанное в работах ряда авторов [17, 32].

Суммируя полученные результаты, можно полагать, что при физиологической беременности в I триместре происходит активация метаболизма преимущественно в регуляторных $CD16-CD56^{bright}NK$, а в III триместре – в цитотоксических $CD16^+CD56^{dim}NK$, однако это не влияет на их дегрануляцию. Минорная субпопуляция $CD16^{hi}CD56-NK$ сохраняет высокую активность на протяжении всей беременности, но к концу беременности их цитотоксическая активность снижается. Полученные результаты важны для понимания механизмов регуляции функций NK -клеток при беременности.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е.Г.О. и С.В.Ш.), сбор данных (О.А.Л.; О.Л.Г.), обработка данных (Е.Г.О.; О.А.Л.; О.Л.Г.), написание и редактирование манускрипта (Е.Г.О.; О.А.Л.; О.Л.Г., С.В.Ш.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Российского научного фонда (проект № 22–25–00694). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Они также были одобрены Локальным этическим комитетом Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, протокол № 16 от 5.06.2022 г.

Каждый участник исследования дал добровольное письменное информированное согласие после получения разъяснений о потенциальных рисках и преимуществах, а также о характере предстоящего исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Saito S, Nakashima A, Myojo-Higuma S, Shiozaki A (2008) The balance between cytotoxic NK cells and regulatory NK cells in human pregnancy. *J Reprod Immunol* 77(1): 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2007.04.007>
2. Di Santo JP (2008) Functionally distinct NK-cell subsets: developmental origins and biological implications. *Eur J Immunol* 38(11): 2948–2951. <https://doi.org/10.1002/eji.200838830>
3. Cocker ATH, Liu F, Djaoud Z, Guethlein LA, Parham P (2022) CD56-negative NK cells: Frequency in peripheral blood, expansion during HIV-1 infection, functional capacity and KIR expression. *Front Immunol* 13: 992723. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.992723>
4. Wijaya RS, Read SA, Schibeci S, Han S, Azardaryany MK, van der Poorten D, Lin R, Yuen L, Lam V, Douglas MW, George J, Ahlenstiel G (2021) Expansion of dysfunctional CD56-CD16⁺ NK cells in chronic hepatitis B patients. *Liver Int* 41(5): 969–981. <https://doi.org/10.1111/iv.14784>
5. Braud VM, Allan DSJ, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg GS, Lazetic S, Young NT, Bell JI, Phillips JH, Lanier LL, McMichael AJ (1998) HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391: 795–799. <https://doi.org/10.1038/35869>
6. Kusumi M, Yamashita T, Fujii T, Nagamatsu T, Kozuma S, Taketani Y (2006) Expression patterns of lectin-like natural killer receptors, inhibitory CD94/NKG2A, and activating CD94/NKG2C on decidual CD56bright natural killer cells differ from those on peripheral CD56dim natural killer cells. *J Reprod Immunol* 70(1–2): 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2005.12.008>
7. Moffett A, Shreeve N (2015) First do no harm: uterine natural killer (NK) cells in assisted reproduction. *Hum Reprod* 30: 1519–1525. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev098>
8. Shreeve N, Depierreux D, Hawkes D, Traherne JA, Sovio U, Huhn O, Jayaraman J, Horowitz A, Ghadially H, Perry JRB, Moffett A, Sled JG, Sharkey AM, Colucci F (2021) The CD94/NKG2A inhibitory receptor educates uterine NK cells to optimize pregnancy outcomes in humans and mice. *Immunity* 54(6): 1231–1244.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.03.021>
9. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M (2004) CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 294: 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.08.008>
10. Galandrin R, Palmieri G, Paolini R, Piccoli M, Frati L, Santoni A (1997) Selective binding of shc-SH2 domain to tyrosine-phosphorylated zeta but not gamma-chain upon CD16 ligation on human NK cells. *J Immunol* 159(8): 3767–3773. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.159.8.3767>
11. Arruvito L, Giulianelli S, Flores AC, Paladino N, Barboza M, Lanari C, Fainboim L (2008) NK cells expressing a progesterone receptor are susceptible to progesterone-induced apoptosis. *J Immunol* 180(8): 5746–5753. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5746>
12. Shirshov SV, Nekrasova IV, Gorbunova OL, Orlova EG (2017) Hormonal regulation of NK cell cytotoxic activity. *Dokl Biol Sci* 472(1): 28–30. <https://doi.org/10.1134/S0012496617010021>
13. Szekeres-Bartho J (2009) Progesterone-mediated immunomodulation in pregnancy: its relevance to leukocyte immunotherapy of recurrent miscarriage. *Immunotherapy* (5): 873–882. <https://doi.org/10.2217/imt.09.54>. PMID: 20636029
14. Shojaei Z, Jafarpour R, Mehdizadeh S, Bayatipoor H, Pashangzadeh S, Motallebnezhad M (2022) Functional prominence of natural killer cells and natural killer T cells in pregnancy and infertility: A comprehensive review and update. *Pathol Res Pract* 238: 154062. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.154062>
15. Mikhailova V, Grebenkina P, Khokhlova E, Davydova A, Salloum Z, Tyshchuk E, Zagainova V, Markova K, Kogan I, Selkov S, Sokolov D (2022) Pro- and anti-inflammatory cytokines in the context of NK cell-trophoblast interactions. *Int J Mol Sci* 23(4): 2387. <https://doi.org/10.3390/ijms23042387>

16. Shi Y, Ling B, Zhou Y, Gao T, Feng D, Xiao M, Feng L (2007) Interferon-gamma expression in natural killer cells and natural killer T cells is suppressed in early pregnancy. *Cell Mol Immunol* 4(5): 389–394. <http://www.cmi.ustc.edu.cn/4/5/389.pdf>
17. Орлова ЕГ, Логинова ОА, Горбунова ОЛ, Каримова НВ, Ширишев СВ (2023) Экспрессия молекул TIM-3, CD49a, CD9 на натуральных киллерах (NK) и Т-лимфоцитах с функциями NK периферической крови в разные сроки физиологической беременности. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 109(5): 572–587. [Orlova EG, Loginova OA, Gorbunova OL, Karimova NV, Shirshov SV (2023) Expression of TIM-3, CD49a, CD9 molecules on natural killer cells (NK) and T-lymphocytes with NK functions of peripheral blood at different periods of physiological pregnancy *Russ J Physiol* 109(5): 572–587. (In Russ)]. <https://doi.org/10.1134/S0022093023030146>
18. Михайлова ВА, Белякова КЛ, Сельков СА, Соколов ДИ (2017) Особенности дифференцировки NK-клеток: CD56^{dim} и CD56^{bright} NK-клетки во время и вне беременности *Мед иммунол* 19(1): 19–26. [Mikhailova VA, Belyakova KL, Selkov SA, Sokolov DI (2017) Features of NK cell differentiation: CD56^{dim} and CD56^{bright} NK cells during and outside pregnancy *Med Immunol* 19(1): 19–26. (In Russ)]. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2017-1-19-26>
19. Sotnikova N, Voronin D, Antsiferova Y, Bukina E (2014) Interaction of decidual CD56⁺NK with trophoblast cells during normal pregnancy and recurrent spontaneous abortion at early term of gestation. *Scand J Immunol* 80(3): 198–208. <https://doi.org/10.1111/sji.12196>
20. Гребнева ОС, Зильбер МЮ (2015) Особенности субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток плаценты после преждевременной отслойки. *Пермск мед журн* 32(1): 12–17. [Grebneva OS, Silber MU (2015) Characteristics of the subpopulation composition of immunocompetent cell placenta after a pre-existing layer *Perm Med J* 32(1): 12–17. (In Russ)]. <https://doi.org/10.17816/pmj32112-17>
21. Keating SE, Zaatz-Bittencourt V, Loftus RM, Keane C, Brennan K, Finlay DK, Gardiner CM (2016) Metabolic Reprogramming Supports IFN- γ Production by CD56^{bright} NK Cells. *J Immunol* 196(6): 2552–2560. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501783>
22. Cong J (2020) Metabolism of natural killer cells and other innate lymphoid cells. *Front Immunol* 11: 1989. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01989>
23. Highton AJ, Diercks BP, Möckl F, Martrus G, Sauter J, Schmidt AH, Bunders MJ, Körner C, Guse AH, Altfeld M (2020) High metabolic function and resilience of NKG2A-educated NK cells. *Front Immunol* 11: 559576. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.559576>
24. Pfeifer C, Highton AJ, Peine S, Sauter J, Schmidt AH, Bunders MJ, Altfeld M, Körner C (2018) Natural killer cell education is associated with a distinct glycolytic profile. *Front Immunol* 9: 3020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03020>
25. Presley AD, Fuller KM, Arriaga EA (2003) MitoTracker Green labeling of mitochondrial proteins and their subsequent analysis by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 793: 141. [https://doi.org/10.1016/s1570-0232\(03\)00371-4](https://doi.org/10.1016/s1570-0232(03)00371-4)
26. Cottet-Rousselle C, Ronot X, Leverve X, Mayol JF (2011) Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes. *Cytometry A* 79(6): 405–425. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.21061>
27. Meggyes M, Miko E, Polgar B, Bogar B, Farkas B, Illes Z (2014) Peripheral blood TIM-3 positive NK and CD8⁺T cells throughout pregnancy: TIM-3/Galectin-9 interaction and its possible role during pregnancy. *PLoS One* 9(3): e92371. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092371>
28. Meggyes M, Nagy DU, Feik T, Boros A, Polgar B, Szereday L (2022) Examination of the TIGIT-CD226-CD112-CD155 immune checkpoint network during a healthy pregnancy. *Int J Mol Sci* 23(18): 10776. <https://doi.org/10.3390/ijms231810776>
29. Whettlock M, Woon E, Cuff AO, Browne B, Johnson MR, Male V (2022) Dynamic changes in uterine NK cell subset frequency and function over the menstrual cycle and pregnancy Emily. *Front Immunol* 13: 880438. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.880438>
30. Pegram HJ, Andrews DM, Smyth MJ, Darcy PK, Kershaw MH (2011) Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol Cell Biol* 89(2): 216–224. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.78>

31. Beziat V, Hervier B, Achour A, Boutolleau D, Marfain-Koka A, Vieillard V (2011) Human NKG2A overrides NKG2C effector functions to prevent autoreactivity of NK cells. *Blood* 117: 4394–4396. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-319194>
32. Reyes R, Cardenes B, Machado-Pineda Y, Cabañas C (2018) Tetraspanin CD9: A key regulator of cell adhesion in the immune system. *Front Immunol* 9: 863. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00863>
33. Ширшев СВ (2009) Иммунология материнско-фетальных взаимодействий. Екатеринбург: УрО РАН. [Shirshev SV (2009) Immunology of maternal-fetal interactions. Ekaterinburg. Ural branch RAS. (In Russ)].
34. Shirshev SV, Nekrasova IV, Gorbunova OL, Orlova EG, Maslennikova IL (2017) MicroRNA in hormonal mechanisms of regulation of NK cell function. *Dokl Biochem Biophys* 474(1): 168–172. <https://doi.org/10.1134/S160767291703005X>

Expression of Molecules Characterizing Metabolic and Cytotoxic Activity of Natural Killer Different Subpopulations of Peripheral Blood During Pregnancy

E. G. Orlova^{a, #}, O. A. Loginova^a, O. L. Gorbunova^a, and S. V. Shirshev^a

^a*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS – branch of Perm Federal Research Center UB RAS, Perm, Russia*

[#]*e-mail: orlova_katy@mail.ru*

The functions of peripheral blood NK cells change significantly during pregnancy, which is mainly due to the inhibition of their cytotoxicity. The functional activity of NK cells is directly related to their metabolic status, but these changes in physiological pregnancy have not been studied. The aim of this work is to study the expression of Glut-1, CD94 and CD107a molecules characterizing metabolic and cytotoxic activity, as well as the mitochondrial mass of different subpopulations of peripheral blood NK cells in the I and III trimesters of physiological pregnancy. The object of the study was the peripheral blood of healthy women in the I and III trimesters of physiological pregnancy. The control group consisted of healthy non-pregnant women in the follicular phase of the menstrual cycle. The expression of Glut-1, CD94, CD107a molecules and the mitochondrial mass were analyzed by flow cytometry on regulatory (CD16⁺CD56^{bright}), cytotoxic (CD16⁺CD56^{dim}), minor cytotoxic (CD16^{hi}CD56⁻) NK cells. It was found that in non-pregnant women, minor cytotoxic CD16^{hi}CD56⁻ NK have the highest expression of Glut-1, CD107a and the lowest expression of CD94 compared to other NK cell subpopulations. On regulatory CD16⁺CD56^{bright} and cytotoxic CD16⁺CD56^{dim} NK, the expression of these molecules is comparable to each other. The mitochondrial mass is similar in all studied subpopulations. In the first trimester, the expression of Glut-1 increases on regulatory CD16⁺CD56^{bright} NK, the mitochondrial mass and the expression of CD94, CD107a in all NK cells do not differ from non-pregnant ones. In the third trimester, the mitochondrial mass increases in cytotoxic CD16⁺CD56^{dim} NK cells, but CD94 expression decreases compared to non-pregnant ones, and the expression CD94 in regulatory CD16⁺CD56^{bright} NK increases compared to the first trimester. CD107a expression in minor cytotoxic CD16^{hi}CD56⁻ NK decreases, but in other subpopulations does not change compared to non-pregnant. The expression of Glut-1 does not change in all subpopulations. Thus, different subpopulations of peripheral blood NK cells are heterogeneous in the expression of Glut-1, CD107a, CD94. The expression of these molecules during physiological pregnancy varies by trimester. The obtained results are important for understanding the mechanisms of NK cell function regulations during pregnancy.

Keywords: NK cells, pregnancy, Glut-1, mitochondrial mass, CD94, CD107a