

КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА  
И ПРОЛИФЕРАЦИЯ

УДК 62.018.2:017.12

ЭКСТРАТИМИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА  
И АНТИГЕНРАСПОЗНАЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ  $\alpha\beta$ Т-ЛИМФОЦИТОВ  
ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ У МЫШЕЙ

© 2013 г. Е. М. Куклина\*, С. В. Ширшев, Н. С. Глебездина

Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН,  
614081 Пермь, ул. Голева, д. 13

\*E-mail: [ibis\\_07@mail.ru](mailto:ibis_07@mail.ru)

Поступила в редакцию 12.08.11 г.

Окончательный вариант получен 17.11.11 г.

Изучена реактивность  $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов беременных самок СВА в отношении антигенов самца, а также наличие процессов реаранжировки генов антигенного рецептора Т-клеток в периферических лимфоидных органах мышей при трех вариантах скрещивания: СВА  $\times$  BALB/c (нормальная аллогенная беременность), СВА  $\times$  СВА (сингенная беременность) и СВА  $\times$  DBA/2 (склонная к аборт комбинированная). Показано, что пролиферативный ответ  $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов беременных самок СВА на клетки селезенки самца наиболее выражен при нормальной аллогенной беременности, в меньшей степени – при сингенной беременности, и не выявляется в комбинации СВА  $\times$  DBA/2. При этом клетки парааортальных лимфатических узлов (дренирующих матку) отвечают на антигены самца достоверно эффективнее, чем лимфоциты мезентериальных и подмышечных лимфатических узлов. Одновременная оценка экспрессии рекомбиназы RAG-1, ключевого фермента реаранжировки генов Т-клеточного рецептора, выявила аналогичные закономерности – преимущественную активность рекомбиназы в Т-лимфоцитах парааортальных лимфатических узлов беременных самок СВА, что указывает на связь экстратимической реаранжировки генов антигенного рецептора с изменением антигенраспознающего репертуара этих клеток. Обсуждается возможное биологическое значение выявленного феномена.

*Ключевые слова:*  $\alpha\beta$ Т-лимфоциты, экстратимическая дифференцировка, реаранжировка генов TCR, антигенраспознающий репертуар, смешанная культура лимфоцитов, беременность.

DOI: 10.7868/S0475145013020079

Предыдущими исследованиями мы выявили неизвестный ранее феномен – индукцию реаранжировки генов Т-клеточного рецептора (T Cell Receptor, TCR) в периферических Т-лимфоцитах при беременности (Ширшев и др., 2007). В частности, мы показали экспрессию ключевого маркера реаранжировки, рекомбиназы RAG-1 (Recombination Activating Genes), в Т-клетках периферических лимфоидных органов беременных мышей. Теоретически, такой процесс должен сопровождаться появлением на мембране Т-лимфоцита нового антигенного рецептора, с измененной специфичностью (Куклина, 2006). А поскольку на периферии отсутствуют условия, обеспечивающие эффективную клональную селекцию вновь образующихся Т-клеток (как это в норме происходит в тимусе), реаранжировка генов TCR в периферических лимфоидных органах неизбежно должна сопровождаться изменением антигенраспознающего репертуара Т-лимфоцитов, в частности, появлением аутореактивных Т-клеточных клонов.

Целью настоящей работы было сопоставление антигенраспознающей активности  $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов беременных мышей с таковой для небеременных, с одновременной оценкой рекомбиназной активности в этих клетках, при разных вариантах скрещивания – нормальном аллогенном, сингенном и в склонной к аборт комбинированной.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовались линейные самки мышей СВА, которых скрещивали с самцами разных линий – BALB/c (нормальная аллогенная беременность), СВА (нормальная сингенная беременность) и DBA/2 (склонная к аборт комбинированная) (Chaouat et al., 1983; Lin et al., 2004). Животные были получены из питомника РАМН (“Рапполово”, Санкт-Петербург). Беременность фиксировали по появлению вагинальной пробки. Срок беременности у животных (9-е сутки) подбирали в соответствии с тем, что у самок СВА  $\times$  DBA/2 аборты про-

исходят, как правило, на 10–14 день беременности (Chaouat et al., 1983; Lin et al., 2004).

Объектами исследования служили тимоциты и фракционированные периферические Т-лимфоциты, выделенные из лимфоузлов трех разных типов – парааортальных (дренирующих матку), а также мезентериальных и подмышечных (не дренирующих матку) (Lin et al., 2004). В основной серии экспериментов при фракционировании Т-лимфоцитов из клеточной суспензии, полученной в результате гомогенизации лимфоузлов, удаляли В-лимфоциты, способные в норме реаранжировать цепи антигенного рецептора на периферии (Hikida et al., 1996), – с помощью специфической антисыворотки к иммуноглобулинам мыши (“Медгамал”, Россия). В заключительной серии экспериментов для исключения влияния на результат минорной субпопуляции  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, традиционно дифференцирующихся вне тимуса и также экспрессирующих белки RAG на периферии (Mincheva-Nilsson et al., 1997; Robey, Fowlkes, 1998) из клеточной суспензии направленно выделялись  $\alpha\beta$ Т-лимфоциты – иммуномагнитным фракционированием с помощью моноклональных антител H57-597 к  $\beta$ -цепи TCR мыши (“Caltag”, США).

В клетках оценивали экспрессию мРНК рекомбиназы RAG-1, а также  $\beta$ -актина (положительный контроль на наличие мРНК в пробе).

Выделение РНК, обратную транскрипцию и амплификацию проводили с помощью соответствующих наборов (“Лаборатория Изоген”, Россия): для выделения тотальной РНК (Trizol RNA Prep 100), для обратной транскрипции (GenePak RT Core) и для амплификации (GenePak PCR Core). В работе использовались следующие специфические праймеры и соответствующие режимы амплификации: для RAG-1 – 5'-CATC-GAGACAGTCCCTTCC-3' и 5'-CGATAGAGC-CATCCCTTTC-3' (Vaitaitis et al., 2003), 92°C × 30 с, 60°C × 30 с, 72°C × 60 с, 35 циклов; для  $\beta$ -актина – 5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3' и 5'-TTTGATGTCACGCACGATTT-3' (подобраны с помощью программы Primer 3: [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)), 92°C × 30 с, 60°C × 30 с, 72°C × 60 с, 30 циклов.

Электрофорез проводили стандартным методом в 1.5% геле агарозы (“Serva”, Германия).

Антигенраспознающую активность Т-клеток при беременности оценивали по пролиферативному ответу фракционированных  $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов лимфатических узлов беременных мышей ( $2 \times 10^5$  на пробу) на антигены самцов соответствующих линий и небеременных самок, в однонаправленной смешанной культуре лимфоцитов. В качестве стимулирующих клеток использовали клетки селезенки мышей, а также, в ряде экспериментов, фракционированные  $\alpha\beta$ Т-лимфоциты подмышечных и мезентериальных лимфатических узлов

( $2 \times 10^5$  на пробу), предварительно обработанных митомицином С (25 мкг/мл). Клетки культивировали 72 часа. Результаты оценивали в МТТ-тесте, основанном на определении количества жизнеспособных клеток в пробе (Wei et al., 2005). Для этого за 4 часа до окончания культивирования в пробы вносили МТТ (водорастворимая соль тетразолия, полное название – (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5)-diphenyltetrazolium bromide) в конечной концентрации 0.5 мг/мл. После культивирования пробы центрифугировали (1500 об./мин × 10 мин), удаляли супернатант и вносили изопропанол для солюбилизации формазана, образующегося из МТТ при разрезании тетразолиевого кольца дегидрогеназами и откладывающегося в клетке в виде гранул. Количество образовавшегося формазана оценивалось спектрофотометрически при длине волны 570 нм. Индекс пролиферации определялся как отношение соответствующих показателей оптической плотности для стимулированной (клетками самца) и не стимулированной проб.

Статистический анализ проводился с использованием *t*-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ пролиферативного ответа  $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов беременных самок СВА на антигены самцов соответствующих линий показал, что при нормальной беременности (и сингенной, и аллогенной) индекс пролиферации Т-клеток, определяемый как отношение показателей пролиферативной активности в стимулированной и нестимулированной пробах, выше, чем у небеременных животных (табл. 1), но зависит от происхождения Т-клеток – конкретно, от типа лимфатических узлов, из которых они получены. Наиболее выраженным этот эффект был при нормальной аллогенной беременности (СВА × BALB/c) для Т-лимфоцитов парааортальных лимфоузлов (дренирующих матку), существенно меньшим, но статистически значимым – для подмышечных, тогда как для Т-клеток мезентериальных лимфатических узлов ответ на антигены самца не отличался от такового для небеременных самок СВА. Более того, достоверные различия в индексах пролиферации были выявлены и в пределах одной группы животных: ответ Т-клеток у беременных самок СВА × BALB/c был выше в парааортальных лимфатических узлах по сравнению с мезентериальными (табл. 1). В отличие от нормальной беременности, в комбинации СВА × DBA/2, характеризующейся высоким уровнем спонтанных абортот, ответа периферических Т-клеток на антигены самцов DBA/2 не выявлено (табл. 1). Возможно, отсутствие ответа в данной модели и является одной из причин предрасположенности к абортот, поскольку, согласно современным представлениям, для успешной имплантации и плацентации необ-

**Таблица 1.** Пролиферативный ответ периферических  $\alpha\beta$ T-лимфоцитов самок СВА на антигены самца в односторонней смешанной культуре лимфоцитов

Отвечающие клетки ( $\alpha\beta$ T-лимфоциты самки)		Индекс стимуляции ( $M \pm m$ )		
		Стимулирующие клетки (клетки селезенки самца)		
		BALB/c	СВА	DBA/2
Небеременные самки СВА	парааортальные ЛУ	1.47 $\pm$ 0.081	н.д.	1.19 $\pm$ 0.074
	мезентериальные ЛУ	1.39 $\pm$ 0.089		1.18 $\pm$ 0.062
	подмышечные ЛУ	1.37 $\pm$ 0.109		1.21 $\pm$ 0.048
Беременные самки СВА $\times$ BALB/c	парааортальные ЛУ	2.09 $\pm$ 0.222*		
	мезентериальные ЛУ	1.49 $\pm$ 0.124		
	подмышечные ЛУ	1.69 $\pm$ 0.196*		
Беременные самки СВА $\times$ СВА	парааортальные ЛУ		1.72 $\pm$ 0.183	
	мезентериальные ЛУ		1.66 $\pm$ 0.178	
	подмышечные ЛУ		1.46 $\pm$ 0.138	
Беременные самки СВА $\times$ DBA/2	парааортальные ЛУ			1.083 $\pm$ 0.042 <sup>a, b</sup>
	мезентериальные ЛУ			1.11 $\pm$ 0.045 <sup>b</sup>
	подмышечные ЛУ			1.01 $\pm$ 0.035 <sup>a, b</sup>

Примечания: в каждой группе 8–10 животных; ЛУ – лимфатические узлы; н.д. – нет данных; индекс пролиферации определялся как отношение соответствующих показателей оптической плотности для стимулированной (клетками селезенки самца) и не стимулированной проб.

\*  $p < 0.05$  (сопоставление с ответом Т-клеток соответствующих лимфатических узлов небеременных самок).

<sup>a</sup>  $p < 0.05$  (сопоставление с соответствующим показателем для беременности СВА  $\times$  BALB/c).

<sup>b</sup>  $p < 0.05$  (сопоставление с соответствующим показателем для беременности СВА  $\times$  СВА).

ходим достаточный уровень иммунореактивности материнского организма в отношении отцовских и фетальных антигенов – цитокины, секретируемые в ходе иммунного ответа, оказывают трофическое действие на плаценту и плод (Wegmann et al., 1993).

В целом, вычленив из всего многообразия выявленных эффектов данные, соответствующие целям и задачам настоящей работы, можно сказать, что при нормальной аллогенной беременности (СВА  $\times$  BALB/c)  $\alpha\beta$ T-лимфоциты дренирующих матку (парааортальных) лимфатических узлов отвечают на антигены самца достоверно эффективнее Т-клеток лимфоузлов, не дренирующих матку, – мезентериальных и подмышечных. Возможно, данный эффект связан с локальным изменением антигенраспознающего репертуара этих клеток. Однако, строго говоря, он может иметь и альтернативное объяснение, основанное на существовании характерного для беременности феномена – фетального микрохимеризма, т.е. персистенции фетальных клеток в материнском организме (Bianchi et al., 1996; O'Donoghue et al., 2004). Следствием микрохимеризма является примирование материнских лимфоцитов антигенами плода, которое происходит преимущественно в лимфатических узлах, дренирующих матку. Именно с этим феноменом связан, по-видимому, показанный в настоящей работе более высокий Т-клеточный ответ на антигены самца у беременных самок

по сравнению с небеременными. Им же можно объяснить и различия в ответе на антигены самца Т-лимфоцитов разных лимфатических узлов при нормальной аллогенной беременности.

Чтобы нивелировать влияние эффекта примирования при беременности Т-клеток лимфатических узлов фетальными антигенами, мы определили пролиферативный ответ Т-лимфоцитов беременных самок СВА  $\times$  BALB/c на клетки селезенки небеременных самок СВА. В результате были выявлены следующие закономерности: индекс пролиферации Т-клеток парааортальных лимфатических узлов у этих животных был достоверно выше такового для Т-лимфоцитов мезентериальных лимфатических узлов, а также Т-лимфоцитов парааортальных лимфоузлов небеременных самок (рисунок). Поскольку в данной модели возможность предварительного примирования Т-клеток существенно снижена, появление реактивности Т-лимфоцитов парааортальных лимфоузлов в отношении собственных клеток связано, вероятнее всего, именно с изменением антигенраспознающего репертуара, в частности, с появлением новых аутореактивных Т-клеточных клонов.

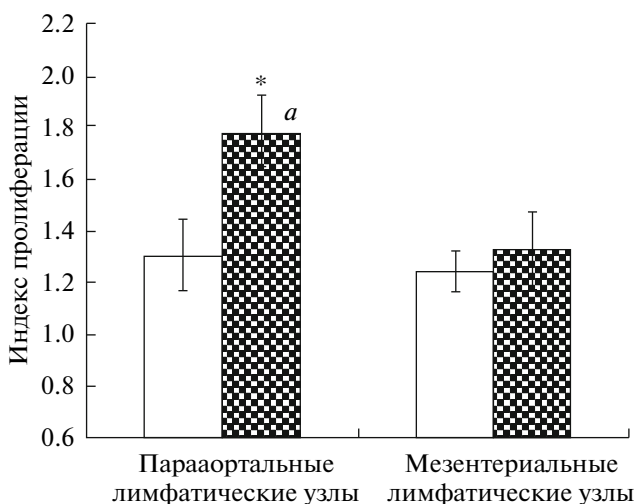
Одновременная оценка наличия процессов реаранжировки генов TCR в периферических Т-лимфоцитах беременных самок СВА в целом подтвердила полученные нами ранее результаты (Ширшев и др., 2007). Как видно из таблицы 2,

**Таблица 2.** Экспрессия RAG-1 αβТ-лимфоцитами мышей при беременности

Животные	Процент животных с экспрессией мРНК RAG-1 в αβТ-лимфоцитах		
	Источник αβТ-клеток		
	Парааортальные ЛУ	Мезентериальные ЛУ	Подмышечные ЛУ
Небеременные самки СВА	12.5	0	0
Беременные самки СВА × BALB/с	88.8	14.3	44.4
Беременные самки СВА × СВА	25	0	25
Беременные самки СВА × DBA/2	77.7	16.6	22.2

Примечания: в каждой группе 8–10 животных; ЛУ – лимфатические узлы.

экспрессия мРНК рекомбиназы RAG-1, ключевого фактора и маркера реаранжировки генов в клетке, наиболее стабильно выявлялась в Т-клетках парааортальных лимфатических узлов – как в моделях нормальной беременности (и сингенной, и аллогенной), так и в склонной к аборту комбинации. Поскольку характер распределения рекомбиназной активности аналогичен появлению аутореактивных реакций Т-клеток, эти процессы, по-видимому, взаимосвязаны.



Пролиферативный ответ периферических αβТ-лимфоцитов беременных самок СВА × BALB/с на антигены небеременных самок СВА в однонаправленной смешанной культуре лимфоцитов.

Примечания: индекс пролиферации определялся как отношение соответствующих показателей оптической плотности для стимулированной (клетками селезенки небеременных самок СВА) и не стимулированной проб; незаштрихованные столбцы – небеременные самки СВА, заштрихованные – беременные самки СВА × BALB/с.

\*  $p < 0.05$  (сопоставление с ответом Т-клеток соответствующих лимфатических узлов небеременных самок);

$a p < 0.05$  (сопоставление с ответом Т-клеток мезентериальных лимфатических узлов беременных самок СВА × BALB/с).

В целом, полученные данные позволяют предполагать, что ассоциированная с беременностью экстрамитическая реаранжировка генов TCR приводит к появлению на периферии αβТ-лимфоцитов с измененной специфичностью антигенного рецептора, которые, по-видимому, не подвергаются клональной селекции. Биологическое значение этого феномена на настоящий момент неизвестно. С одной стороны, он может быть важен для формирования толерантности материнского организма к генетически чужеродному плоду. С другой стороны, появление потенциально аутореактивных Т-клеточных клонов в результате реаранжировки генов TCR на периферии может быть причиной развития аутоиммунных заболеваний, которые, как известно, довольно часто провоцируются беременностью (Куклина, 2010).

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

Куклина Е.М. Ревизия антигенного рецептора Т-лимфоцитов // Биохимия. 2006. Т. 71. № 8. С. 1021–1033.

Куклина Е.М. Беременность и аутоиммунитет // Российский иммунологический журнал. 2010. Т. 4 (13). № 4. С. 352–356.

Ширшев С.В., Куклина Е.М., Максимов А.Ю. и др. Экстрамитическая реаранжировка генов антигенного рецептора αβТ-лимфоцитов при беременности // Биохимия. 2007. Т. 72. № 9. С. 1207–1213.

Bianchi D.W., Zickwolf G.K., Weil G.J. et al. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93(2). P. 705–708.

Chaouat G., Kiger N., Wegmann T.G. Vaccination against spontaneous abortion in mice // J. Reprod. Immunol. 1983. V. 5(6). P. 389–392.

Hikida M., Mori M., Takai T. et al. Reexpression of RAG-1 and RAG-2 genes in activated mature mouse B cells // Science. 1996. V. 274(5295). P. 2092–2094.

Lin Y., Zeng Y., Zhao J. et al. Murine CD45+CD86+ cells isolated from para-aortic lymph nodes in an abortion-prone model // J. Reprod. Immunol. 2004. V. 64. P. 133–143.

Mincheva-Nilsson L., Kling M., Hammarstrom S. et al. Gamma delta T cells of human early pregnancy decidua:

- evidence for local proliferation, phenotypic heterogeneity, and extrathymic differentiation // *J. Immunol.* 1997. V. 159. P. 3266–3277.
- O'Donoghue K., Chan J., de la Fuente J. et al.* Microchimerism in female bone marrow and bone decades after fetal mesenchymal stem-cell trafficking in pregnancy // *Lancet.* 2004. V. 364 (9429). P. 179–182.
- Robey E.A., Fowlkes B.J.* The alpha beta versus gamma delta T-cell lineage choice // *Curr. Opin. Immunol.* 1998. V. 10(2). P. 181–187.
- Vaitaitis G.M., Poulin M., Sanderson R.J. et al.* Cutting edge: CD40-induced expression of recombination activating gene (RAG) 1 and RAG2: a mechanism for the generation of autoaggressive T cells in the periphery // *J. Immunol.* 2003. V. 170(7). P. 3455–3459.
- Wegmann T.G., Hui L., Guilbert L. et al.* Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? // *Immunol. Today.* 1993. V. 14(7). P. 353–356.
- Wei X., Jing L., Meiyu G. et al.* Potentiation of T cell function by a marine algae-derived sulfated polymannuronate: in vitro analysis of novel mechanisms // *J. Pharmacol. Sci.* 2005. V. 97(1). P. 107–115.

## Extrathymic Differentiation and Antigen Response of $\alpha\beta$ T Lymphocytes in Pregnancy

E. M. Kuklina, S. V. Shirshev, and N. S. Glebezdina

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Ural Branch,  
ul. Goleva 13, Perm, 614081 Russia  
e-mail: ibis\_07@mail.ru*

**Abstract**—We studied reactivity of  $\alpha\beta$ T lymphocytes in CBA pregnant females toward male antigens and the presence of gene rearrangement in T-cells antigen receptor in peripheral lymphoid organs of mice in the case of three breeding variants: CBA  $\times$  BALB/c (normal allogenic pregnancy), CBA  $\times$  CBA (syngenic pregnancy), and CBA  $\times$  DBA/2 (prone to abortion combination). It was shown that proliferative response of  $\alpha\beta$ T lymphocytes in pregnant CBA females to male spleen cells was the most marked at normal allogenic pregnancy, the least marked at syngenic pregnancy, and was not observed at the combination CBA  $\times$  DBA/2. In addition, cells of paraaortic lymphatic nodes (draining uterus) respond to male antigen reliably more effectively than lymphocytes in mesenterial and axillary lymphatic nodes. Simultaneous estimation of recombinase RAG-1, the key enzyme in rearrangement of T-receptor genes, revealed similar principles: predominant activity of recombinase in T lymphocytes in paraaortal lymphatic nodes of CBA pregnant females. This points to the relationship between extrathymic rearrangement of antigen receptor genes and change in the antigen-detecting repertoire of these cells. The possible biological significance of the discovered phenomenon is discussed.

**Keywords:**  $\alpha\beta$ T lymphocytes, extrathymatic differentiation, TCR gene rearrangement, antigen-detecting repertoire, combined lymphocytes culture, pregnancy.