

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 57.085.23+576.5

## Влияние фракций клеточного лизата естественных киллеров на пролиферацию клеток трофобласта в системе *in vitro*

А.В. Корневский<sup>\*</sup> , Ю.П. Милютин , С.К. Бочковский , Д.И. Соколов ,  
С.А. Сельков , О.Н. Беспалова

Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта,  
Россия, 199034, г. Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3

<sup>\*</sup>e-mail: a.korenevsky@yandex.ru

Развитие плаценты во многом определяется взаимодействием естественных киллеров (НК-клетки) и клеток трофобласта. Несмотря на интенсивные исследования, роль НК-клеток и методы коррекции их функциональной активности в репродукции остаются спорными. Целью данного исследования стало изучение влияния белковых фракций лизата НК-клеток на пролиферацию клеток трофобласта в модельном эксперименте *in vitro*. В результате хроматографического разделения было получено шесть фракций клеточного лизата с различным набором входящих в их состав белков (25–250 кДа). Установлено, что все исследованные фракции стимулируют пролиферацию клеток трофобласта. Во фракциях с молекулярными массами 36–250 кДа, 29–66 кДа и 47–62 кДа обнаружены маркеры пролиферации – протеинкиназа В (АКТ/РКВ) и киназы, регулируемые внеклеточными сигналами (ERK1/2). Полученные данные об изменении пролиферативной активности клеток линии JEG-3 под влиянием белковых фракций лизата клеток линии NK-92 гипотетически отражают поведение клеток хориона в окружении НК-клеток в случае их гибели при физиологических и патологических состояниях, вызванных вирусными и бактериальными инфекциями, а также другими стрессорными факторами, приводящими к репродуктивной патологии.

**Ключевые слова:** репродукция, плацента, естественные киллеры, трофобласт, пролиферация, АКТ/РКВ, ERK1/2

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-3-4

### Введение

Межклеточная коммуникация является неотъемлемой составляющей регуляции физиологических процессов в многоклеточном организме. Обмен сигналами может производиться как в одностороннем порядке, так и в контексте «диалога». Вариативность биологического ответа зависит от способов взаимодействия, среди которых можно выделить непосредственный клеточный контакт, секрецию и высвобождение сигнальных молекул, а также коммуникацию с помощью микровезикул [1, 2].

Естественные киллеры (НК-клетки, natural killer cells, NK cells) – популяция клеток врожденного иммунитета, обладающая цитотоксическими функциями и играющая регуляторную роль в отношении взаимодействующих с ними клеток благодаря рецепторному аппарату и за счет продукции цитокинов [3]. Развитие плаценты во многом определяется взаимодействием децидуальных НК-клеток и клеток трофобласта [4]. При наступлении беременности НК-клетки аккумулируют-

ся вокруг клеток трофобласта, принимая участие в регуляции пролиферации, миграции и инвазии трофобласта за счет секреции цитокинов и ростовых факторов [5]. Трофобласт в свою очередь секретирует хемокины и экспрессирует лиганды к адгезионным рецепторам НК-клеток [6]. В условиях контактного взаимодействия НК-клетки оказывают прямое цитотоксическое действие в отношении клеток трофобласта [7]. Причем их цитотоксичность зависит от того, находятся они в составе фракции моноклеаров или выделены из нее как самостоятельная популяция, а также от наличия в прошлом или настоящем у женщины беременности [8]. НК-клетки по-разному управляют ангиогенезом в совместной культуре эндотелиальных клеток и клеток трофобласта в случае их дистантного и контактного сокультивирования [9]. Клетки трофобласта, в зависимости от цитокинового микроокружения, воздействующего как на НК-клетки, так и на сам трофобласт, по-разному влияют на адгезию и трансмиграцию НК-клеток через собственный монослой [6, 10].

Таким образом, регуляция функции трофобласта и НК-клеток носит взаимный характер. Несмотря на интенсивные исследования, роль НК-клеток и методы коррекции их функциональной активности в репродукции остаются спорными. При этом до сих пор преобладают представления об их антагонистических взаимоотношениях, связанных со способностью НК-клеток к цитотоксическому действию на трофобласт.

Ранее нами были получены данные о влиянии микровезикул НК-клеток на функциональное состояние клеток трофобласта в системе *in vitro* [11]. Было установлено, что микровезикулы снижают пролиферативную активность клеток трофобласта, не изменяя соотношения фосфорилированных и нефосфорилированных форм киназ, регулируемых внеклеточными сигналами (ERK1/2, extracellular signal-regulated kinases 1/2), которое характеризует вовлеченность сигнального пути MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase) в этот процесс. При этом влияние содержимого самих НК-клеток на интенсивность пролиферации клеток трофобласта нами не изучалось. Указанный методологический подход мог бы дополнить полученные ранее данные о взаимодействии НК-клеток и клеток трофобласта как при контактном, так и при дистантном взаимодействии (секреция биологически активных продуктов и продукция микровезикул), моделируя процессы, происходящие *in vivo*. Изучение роли белкового состава клеток в межклеточных взаимодействиях может способствовать лучшему пониманию потенциальной роли тех или иных клеточных популяций в физиологических и патологических процессах, опосредованных различными способами межклеточной коммуникации.

Таким образом, целью данного исследования явилось изучение влияния белковых фракций лизата НК-клеток, полученных в результате микропрепаративного хроматографического разделения, на пролиферацию клеток трофобласта в модельном эксперименте *in vitro*.

### Материалы и методы

**Культуры клеток.** В качестве НК-клеток использовали клетки линии NK-92 (American Type Culture Collection, США), а в качестве объекта воздействия использовали клетки трофобласта линии JEG-3 (American Type Culture Collection, США). Для культивирования клеток линии NK-92 использовали полную ростовую среду, содержащую среду Minimum Essential Medium Eagle  $\alpha$ -модификации с добавлением 12,5% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 12,5% инактивированной лошадиной сыворотки, 0,2 мМ мио-инозитола, 0,02 мМ фолиевой кислоты, 2 мМ L-глутамина, 100 мкг/мл стрептомицина, 100 Ед/мл пенициллина, 20 мМ буфера HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин-

этансульфоновая кислота), 0,1 мМ меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich Chem. Co., США). Клетки линии JEG-3 культивировали в среде Dulbecco's Modified Eagle's Medium с добавлением 10% инактивированной ЭТС, 100 мкг/мл стрептомицина, 100 Ед/мл пенициллина, 0,5 мМ L-глутамина, 1 мл Minimum Essential Medium, 1 мМ пирувата натрия (Sigma-Aldrich Chem. Co., США). Все эксперименты проводили при 37°C во влажной атмосфере, 5% CO<sub>2</sub>. Жизнеспособность клеток оценивали при помощи раствора трипанового синего (Sigma-Aldrich Chem. Co., США), при этом она составляла не менее 96%.

**Индукторы.** В качестве индукторов клеток трофобласта линии JEG-3 использовали белковые фракции, полученные в результате разделения лизата клеток линии NK-92 с помощью метода микропрепаративной эксклюзионной жидкостной хроматографии высокого давления (см. ниже).

**Приготовление биоматериала.** В настоящей работе был использован оригинальный метод разрушения клеточных мембран [12]. Культуральную среду, содержащую клетки линии NK-92, центрифугировали при 500g (комнатная температура, 10 мин), осадок собирали и трижды промывали охлажденным фосфатным буфером Phosphate-Buffered Saline (0,01 M; pH 7,4) (Sigma-Aldrich Chem. Co., США). Очищенный осадок ресуспендировали в деионизированной воде стандарта MilliQ с добавлением коктейля ингибиторов протеаз и фосфатаз (Sigma-Aldrich Chem. Co., США) в концентрациях, указанных изготовителями, и хранили при -80°C до анализа. В день эксперимента клетки размораживали и подвергали пятикратному повторному замораживанию-оттаиванию, после чего интенсивно гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в течение 5 мин. Полученный материал центрифугировали при 19800g (4°C, 20 мин), а полученный супернатант отбирали для дальнейшего исследования.

**Препаративная хроматография.** Для разделения тотального лизата  $5,4 \times 10^7$  клеток на белковые фракции (субфракции цитоплазматической фракции) использовали хроматограф жидкостной 1260 Agilent Technologies Infinity II с программным обеспечением OpenLAB CDS ChemStation (Agilent Technologies, Inc., США). Хроматографическое разделение проводили в неденатурирующих условиях на колонке Agilent Bio SEC-3 Size Exclusion Column, 3  $\mu$ m, 300Å, 4,6×300 мм, (Agilent Technologies, Inc., США). В качестве подвижной фазы использовали бидистиллированную воду. Анализ проводили в изократическом режиме при температуре +4°C со скоростью потока подвижной фазы 0,35 мл/мин. В качестве детектора использовали диодную матрицу, регистрирующую поглощение при 210 и 230 нм. Время анализа составило 45 мин. Ввиду непрерывности хроматографического профиля деление на фракции осу-

шествовалось в режиме *time-line* по временным отрезкам длительностью 3 мин, начиная с 6-й мин (с 24-й мин в подвижной фазе после выхода из хроматографической колонки и последующего концентрирования общий белок не обнаруживался, что позволило исключить данный материал из последующей работы). В результате эксперимента было проведено 15 итераций деления. Полученные фракции концентрировали на вакуумном испарителе CentriVap Vacuum Concentrator (Labconco Corp., США) до объема, в котором концентрация общего белка превышала значение 5 мг/мл. Полученные концентраты стерилизовали пропусканием через шприцевые фильтры с диаметром пор 0,45 мкм (Corning Inc., США), замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$  и хранили до проведения анализа не более 2 нед.

**Спектрофотометрия.** Содержание общего белка в клеточных лизатах и белковых фракциях определяли по методу Бредфорда, используя спектрофотометр NanoDrop One (Thermo Scientific, США).

**Электрофорез.** Образцы белковых фракций лизата клеток линии NK-92 с равным количеством общего белка разделяли по молекулярным массам в 10%-ном полиакриламидном геле (Bio-Rad, США) в денатурирующих условиях по методу Лэммли.

**Оценка цитотоксичности подвижной фазы для хроматографии и белковых фракций лизата клеток линии NK-92.** Для определения минимальной токсической дозы подвижной фазы для хроматографии и полученных белковых фракций лизата клеток линии NK-92 в отношении клеток трофобласта линии JEG-3 в лунки 96-луночного плоскодонного планшета для адгезионных культур (Becton Dickinson, США) вносили клетки линии JEG-3 в концентрации  $3,5 \times 10^3$  клеток на лунку в 100 мкл полной культуральной среды (см. выше) с добавлением 10% ЭТС. Во избежание краевого эффекта в этом и всех последующих экспериментах с использованием планшетов крайние лунки по всему периметру заливали средой и не использовали в дальнейшем. Затем клетки культивировали в течение 24 ч в инкубаторе при  $37^{\circ}\text{C}$  во влажной атмосфере, 5%  $\text{CO}_2$ . После этого клеткам заменяли культуральную среду на подвижную фазу для хроматографии или белковые фракции лизата клеток линии NK-92 в нескольких разведениях. Для этого путем последовательного титрования на полной культуральной среде с добавлением 10% ЭТС готовили серию разведений подвижной фазы или белковых фракций в концентрациях: 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,20% и 0,10% (v/v). Для корректного статистического анализа каждое разведение препарата готовили в шести повторях. В качестве контроля использовали культуральную среду с добавлением 10% ЭТС. После этого клетки вновь культивировали в течение 24 ч в инкубаторе при  $37^{\circ}\text{C}$  во влажной атмосфере, 5%  $\text{CO}_2$ .

Спустя сутки из всех лунок планшета удаляли среду и окрашивали клетки 0,2%-ным раствором кристаллического фиолетового (Sigma-Aldrich Chem. Co., США), содержащим 5% метанола, для чего в каждую лунку вносили 100 мкл раствора красителя и инкубировали 10 мин. Затем, после четырехкратной отмычки лунок дистиллированной водой, планшет высушивали, а краситель экстрагировали добавлением в лунки 100 мкл 50%-ного раствора уксусной кислоты. Учет оптической плотности проводили на спектрофотометре ELx808 (BioTek Instruments Inc., США) при длине волны 540 нм (отсекающая длина волны 630 нм). О снижении жизнеспособности клеток судили по изменению оптической плотности анализируемой пробы по сравнению с контролем.

**Оценка пролиферации.** Для оценки влияния белковых фракций лизата клеток линии NK-92 на пролиферацию клеток трофобласта линии JEG-3 использовали метод, основанный на окраске белковых компонентов клеточной цитоплазмы витальным красителем кристаллическим фиолетовым (см. выше). Этот метод по чувствительности сопоставим с другими методами оценки пролиферации [13, 14]. Для этого клетки трофобласта помещали в лунки 96-луночного плоскодонного планшета с прозрачным плоским дном для адгезионных культур (Becton Dickinson, США) в концентрации  $2,5 \times 10^3$  клеток в 50 мкл полной культуральной среды, дополненной 10% ЭТС, на лунку и оставляли в течение 24 ч для прикрепления клеток к поверхности планшета.

Через сутки после начала культивирования из всех лунок планшета среду удаляли. Затем в лунки с клетками добавляли 100 мкл растворов индукторов, приготовленных на культуральной среде без добавления раствора ЭТС с конечным содержанием каждого индуктора: 0,05%; 0,025%; 0,0125%; 0,00625%; 0,00313%; 0,00156%; 0,00078%; 0,00039%. После этого в каждую лунку добавляли ЭТС в количестве, равном 2% от содержимого лунки. Крайние лунки заполняли теплым ( $37^{\circ}\text{C}$ ) раствором Hanks' Balanced Salt Solution (Sigma-Aldrich Chem. Co., США).

После инкубации в течение 72 ч культуральную среду из всех лунок удаляли и клетки окрашивали 0,2%-ным раствором кристаллического фиолетового, содержащим 5% метанола. Интенсивность клеточной пролиферации оценивали по изменению оптической плотности окрашенных экстрактов, которую измеряли с помощью спектрофотометра ELx808 (BioTek Instruments Inc., США), как описано выше. Полученные значения оптической плотности сопоставляли с количеством клеток, используя кривую титрования, и результаты выражали в количестве клеток. Об изменении клеточной пролиферации судили по изменению как оптической плотности образца, так и количества клеток по сравнению с инкубацией в культу-

ральной среде, дополненной 2% ЭТС (контроль). Питательные среды, дополненные 10% ЭТС, использовали в качестве дополнительного контроля. Одна серия экспериментов включала в себя исследование влияния всех шести индукторов в восьми разведениях в четырех повторах. Независимо друг от друга было проведено три серии экспериментов.

**Иммуноблоттинг.** Прокультивированные клетки трофобласта линии JEG-3 лизировали в буфере Radioimmunoprecipitation Assay Buffer (50 мМ Трис-НСl pH 8,1; 1% Тритон X-100; 0,1% додецилсульфата натрия; 0,5% дезоксихолата натрия; 150 мМ хлорида натрия), содержащем коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз (Sigma-Aldrich Chem. Co., США). Для осаждения клеточного дебриса пробы центрифугировали при 20000g (+4°C, 20 мин). Лизат клеток линии JEG-3 либо белковые фракции лизата клеток линии NK-92, содержащие по 50 мкг общего белка, разделяли в 10%-ном полиакриламидном геле (Bio-Rad, США) в денатурирующих условиях по методу Лэммли и переносили на PVDF-мембрану (Bio-Rad, США). Мембраны блокировали 3%-ным водным раствором бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich Chem. Co., США) в буфере TBST (50 мМ Трис-НСl; 150 мМ хлорида натрия; 0,1% (v/v) Tween 20; pH 7,5). Содержание белков в исследуемых образцах выявляли с помощью специфичных первичных антител к протенкиназе В (АКТ/ПКВ) (Akt (pan) (C67E7) Rabbit mAb), киназам, регулируемым внеклеточными сигналами (ERK1/2) (p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5) Rabbit mAb), и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (GAPDH (14C10) Rabbit mAb). Все антитела были приобретены у компании Cell Signaling Technology (США). Инкубацию проводили при +4°C в течение ночи. Далее, после инкубации с соответствующими вторичными антителами козы, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) (1/1000; Bio-Rad, США), сигналы визуализировали, используя усиленную хемилюминесценцию Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, США). Мембраны сканировали в гель-документирующей системе ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad, США), интенсивность полос определяли при помощи программного обеспечения ImageLab Software (Bio-Rad, США). Полученные данные были нормализованы по содержанию общего белка в геле [15], определяемому с применением технологии stain-free (Bio-Rad, США) согласно инструкции производителя.

**Статистический анализ.** Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программ Statistica и GraphPad Prism 8. Для проверки достоверности различий применяли непараметрический *U*-критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Различия считались значимыми при  $p < 0,05$ . Результаты на рисунках представлены в виде медианы, минимального и максимального значения.

## Результаты и обсуждение

Использованные в настоящем исследовании клетки линии NK-92 позволяют воспроизвести *in vitro* основные биохимические процессы, происходящие в клетках *in vivo*, а клетки трофобласта линии JEG-3 воспроизводят основные морфологические, фенотипические и функциональные характеристики клеток инвазивного трофобласта первого триместра беременности [16, 17].

Содержание общего белка в лизате клеток линии NK-92 составило  $60,2 \pm 6,1$  мкг/10<sup>6</sup> клеток. В результате микропрепаративного хроматографического разделения тотального лизата было получено шесть фракций.

Электрофоретическое разделение белков в полученных фракциях показало следующее распределение молекулярных масс с различной степенью обогащенности белком (данные указаны для белков с долей более 5% от общего количества белка во фракции): 36–250 кДа (фракция №1), 29–66 кДа (фракция №2), 47–62 кДа (фракция №3), 50 кДа (фракция №4), «не определено» (фракции №№5–6) (рис. 1).

Оценка минимальной токсической дозы подвижной фазы для хроматографии и белковых фракций лизата клеток линии NK-92 показала, что в неразведенном состоянии и разведении культуральной средой в соотношении 50% и 25% они токсичны в отношении клеток трофобласта линии JEG-3 (отличие от жизнеспособности интактных клеток:  $p < 0,001$ ). В разведении культуральной средой в соотношениях 12,5%, 6,25% и во всех последующих разведениях подвижная фаза и белковые фракции не оказывали токсического воздействия на клетки трофобласта (отличие от жизнеспособности интактных клеток:  $p > 0,05$ ).

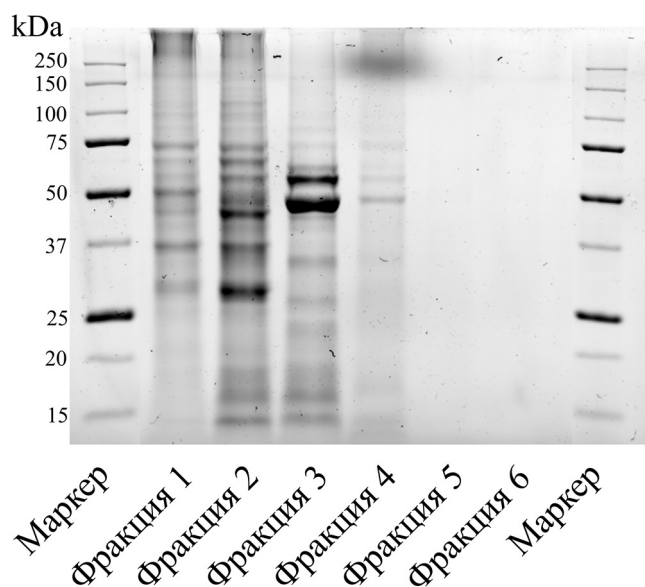


Рис. 1. Электрофореграммы белковых фракций лизата естественных киллеров линии NK-92.

В данной работе мы проанализировали влияние белковых фракций лизата НК-клеток на пролиферацию клеток трофобласта в условиях *in vitro* при использовании метода микропрепаративного хроматографического фракционирования и последующего культивирования клеток-мишеней в присутствии индукторов. В предварительном эксперименте, проведенном с целью проверки корректности получаемых данных, было показано, что пролиферация неактивированных клеток линии JEG-3, культивируемых в полной ростовой среде с добавлением 2% инактивированной

ЭТС (контроль), достоверно отличается от таковой клеток, культивируемых в отсутствие ЭТС (первый дополнительный контроль;  $p < 0,001$ ) или в присутствии 10% ЭТС (второй дополнительный контроль;  $p < 0,001$ ), что указывает на оптимально подобранные условия для последующих испытаний.

Установлено, что все исследованные фракции лизата клеток линии НК-92 в той или иной степени стимулируют пролиферацию клеток линии JEG-3 по сравнению с контролем (рис. 2): так, пролиферативная активность клеток-мишеней

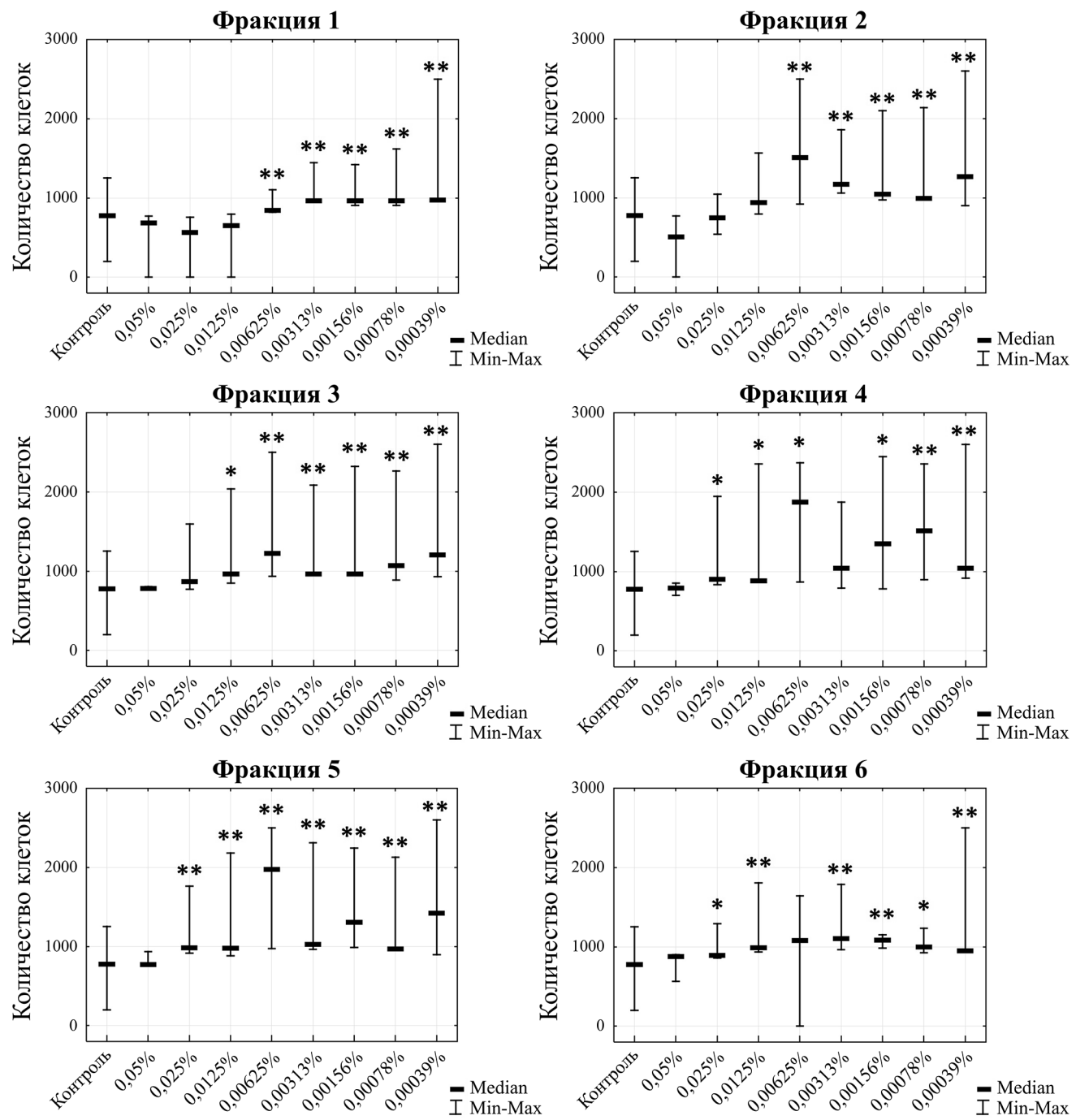


Рис. 2. Пролиферативная активность клеток трофобласта линии JEG-3 в присутствии фракций лизата естественных киллеров линии NK-92 (n = 3). Достоверность различий относительно контроля: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ .

повышалась в 1,16–2,42 раза после культивирования в присутствии индукторов с конечным содержанием их в лунке: 0,025% и менее (фракции №№4–6); 0,0125% и менее (фракция №3); 0,00625% и менее (фракции №№1–2). Наблюдаемый нами эффект может быть вызван тем, что в составе фракций, по-видимому, содержатся цитокины, усиливающие пролиферацию, такие как, например, IL-10 (IL, Interleukin) и IL-15 [18]. Полученные результаты согласуются с данными литературы о влиянии НК-клеток на ключевые процессы развития клеток трофобласта [19] и эндотелиальных клеток [20] в системах *in vitro*, причем в отношении последних наблюдались тонкие различия в эффектах, зависящих от способа передачи сигнала и от конкретной модели их изучения [21]. Ранее с помощью метода масс-спектрометрии в клетках линии НК-92 было обнаружено большое разнообразие цитокинов и рецепторов к ним – в частности, альфа-субъединица рецептора IL-15 (IL-15R $\alpha$ ) [20], что свидетельствует в пользу активного влияния НК-клеток на функциональное состояние клеток микроокружения, формирующих область взаимодействия плода и матери.

Принимая во внимание данные об эффекте влияния всех исследуемых фракций лизата клеток линии НК-92 на пролиферативную активность клеток линии JEG-3 и учитывая относительно высокое содержание общего белка в первых фракциях, мы далее изучили распределение содержания белков АКТ/ПКВ и ERK1/2 во фракциях №№1–3, обнаруженных с помощью метода иммуноблоттинга (рис. 3).

Установлено, что основная доля исследуемых белков приходится на фракцию №2 (49,0% относительно общего содержания белка во фракциях №№1–3), при этом содержание каждого из исследуемых белков в доминирующей фракции превышало таковое во фракции №1 (в 2,35–2,56 раза) и фракции №3 (в 1,54–1,63 раза).

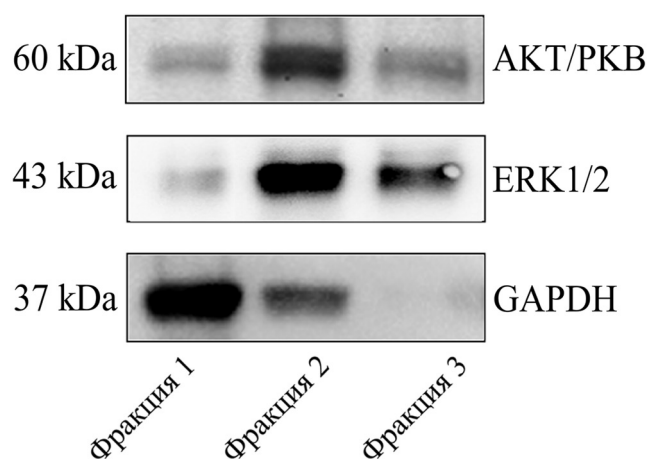


Рис. 3. Распределение содержания белков АКТ/ПКВ, ERK1/2 и GAPDH во фракциях №№1–3 лизата естественных киллеров линии НК-92.

Параллельно с этим установлено, что в первых трех фракциях лизата присутствуют маркеры пролиферации, в частности, АКТ/ПКВ и ERK1/2. При этом относительное содержание этих белков во фракции №2 было выше, чем во фракции №1 и фракции №3. Учитывая эффективность всех исследованных фракций в плане влияния на пролиферативную активность клеток трофобласта в проведенном эксперименте, можно предположить присутствие этих и/или других маркеров пролиферации и в остальных белковых фракциях. Необходимо отметить, что все без исключения исследованные фракции изначально представлены большим разнообразием белков, способных оказывать различные воздействия на клетку-мишень, порой противоположные по своему эффекту. Именно этим можно объяснить то, что первые три фракции, как наиболее обогащенные белком, проявляют свою доминирующую активность в отношении клеток трофобласта при относительно большем разведении, чем все последующие фракции.

Сигнальный путь PI3K/АКТ/mTOR (mTOR, mammalian target of rapamycin) в настоящее время признан одним из наиболее важных путей в регуляции выживания клеток. Активация этого пути дает клеткам сигнал выживания, который позволяет им противостоять апоптотическим каскадам [22]. АКТ/ПКВ оказывает прямое влияние на путь апоптоза – например, воздействуя на проапоптотический белок BAD, родственник Bcl-2. Он также влияет на транскрипционный ответ на апоптотические стимулы, например, воздействуя, на факторы FOX и активность семейства p53. Роль сигнального пути PI3K/АКТ/mTOR в выживании клеток подчеркивается для некоторых видов рака [23].

Белки-члены семейства ERK являются серин/треониновыми протеинкиназами, ответственными за передачу митогенных сигналов [24]. Множественные стимуляторы, такие как факторы роста, цитокины, вирусы, лиганды рецепторов, связанных с G-белком, и онкогены активируют сигнальный путь RAF/MEK/ERK (RAF, rapidly accelerated fibrosarcoma). ERK1/2 регулируют активность различных факторов транскрипции посредством фосфорилирования, в конечном итоге регулируя клеточные метаболизм и функцию и влияя на специфические биологические эффекты клеток. Активация сигнальных путей ERK/MAPK активирует другие внеклеточные сигнальные пути [24]. Путь RAS/RAF/ERK усиливает активацию рецепторов смерти за счет увеличения экспрессии лигандов смерти, таких как TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) или FasL, или рецепторов смерти, таких как Fas, DR4 или DR5 [25]. Активность ERK1/2 также способствует индукции FADD – адаптора каспазы-8 к рецепторам смерти [26]. Поскольку активация последней, опосредованная ERK, требует синтеза белка *de novo*, это может приводить к активации факторов транскрипции,

регулируемых ERK1/2, таких как c-Fos, что связано с активацией DR4 и DR5 [27].

Важной особенностью используемой нами экспериментальной модели является отсутствие образования иммунологического синапса, без которого активации ряда сигнальных путей в клетках трофобласта не происходит. Центральная MAP-киназа ERK локализована в цитоплазме, при этом многие из ее субстратов находятся в ядре. Для транслокации из цитоплазмы в ядро ERK использует специфический белок импортин 7 [28]. Стимуляция клеток цитокинами приводит к тому, что фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K) способствует перемещению АКТ/ПКВ из цитозоля в состав липидных рафтов плазматической мембраны и активирует ее [29]. В литературе нам не удалось найти данные о возможности рецепции ERK или АКТ/ПКВ клетками из внеклеточной области. В то же время липофильность активированного АКТ/ПКВ теоретически может способствовать слиянию этого белка с поверхностными липидными рафтами на цитоплазматической мембране клетки. Полученные данные о наличии в лизате клеток линии НК-92 активных форм ERK и в особенности липофильного АКТ/ПКВ и о влиянии белковых фракций лизата на пролиферацию клеток трофобласта линии JEG-3 позволяют предположить участие сигнальных путей PI3K/АКТ/mTOR и RAF/MEK/ERK в пролиферативных каскадах клеток-мишеней в нашей модели. Данное предположение открывает необходимость дальнейшего изучения возможности передачи сигнала с помощью ERK1/2 и АКТ/ПКВ из внеклеточного матрикса.

Таким образом, представленные в настоящем исследовании данные об изменении пролиферативной активности клеток трофобласта линии JEG-3 под влиянием фракций лизата клеток линии НК-92 могут указывать на участие компонентов их внутриклеточного содержимого (АКТ/ПКВ и ERK1/2) в обеспечении коммуникации НК-клеток с клетками трофобласта. Сопоставление полученных данных с результатами предыдущих исследований позволяет предложить конкретные белки, которые могут быть также задействованы в данных процессах: кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа типа II, сфингозин-1-фосфатлиаза 1, хемокины CXС, профилин-3,  $\alpha$ -катулин, релаксин-3 и др. Однако для уточнения иммунологических и биохимических механизмов, лежащих в основе этих процессов, необходимы дальнейшие исследования, направленные на идентификацию эффекторных белков НК-клеток, и прямые доказательства их связи с эффектами, наблюдаемыми при взаимодействии данного типа клеток с клетками микроокружения.

Изучение спектра белковых молекул лизатов НК-клеток, а также их биологической активности может способствовать пониманию потенциальных

путей реализации не только влияния этих клеток на трофобласт, но также и изменения их поведения под влиянием последнего. В дальнейшем эти механизмы реализуются с помощью как контактных, так и дистантных взаимодействий, включая секрецию цитокинов и продукцию внеклеточных везикул.

### Заключение

В литературе в основном рассматриваются цитотоксические и эффекторные свойства НК-клеток, в том числе и в отношении трофобласта. Ранее нами был установлен факт прямой цитотоксичности НК-клеток в отношении клеток трофобласта [7]. В связи с этим можно полагать, что основной функцией НК-клеток является сдерживание избыточной пролиферации и миграции трофобласта. Ранее нами также было установлено, что НК-клетки по-разному управляют ангиогенезом в совместной культуре эндотелиальных клеток и клеток трофобласта в случае их дистантного и контактного сокультивирования [9]. Тем не менее, данных о прямом влиянии НК-клеток на пролиферацию трофобласта в литературе нам найти не удалось, что объясняется их прямой цитотоксичностью в моделях *in vitro* в отношении трофобласта. Полученные в настоящем исследовании данные свидетельствуют в пользу влияния лизатов НК-клеток в отношении пролиферации трофобласта и ставят вопрос о создании экспериментальных моделей для подтверждения этих данных.

Полученные нами результаты гипотетически отражают поведение клеток хориона под влиянием НК-клеток в случае их гибели при физиологических и патологических состояниях, вызванных вирусными и бактериальными инфекциями, а также другими стрессорными факторами, приводящими к репродуктивной патологии. Проведенное исследование позволяет также оценить различия в данных по оценке влияния тех или иных биологически активных клеточных продуктов при межклеточных взаимодействиях, зависящих от способа передачи сигнала и от конкретной модели их изучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект №1021062512052-5-3.2.2). Эксперименты проведены с соблюдением этических норм и одобрены локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта (протокол заседания №114 от 14 декабря 2021 г.). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов и выражают благодарность студентке Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета) Резюкиной В.А. за помощь в проведении исследования.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Milyutina Y.P., Mikhailova V.A., Pyatygina K.M., Demidova E.S., Malygina D.A., Tertychnaia T.E., Arutjunyan A.V., Sokolov D.I., Selkov S.A. Role of caspases in the cytotoxicity of NK-92 cells in various models of coculturing with trophoblasts. *Biochemistry (Mosc.)*. 2019;84(10):1186–1196.
2. Markova K., Mikhailova V., Milyutina Y., Korenevsky A., Sirotskaya A., Rodygina V., Tyshchuk E., Grebenkina P., Simbirtsev A., Selkov S., Sokolov D. Effects of microvesicles derived from NK cells stimulated with IL-1 $\beta$  on the phenotype and functional activity of endothelial cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(24):13663.
3. Del Zotto G., Marcenaro E., Vacca P., Sivori S., Pende D., Della Chiesa M., Moretta F., Ingegnere T., Mingari M.C., Moretta A., Moretta L. Markers and function of human NK cells in normal and pathological conditions. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2017;92(2):100–114.
4. Михайлова В.А., Беякова 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. *Мед. иммунол.* 2017;19(1):19–26.
5. Тышук Е.В., Михайлова В.А., Сельков С.А., Соколов Д.И. Естественные киллеры: происхождение, фенотип, функции. *Мед. иммунол.* 2021;23(6):1207–1228.
6. Bazhenov D.O., Mikhailova V.A., Furaeva K.L., Vyaz'mina L.P., Sokolov D.I., Sel'kov S.A. The role of cytokines in maintaining the dynamics of cell-cell interaction between natural killer cells and trophoblast cells. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2022;172(5):622–631.
7. Bazhenov D., Mikhailova V., Nikolaenkov I., Markova K., Salloum Z., Kogan I., Gzgyan A., Selkov S., Sokolov D. The uteroplacental contact zone cytokine influence on NK cell cytotoxicity to trophoblasts. *Gynecol. Endocrinol.* 2020;36(Suppl. 1):1–6.
8. Mikhailova V.A., Bazhenov D.O., Viazmina L.P., Agnaeva A.O., Bepalova O.N., Sel'kov S.A., Sokolov D.I. Cytotoxic activity of peripheral blood NK cells towards trophoblast cells during pregnancy. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2019;166(4):567–573.
9. Belyakova K.L., Stepanova O.I., Sheveleva A.R., Mikhailova V.A., Sokolov D.I., Sel'kov S.A. Interaction of NK cells, trophoblast, and endothelial cells during angiogenesis. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2019;167(1):169–176.
10. Bazhenov D.O., Khokhlova E.V., Viazmina L.P., Furaeva K.N., Mikhailova V.A., Kostin N.A., Selkov S.A., Sokolov D.I. Characteristics of natural killer cell interaction with trophoblast cells during pregnancy. *Curr. Mol. Med.* 2020;20(3):202–219.
11. Sokolov D., Gorshkova A., Markova K., Milyutina Y., Pyatygina K., Zementova M., Korenevsky A., Mikhailova V., Selkov S. Natural killer cell derived microvesicles affect the function of trophoblast cells. *Membranes*. 2023;13(2):213.
12. Korenevsky A.V., Milyutina Y.P., Bochkovsky S.K., Oshkolova A.A., Bepalova O.N., Selkov S.A., Sokolov D.I. Micropreparative cell lysate fractionation in studying the effect of natural killer cells on phenotype, migration and apoptosis of trophoblast cells *in vitro*. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2024;60(4):1385–1398.
13. Амчиславский Е.И., Соколов Д.И., Сельков С.А., Фрейдлин И.С. Пролиферативная активность эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926 и ее модуляция. *Цитология*. 2005;47(5):393–403.
14. Nilles J., Weiss J., Theile D. Crystal violet staining is a reliable alternative to bicinchoninic acid assay-based normalization. *Biotechniques*. 2022;73(3):131–135.
15. Bass J.J., Wilkinson D.J., Rankin D., Phillips B.E., Szewczyk N.J., Smith K., Atherton P.J. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand. J. Med. Sci. Sports*. 2017;27(1):4–25.
16. Kohler P.O., Bridson W.E. Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1971;32(5):683–687.
17. Gong J.H., Maki G., Klingemann H.G. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia*. 1994;8(4):652–658.
18. Гребенкина П.В., Михайлова В.А., Ошколова А.А., Вершинина С.О., Духинова М.С., Баженов Д.О., Сельков С.А., Соколов Д.И. Децидуальные естественные киллеры и клетки трофобласта: клеточные, гуморальные и молекулярные механизмы взаимодействия. *Мед. иммунол.* 2022;24(6):1085–1108.
19. Hanna J., Goldman-Wohl D., Hamani Y., Avraham I., Greenfield C., Natanson-Yaron S., Prus D., Cohen-Daniel L., Arnon T.I., Manaster I., Gazit R., Yutkin V., Benharroch D., Porgador A., Keshet E., Yagel S., Mandelboim O. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat. Med.* 2006;12(9):1065–1074.
20. Korenevsky A.V., Gert T.N., Berezkina M.E., Sinyavin S.A., Mikhailova V.A., Markova K.L., Simbirtsev A.S., Selkov S.A., Sokolov D.I. Protein fractions of natural killer cell lysates affect the phenotype, proliferation and migration of endothelial cells *in vitro*. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2022;58(Suppl. 1):S134–S150.
21. Korenevsky A.V., Berezkina M.E., Gert T.N., Sinyavin S.A., Selkov S.A., Sokolov D.I. Phenotypic and functional characteristics of endothelial cells: the *in vitro* effects of protein fractions from the lysate of natural killer-derived microvesicles. *Мед. иммунол.* 2022;24(3):463–480.
22. Li Q., Li Z., Luo T., Shi H. Targeting the PI3K/AKT/mTOR and RAF/MEK/ERK pathways for cancer therapy. *Mol. Biomed.* 2022;3(1):47.
23. Iida M., Harari P.M., Wheeler D.L., Toulany M. Targeting AKT/PKB to improve treatment outcomes for solid tumors. *Mutat. Res.* 2020;819–820:111690.
24. Guo Y.J., Pan W.W., Liu S.B., Shen Z.F., Xu Y., Hu L.L. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp. Ther. Med.* 2020;19(3):1997–2007.
25. Ahmad J., Ahamad J., Algahtani M.S., Garg A., Shahzad N., Ahmad M.Z., Imam S.S. Nanotechnology-mediated delivery of resveratrol as promising strategy to improve therapeutic efficacy in triple negative breast cancer (TNBC): progress and promises. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2024;21(2):229–244.
26. Cagnol S., Van Obberghen-Schilling E., Chambard J.C. Prolonged activation of ERK1,2 induces FADD-independent caspase 8 activation and cell death. *Apoptosis*. 2006;11(3):337–346.
27. Drosopoulos K.G., Roberts M.L., Cermak L., Sasazuki T., Shirasawa S., Andera L., Pintzas A. Transfor-

mation by oncogenic RAS sensitizes human colon cells to TRAIL-induced apoptosis by up-regulating death receptor 4 and death receptor 5 through a MEK-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 2005;280(24):22856–22867.

28. Maik-Rachline G., Hacohen-Lev-Ran A., Seger R. Nuclear ERK: mechanism of translocation, substrates, and role in cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(5):1194.

29. Gao X., Zhang J. Akt signaling dynamics in plasma membrane microdomains visualized by FRET-based reporters. *Commun. Integr. Biol.* 2009;2(1):32–34.

Поступила в редакцию 24.07.2024

После доработки 24.09.2024

Принята в печать 03.10.2024

## RESEARCH ARTICLE

# Natural killer cell lysate fractions affect trophoblast cell proliferation *in vitro*

A.V. Korenevsky\* , Yu.P. Milyutina , S.K. Bochkovsky , D.I. Sokolov ,  
S.A. Selkov , O.N. Beshpalova 

*D.O. Ott Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Medicine, Mendeleyevskaya Line 3, St. Petersburg, 199034 Russia*  
\*e-mail: a.korenevsky@yandex.ru

Placenta development is largely determined by the interaction of natural killer (NK) cells and trophoblast cells. Despite intensive research, the role of NK cells and methods for correcting their functional activity in reproduction remain controversial. The aim of this study was to investigate the effect of protein fractions of NK cell lysate on trophoblast cell proliferation in a model experiment *in vitro*. Chromatographic separation resulted in obtaining six cell lysate fractions with different sets of proteins (25–250 kDa). It was found that all the studied fractions stimulated trophoblast cell proliferation. Proliferation markers such as protein kinase B (AKT/PKB) and extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) were found in the protein fractions with molecular weights of 36–250 kDa, 29–66 kDa, and 47–62 kDa. The obtained data on the change in the proliferative activity of JEG-3 cells under the influence of the NK-92 cell lysate fractions hypothetically reflect the behavior of chorionic cells surrounded by NK cells in the event of their death under normal or pathological conditions caused by viral and bacterial infections, as well as other stress factors that lead to reproductive pathology.

**Keywords:** reproduction, placenta, natural killer cells, trophoblast, proliferation, AKT/PKB, ERK1/2

**Funding:** This study was performed under the state assignment of D.O. Ott Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Medicine, project number 1021062512052-5-3.2.2.

## Сведения об авторах

Корневский Андрей Валентинович — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории биохимии репродукции и медико-экологических проблем НИИ АГиР им. Д.О. Отта. Тел.: 8-812-328-98-05; e-mail: a.korenevsky@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0365-8532>

Милутина Юлия Павловна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории биохимии репродукции и медико-экологических проблем НИИ АГиР им. Д.О. Отта. Тел.: 8-812-328-98-05; e-mail: milyutina1010@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1951-8312>

Бочковский Сергей Константинович — студент лаборатории биохимии репродукции и медико-экологических проблем НИИ АГиР им. Д.О. Отта. Тел.: 8-812-328-98-05; e-mail: serega86bochkovsky@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9555-7757>

Соколов Дмитрий Игоревич — докт. биол. наук, доц., вед. науч. сотр. лаборатории межклеточных взаимодействий отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий НИИ АГиР им. Д.О. Отта. Тел.: 8-812-328-98-05; e-mail: falcojugger@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5749-2531>

Сельков Сергей Алексеевич — докт. мед. наук, проф., руководитель отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий НИИ АГиР им. Д.О. Отта. Тел.: 8-812-328-98-05; e-mail: selkovsa@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1560-7529>

Бешпалова Олеся Николаевна — докт. мед. наук, зам. директора по научной работе НИИ АГиР им. Д.О. Отта. Тел.: 8-812-328-98-05; e-mail: shiggerra@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6542-5953>