

УДК632.939:612.112.94:612.63

DOI 10.52246/1606-8157\_2023\_28\_4\_23

## МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ РАЗНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ НАТУРАЛЬНЫХ КИЛЛЕРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ ПРОТЕКАЮЩЕЙ БЕРЕМЕННОСТИ

Е. Г. Орлова<sup>1</sup>, доктор биологических наук,  
О. А. Логинова<sup>1,3</sup>, кандидат биологических наук,  
О. Л. Горбунова<sup>1</sup>, кандидат биологических наук,  
Н. В. Каримова<sup>2</sup>,  
Н. П. Логинова<sup>3</sup>, доктор медицинских наук,  
С. В. Ширшев<sup>1</sup>, доктор медицинских наук

<sup>1</sup> Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, 614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, д. 13

<sup>2</sup> ООО «Централизованная клиничко-диагностическая лаборатория», 614025, Россия, г. Пермь, ул. Серпуховская, д. 4а, оф. 1

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России, 614990, Россия, г. Пермь, ул. Петропавловская, д. 26

**РЕЗЮМЕ** *Цель* – оценить метаболическую активность разных субпопуляций натуральных киллеров (НК-клеток) периферической крови в I и в III триместрах физиологически протекающей беременности (ФПБ).

*Материал и методы.* В исследование включены здоровые женщины в I или III триместрах ФПБ. Группу сравнения составили условно-здоровые небеременные женщины в фолликулярной фазе менструального цикла.

Объектом исследования являлась периферическая кровь. Метаболическую активность оценивали по экспрессии белка-транспортера глюкозы Glut-1 и включению митохондриального зонда Mito-Spy Green, отражающего массу и объем митохондриального компартмента, методом проточной цитофлюориметрии на регуляторных (CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>), цитотоксических (CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>), минорных цитотоксических (CD56<sup>-</sup>CD16<sup>hi</sup>) НК-клетках.

*Результаты и обсуждение.* У небеременных количество метаболически активных клеток, экспрессирующих Glut-1 и имеющих большую массу и объем митохондрий (Mito<sup>+</sup>), значительно выше в субпопуляции цитотоксических CD56<sup>-</sup>CD16<sup>hi</sup>НК-клеток, чем среди регуляторных CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> и цитотоксических CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>НК-клеток. В I триместре беременности уровень Glut-1<sup>+</sup>Mito<sup>+</sup> регуляторных CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> и цитотоксических CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>НК-клеток значительно нарастает по сравнению с таковым у небеременных, тогда как процент цитотоксических Glut-1<sup>+</sup>Mito<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>CD16<sup>hi</sup>НК-клеток остается высоким, но не меняется. В III триместре количество Glut-1<sup>+</sup>Mito<sup>+</sup> регуляторных CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>НК-клеток остается выше, чем у небеременных. Количество цитотоксических Glut-1<sup>+</sup>Mito<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>НК-клеток снижается по сравнению с таковым у небеременных, а Glut-1<sup>+</sup>Mito<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>CD16<sup>hi</sup>НК – по отношению к I триместру.

*Заключение.* При ФПБ увеличивается количество метаболически активных цитотоксических и регуляторных НК-клеток периферической крови.

**Ключевые слова:** натуральные киллеры, беременность, Glut-1, масса митохондрий.

\* Ответственный за переписку (corresponding author): orlova\_katy@mail.ru

Натуральные киллеры (NK-клетки) относятся к клеткам врожденного иммунитета и участвуют в противовирусной и противоопухолевой защите. Преобладающая субпопуляция NK-клеток периферической крови (более 90 %) имеет фенотип CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> и характеризуется высокой цитотоксичностью [2]. CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>NK-клетки составляют менее 10 % и являются регуляторными, активно синтезируют цитокины, имеют ограниченную цитотоксичность [2]. Также присутствует субпопуляция цитотоксических CD56<sup>-</sup>CD16<sup>hi</sup>NK-клеток, которые, очевидно, являются терминально дифференцированными, но их функции до конца не изучены [3, 10].

При ФПБ функции NK-клеток существенно меняются, что необходимо для сохранения беременности [7]. В первом триместре клетки трофобласта начинают экспрессировать молекулы HLA и происходит лютеоплацентарная смена, что является причиной высокой частоты спонтанных аборт [9]. Цитотоксический потенциал и продукция провоспалительных цитокинов NK-клетками периферической крови снижаются [2, 5, 7]. Регуляторные NK-клетки в ранние сроки беременности мигрируют из периферической крови в матку, где трансформируются в децидуальные NK-клетки и подавляют цитотоксические реакции к антигенам плода, продуцируют факторы роста трофобласта [2, 5, 7]. В III триместре изменения иммунореактивности связаны с подготовкой к родам [2, 5, 7]. Нарастание количества и цитотоксичности NK-клеток при беременности является одной из причин спонтанных аборт и других патологий беременности (преэклампсии) [1, 8, 9].

Функции NK-клеток зависят от их метаболической активности. Они используют глюкозу как основной источник энергии, которая поступает в клетку при участии белков-транспортёров

(Glut-1). Метаболизм глюкозы включает гликолиз и окислительное фосфорилирование. Незрелые NK-клетки обладают высокой метаболической активностью и преимущественно используют гликолиз даже при достаточном присутствии кислорода. По мере созревания NK-клеток поглощение глюкозы, экспрессия ферментов гликолиза снижаются, а окислительное фосфорилирование становится основной метаболической программой зрелых нестимулированных NK-клеток. При их активации увеличивается экспрессия Glut-1 и потребление глюкозы, интенсивность гликолиза и окислительного фосфорилирования, нарастает масса митохондрий. Однако изменение этих показателей при ФПБ не изучены.

Целью данной работы является исследование метаболической активности разных субпопуляций NK-клеток периферической крови в I и III триместрах ФПБ.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включено 20 женщин, среди которых было 7 беременных в I триместре и 5 пациенток в III триместре ФПБ. В группу сравнения вошли 8 условно-здоровых небеременных женщин в фолликулярной фазе менструального цикла.

Критерии включения: наличие одной и более успешных беременностей; отсутствие патологии 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.

Характеристика групп представлена в *таблице*.

**Таблица.** Клиническая и демографическая характеристика участниц исследования

Исследуемые группы	Me(Q1-Q3)	
	возраст, лет	срок беременности, недель
Небеременные женщины (n = 8)	29 (20–37)	–
Беременные, I триместр (n = 78)	26 (21–35)	10 (5–12)
Беременные, III триместр (n = 5)	33 (27–41)	35 (28–39)

Объектом исследования являлась периферическая кровь, которую забирали из локтевой вены утром натощак в вакуумные пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой в качестве антикоагулянта.

Количество НК-клеток разных субпопуляций в периферической крови определяли методом проточной цитометрии.

В исследуемых субпопуляциях НК-клеток оценивали процент клеток, позитивных по экспрессии Glut-1 (Glut-1<sup>+</sup>), и включению митохондриально-го зонда MitoSpy Green (Mito<sup>+</sup>) [4].

Увеличение экспрессии Glut-1 происходит при активации НК-клеток и свидетельствует об усилении потребления глюкозы, интенсивности гликолиза и/или окислительного фосфорилирования, сопровождается нарастанием массы митохондрий.

Краситель MitoSpy Green избирательно накапливается в матриксе митохондрий, где связывается белками митохондрий [4]. Накопление MitoSpy Green в клетке прямо пропорционально массе и объему митохондриального компартамента. Увеличение массы и объема митохондрий может быть свидетельством преобладания анаболических процессов над катаболическими, что сопровождается усилением биогенеза митохондрий.

Статистический анализ проводили с помощью программы Prism 8.0.1. (Graphpad, США). Для проверки нормальности распределения использовали критерий Колмогорова – Смирнова. Данные представлены в виде медианы (Me), нижних (LQ) и верхних квартилей (UQ). Достоверность различий между группами определяли с использованием критерия Крускала – Уоллиса для множественных сравнений независимых переменных. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

Исследование одобрено локальным этическим комитетом ИЭГМ УрО РАН (протокол № 16 от 05.06.2022) и проведено в соответствии с этическими стандартами национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года с ее последующими изменениями или сопоставимыми нормам этики.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-25-00694).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У небеременных количество метаболически активированных клеток, экспрессирующих Glut-1 и имеющих большую массу и объем митохондрий (Mito<sup>+</sup>), значительно выше в субпопуляции цитотоксических CD56<sup>+</sup>CD16<sup>hi</sup>НК-клеток, чем среди регуляторных CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> и цитотоксических CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>НК-клеток (рис.).

Согласно данным литературы, цитотоксические CD56<sup>+</sup>CD16<sup>hi</sup>НК-клетки являются конечной стадией дифференцировки НК-клеток и обладают наибольшей цитотоксичностью, с чем, по-видимому, связана их высокая метаболическая активность [3, 10].

В I триместре беременности уровень метаболически активных (Glut-1<sup>+</sup>Mito<sup>+</sup>) регуляторных CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> и цитотоксических CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>НК-клеток значительно нарастает по сравнению с таковыми у небеременных. Согласно данным литературы, именно в I триместре происходят наиболее значимые изменения функциональной активности НК-клеток периферической крови, что, согласно полученным результатам, ассоциировано с увеличением потребления глюкозы и активации метаболизма. Тогда как процент цитотоксических Glut-1<sup>+</sup>Mito<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>hi</sup>НК-клеток остается высоким, но не меняется по сравнению с таковым у небеременных, что, по-видимому, связано с их исходно повышенной метаболической активностью.

В III триместре количество Glut-1<sup>+</sup>Mito<sup>+</sup> регуляторных CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> НК-клеток остается повышенным по сравнению с таковым у небеременных, тогда как уровень Glut-1<sup>+</sup>Mito<sup>+</sup>клеток в субпопуляции цитотоксических CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>НК-клеток снижается и не отличается от аналогичного показателя у небеременных. Можно полагать, что у регуляторных НК-клеток потребление глюкозы и, как следствие, метаболическая активность в III триместре остаются повышенными, тогда как у преобладающей субпопуляции цитотоксических НК-клеток метаболическая активность возвращается к исходным значениям, таким, как у небеременных. Количество Glut-1<sup>+</sup>Mito<sup>+</sup>клеток в

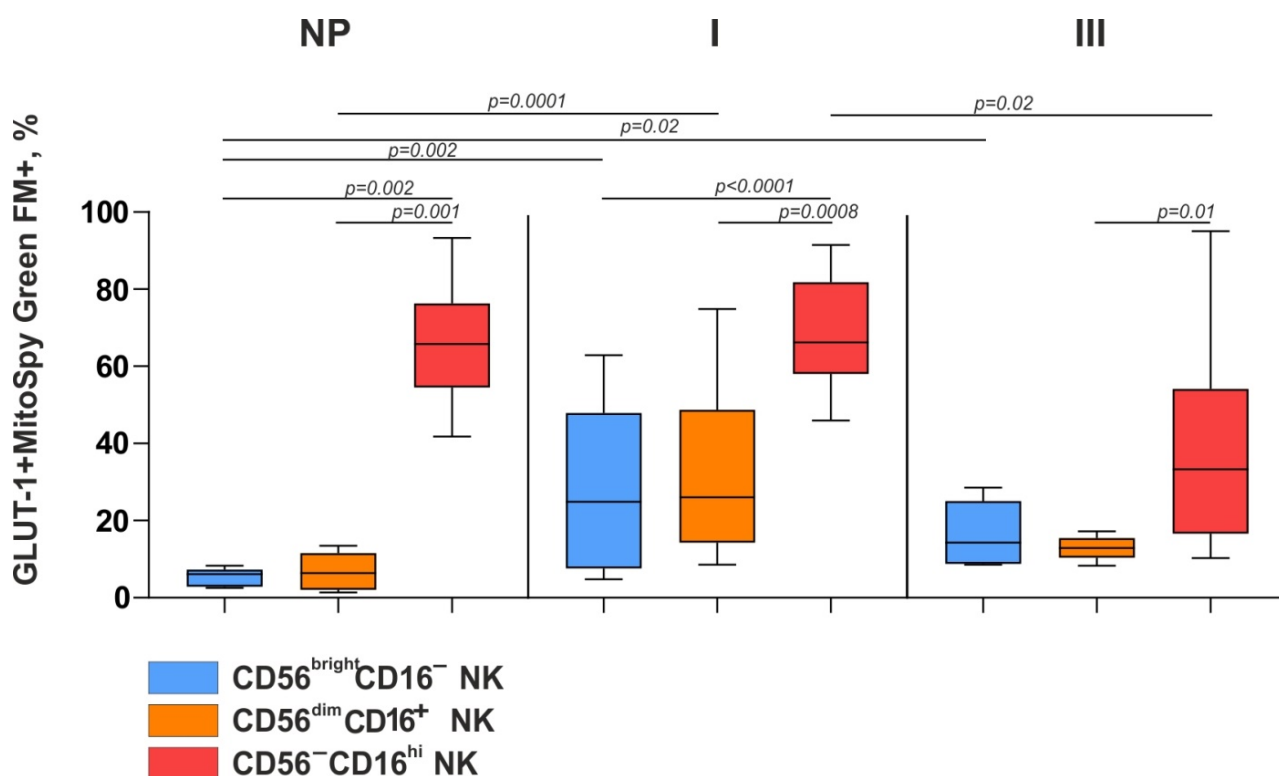


Рис. Процент клеток, позитивных по экспрессии Glut-1 и включению митохондриального зонда MitoSpy Green (Glut-1<sup>+</sup>Mito<sup>+</sup>), в разных субпопуляциях NK-клеток периферической крови у небеременных (NP), беременных в I (I) и III (III) триместрах ФПБ.

Примечание: CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>NK – регуляторные, CD16<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>NK и CD56<sup>-</sup>CD16<sup>hi</sup>NK – цитотоксические NK-клетки.

субпопуляции цитотоксических CD56<sup>-</sup>CD16<sup>hi</sup>NK в III триместре беременности снижается по сравнению с I триместром, но в общей популяции NK-клеток они остаются наиболее метаболически активными.

Анализируя полученные результаты, следует отметить, что ведущими регуляторами функциональной активности клеток иммунной системы при ФПБ являются гормоны, продуцируемые плацентой [6, 9], к большинству которых NK-клетки экспрессируют рецепторы [6, 9]. Под влиянием гормонов гестации происходит системное угнетение цитотоксической активности NK-клеток периферической крови, что необходимо для успешного протекания беременности, поскольку цитотоксические NK-клетки способны атаковать клетки плода, несущие чужеродные антигены [2, 5, 8]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что угнетение цитотоксичности NK-клеток (CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>; CD56<sup>-</sup>NKCD16<sup>hi</sup>), наиболее значимое на ранних

сроках беременности, сопровождается увеличением метаболической активности этих клеток. А к концу беременности метаболическая активность цитотоксических NK-клеток снижается до исходных значений, таких, как у небеременных, что необходимо для защиты организма матери от инфекций и подготовке к родам. Регуляторные CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>NK-клетки, основной функцией которых является продукция цитокинов и фетотрофических факторов, сохраняют повышенную метаболическую активность до конца беременности. Следовательно, регуляция метаболизма в NK-клетках является важным механизмом контроля их функциональной активности. А нарушение этих механизмов может стать причиной патологий беременности иммунного генеза. Полученные результаты имеют важное практическое значение, поскольку активированные NK-клетки широко используются для лечения онкологических заболеваний.

## ВЫВОДЫ

1. При ФПБ регуляторные НК-клетки сохраняют повышенную метаболическую активность и в I, и в III триместрах.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гребнева О.С., Зильбер М.Ю. Особенности субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток плацент после преждевременной отслойки. Пермский медицинский журнал 2015;32(1):12-17. <https://doi.org/10.17816/pmj32112-17>.
2. Михайлова В.А., Белякова К.Л., Сельков С.А., Соколов Д.И. Особенности дифференцировки НК-клеток: CD56<sup>dim</sup> и CD56<sup>bright</sup> НК-клетки во время и вне беременности. Медицинская иммунология. 2017;19(1):19-26. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2017-1-19-26>.
3. Cocker ATH, Liu F, Djaoud Z, Guethlein LA, Parham P. CD56-negative NK cells: Frequency in peripheral blood, expansion during HIV-1 infection, functional capacity and KIR expression. *Frontiers in Immunology*. 2022;13:992723. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.992723>.
4. Cottet-Rousselle C, Ronot X, Leverve X, Mayol JF Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes. *Cytometry Part A*. 2011;79(6):405-425. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.21061>.
5. Mikhailova V, Grebenkina P, Khokhlova E, Davydova A, Salloum Z, Tyshchuk E, Zagainova V, Markova K, Kogan I, Selkov S, Sokolov D Pro- and anti-inflammatory cytokines in the context of NK cell-trophoblast interactions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(4):2387. <https://doi.org/10.3390/ijms23042387>.
6. Shirshv SV, Nekrasova IV, Gorbunova OL, Orlova EG Hormonal regulation of NK cell cytotoxic activity. *Doklady Biological Sciences*. 2017;472(1):28-30. <https://doi.org/10.1134/S0012496617010021>.
7. Shojaei Z, Jafarpour R, Mehdizadeh S, Bayatipoor H, Pashangzadeh S, Motallebnezhad M Functional prominence of natural killer cells and natural killer T cells in pregnancy and infertility: A comprehensive review and update. *Pathology Research and Practice*. 2022;238:154062. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.154062>.
8. Sotnikova N, Voronin D, Antsiferova Y, Bukina E Interaction of decidual CD56<sup>+</sup>NK with trophoblast cells during normal pregnancy and recurrent spontaneous abortion at early term of gestation. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2014;80(3):198-208. <https://doi.org/10.1111/sji.12196>.
9. Szekeres-Bartho J. Progesterone-mediated immunomodulation in pregnancy: its relevance to leukocyte immunotherapy of recurrent miscarriage. *Immunotherapy*. 2009;5:873-882. <https://doi.org/10.2217/imt.09.54>. PMID: 20636029.
10. 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 Expansion of dysfunctional CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> NK cells in chronic hepatitis B patients. *Liver International*. 2021;41(5):969-981. <https://doi.org/10.1111/liv.14784>.

**METABOLIC ACTIVITY OF VARIOUS SUBPOPULATIONS OF NATURAL KILLERS OF PERIPHERAL BLOOD IN PHYSIOLOGICALLY OCCURRING PREGNANCY**

E. G. Orlova, O. A. Loginova, O. L. Gorbunova, N. V. Karimova, N. P. Loginova, S. V. Shirshv

**ABSTRACT** *Objective* – to estimate metabolic activity of various subpopulations of natural killers (NK-cells) of peripheral blood in the first and third trimesters of physiologically occurring pregnancy (POP).

*Material and methods.* Healthy women in the first or in the third trimester of POP were enrolled in the study. Comparison group was formed of conditionally healthy women in the follicular phase of the menstrual cycle.

Peripheral blood was the object of the research. Metabolic activity was evaluated by expression of glucose transporter protein Glut-1 and activation of the mitochondrial probe MitoSpyGreen, reflected the mass and the volume of mitochondrial compartment, by flow cytofluorometry method on regulatory (CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>), cytotoxic (CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>), minor cytotoxic (CD56<sup>-</sup>CD16<sup>hi</sup>)NK-cells.

*Results and discussion.* In non-pregnant women the quantity of metabolically activated cells expressing Glut-1 and having larger mass and volume of mitochondria (Mito<sup>+</sup>), was significantly higher in the subpopulation of cytotoxic CD56<sup>-</sup>CD16<sup>hi</sup>NK-cells than among regulatory CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> and cytotoxic CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>NK-cells. In the first trimester of pregnancy the level of Glut-1<sup>+</sup>Mito<sup>+</sup> regulatory CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> and cytotoxic CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK-cells significantly increased in comparison with the same level in non-pregnant women, then how the percentage of cytotoxic Glut-1<sup>+</sup>Mito<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>CD16<sup>hi</sup>NK-cells remained high but did not change. In the III trimester the quantity of Glut-1<sup>+</sup>Mito<sup>+</sup> regulatory CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>NK-cells remained higher than in non-pregnant women. The quantity of cytotoxic Glut-1<sup>+</sup>Mito<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>NK-cells decreased in comparison with the same parameter in non-pregnant women, and Glut-1<sup>+</sup>Mito<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>CD16<sup>hi</sup>NK-cells in relation to the first trimester.

*Conclusion.* The quantity of metabolically cytotoxic and regulatory NK-cells of peripheral blood increased in POP.

**Key words:** natural killers, pregnancy, Glut-1, mitochondria mass.