

УДК 557.175.6

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА ЧЕЛОВЕКА НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК

© 2023 г. К. Ю. Шардина<sup>а</sup>, \*, В. П. Тимганова<sup>а</sup>, М. С. Бочкова<sup>а</sup>,  
С. В. Ужвиюк<sup>а</sup>, С. А. Заморина<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН,  
филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, 614081 Россия

\*e-mail: Shardinak@gmail.com

Поступила в редакцию 17.04.2023 г.

После доработки 24.05.2023 г.

Принята к публикации 25.05.2023 г.

Изучали влияние рекомбинантного хорионического гонадотропина человека (hCG) в концентрациях, соответствующих беременности (10 и 100 МЕ/мл) на дифференцировку и функциональную активность миелоидных супрессорных клеток (MDSC). Объектом исследования были изолированные CD11b<sup>+</sup>-клетки, которые индуцировали в фенотип MDSC при помощи двухэтапного активирования цитокинами GM-CSF, IL1 $\beta$  и липополисахаридом (LPS). После недельного культивирования оценивали общий уровень MDSC с учетом субпопуляций M-MDSC и PMN-MDSC, экспрессию аргиназы-1 (Arg1) и индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) в этих клетках, а также цитокиновый профиль в супернатантах культур клеток. Показано, что hCG повышал уровень общего количества MDSC, а его более низкая концентрация (10 МЕ/мл) способствовала дифференцировке субпопуляции M-MDSC. Установлено, что hCG не оказывал влияния на экспрессию IDO в MDSC, однако наблюдалась тенденция к повышению экспрессии IDO под воздействием hCG в концентрации 10 МЕ/мл. Показано, что CD11b<sup>+</sup>-клетки, индуцированные в фенотип MDSC, экспрессируют низкое количество Arg1, что не позволило оценить эффект гормона на экспрессию этого фермента. При оценке цитокинового профиля методом мультиплексного анализа установлено, что hCG не модулировал продукцию цитокинов в культуре CD11b<sup>+</sup>-клеток, индуцированных в фенотип MDSC. Таким образом, впервые продемонстрировано, что hCG способен индуцировать дифференцировку MDSC.

**Ключевые слова:** миелоидные супрессорные клетки (MDSC), культивирование *in vitro*, хорионический гонадотропин человека (hCG), CD11b<sup>+</sup>-клетки, IDO, Arg1, цитокины

**DOI:** 10.31857/S0233475523050092, **EDN:** THVNKD

### ВВЕДЕНИЕ

Миелоидные супрессорные клетки (myeloid-derived suppressor cells, MDSC) – клетки миелоидного происхождения, которые обладают иммуносупрессорным потенциалом с помощью широкого спектра механизмов. Одним из самых важных механизмов является нарушение метаболизма аргинина и триптофана. Для этого MDSC используют аргиназу-1 (Arg1), индуцибельную NO-синтазу (iNOS, NOS2) и индоламин-2,3-диоксигеназу (IDO). Суть механизма сводится к тому, что ферменты создают условия недостаточности питательной среды, что в итоге приводит к подавлению активности Т-лимфоцитов и образованию супрессорной среды в месте иммунного ответа [1, 2]. Известно, что у здоровых людей уровень MDSC в периферической крови не превышает 1% [3], однако при патологических состояниях, таких

как онкологические заболевания, аутоиммунные расстройства, воспаления и инфекции, их уровень повышается. Недавно стало известно, что количество MDSC может увеличиваться также и при физиологическом состоянии – при беременности.

У MDSC принято выделять две субпопуляции: полиморфноядерные или гранулоцитарные (PMN-MDSC, G-MDSC, CD33<sup>low</sup>CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup>/CD66b<sup>+</sup>-клетки) и моноцитарные (M-MDSC, CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-/low</sup>CD15<sup>-</sup>/CD66b<sup>-</sup>-клетки).

В настоящее время очевидно, что MDSC играют двойственную роль в организме, например, при онкологических заболеваниях они способны поддерживать рост опухоли, способствуя метастазированию, а при беременности проявлять положительные эффекты, подавляя иммунный

ответ на антигены плода и, таким образом, формируя иммунную толерантность [4]. Например, известно, что MDSC способны индуцировать развитие Т-хелперов 2 типа и Т-регуляторных клеток (Treg), реализуя свои основные механизмы подавления через Arg1, IDO, iNOS и активные формы кислорода и азота [5]. Существует прямая связь с ранним выкидышем и снижением уровня MDSC в периферической крови матери, эндометрии и плаценте [6].

Иммунная толерантность при беременности — это сложный процесс, в котором принимают участие разные структуры и органы, включая белково-пептидный континуум [7]. Во время беременности синтезируется множество уникальных белков, направленных на поддержание развития плода. Помимо прямых физиологических функций некоторые белки способны проявлять иммунорегуляторные эффекты. Одним из таких белков является хорионический гонадотропин человека (human chorionic gonadotropin, hCG).

Хорионический гонадотропин — гликопротеин, синтез которого достигает максимума на 9–11 неделе беременности, а затем снижается и держится на одном уровне вплоть до родов. hCG участвует в основных репродуктивных процессах, таких как поддержание желтого тела, образование синцитиотрофобласта, формирование пуповины, рост органов плода [8]. В отношении роли hCG в поддержании иммунной толерантности известно, что исследуемый гормон способен: 1) угнетать пролиферацию и индуцировать апоптоз нейтрофилов, чрезмерная активность которых коррелирует с неблагоприятными исходами беременности [9, 10]; 2) частично поддерживать важное для беременности переключение макрофагов во второй иммуносупрессивный тип [11, 12]; 3) через взаимодействие с маннозным рецептором увеличивает концентрацию маточных НК-клеток, необходимых для имплантации эмбриона [13]; 4) повышать уровень фермента IDO как *in vitro*, так и *in vivo* [14]; 5) стимулировать дифференцировку Treg [15].

Получение MDSC в системе *in vitro* является отдельной проблемой, поскольку их содержание в крови здоровых доноров крайне мало. Для того чтобы получить такую редкую популяцию, важно определить маркер, с помощью которого можно изолировать определенную часть клеток для дальнейшей дифференцировки. Поскольку фенотип MDSC — CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-/low</sup>CD11b<sup>+</sup>, подходящими маркерами могут выступать только две молекулы — CD33 или CD11b. В наших ранних исследованиях было показано, что один из фетоплацентарных белков, альфа-фетопроtein (AFP) не влияет на конверсию CD33<sup>+</sup>-клеток в фенотип MDSC [16], поэтому возникла необходимость поиска другой экспериментальной модели.

Целью данной работы было изучение роли hCG в регуляции дифференцировки и функциональной активности MDSC, генерированных из CD11b<sup>+</sup>-клеток. Для выполнения исследования были поставлены следующие задачи: 1) изучить роль hCG в регуляции общего уровня MDSC, а также M-MDSC и PMN-MDSC в культуре; 2) измерить внутриклеточную экспрессию ферментов Arg1 и IDO в MDSC для понимания функционального состояния популяции; 3) оценить цитокиновый профиль клеточных культур CD11b<sup>+</sup>-клеток, индуцированных в фенотип MDSC.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

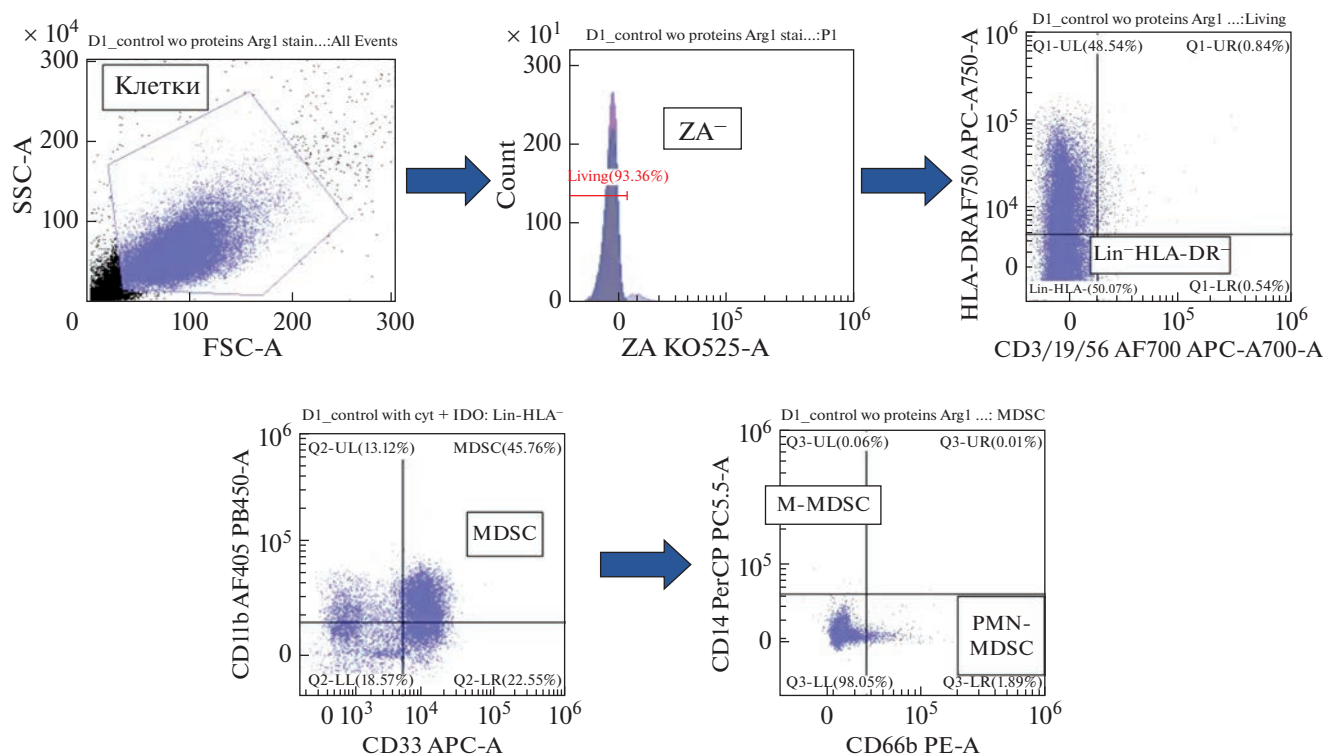
Исследование было проведено согласно Хельсинской декларации ВМА 2000 г. и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. Получено разрешение этического комитета ИЭГМ УрО РАН (IRB00010009) от 18.08.2020.

**Объекты исследования.** В работе были использованы мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) условно здоровых доноров ( $n = 7$ , небеременные женщины, 20–40 лет). РВМС получали центрифугированием на градиенте плотности фикола ( $\rho = 1.077$  г/см<sup>3</sup>, Diacoll, ДиаМ, Россия). Из РВМС крови доноров методом иммуномагнитной сепарации выделяли CD11b<sup>+</sup>-клетки, используя магнитные сферы MacsBeads с антителами к молекуле CD11b и разделительную колонку MS (MiltenyiBiotec, Германия).

В экспериментах были использованы физиологические концентрации рекомбинантного hCG (Овитрель, Израиль), которые соответствуют уровням белка в периферической крови матери в период беременности: 10 и 100 МЕ/мл. Концентрация hCG на 10–12 неделе беременности достигает максимума и составляет в среднем 100 МЕ/мл, после чего снижается до 10 МЕ/мл и держится на низком уровне до окончания беременности [17].

**Схема культивирования MDSC.** В нашем исследовании мы использовали модель индукции MDSC, основанную на двухэтапном добавлении сигнальных молекул в культуру [1]. Смысл этой схемы состоит в том, что на первом этапе происходит “лицензирование”, которое направляет клетки на путь миелоидного развития. Для этого мы использовали фактор миелоидного роста клеток — GM-CSF. Второй этап — клеточная активация, при которой происходит иницирование сигнальных путей, благодаря которым клетки реализуют супрессорные функции.

Выделенные CD11b<sup>+</sup>-клетки засеивали в плоскостонный 96-луночный планшет (Corning, США) в концентрации  $1 \times 10^6$  кл/мл с добавлением полной питательной среды (RPMI-1640, 10% эмбри-



**Рис. 1.** Тактика гейтирования MDSC по поверхностным маркерам, используемая для идентификации клеток. Субпопуляции MDSC классифицируются как  $\text{Lin}^- \text{HLA-DR}^- \text{CD33}^+ \text{CD11b}^+ \text{CD66b}^+ \text{CD14}^-$  для PMN-MDSC и  $\text{Lin}^- \text{HLA-DR}^- \text{CD33}^+ \text{CD11b}^+ \text{CD66b}^- \text{CD14}^+$  для M-MDSC.

ональная бычья сыворотка (FBS), 10 мМ HEPES (ICN Ph, США), 2 мМ *L*-глутамин (ICN Ph.) и 100 мкг/мл пенициллина–стрептомицина–амфотерицина (100 мкл на 10 мл среды, ВІ, Израиль)). В первый день культивирования в лунки вносили GM-CSF (Miltenyi Biotec) в концентрации 20 нг/мл, после чего клетки культивировали в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе в течение 2 сут.

На 3-и сут производили активацию клеток с использованием провоспалительного цитокина  $\text{IL1-}\beta$  в концентрации 20 нг/мл (Miltenyi Biotec) и LPS в концентрации 0.1 мкг/мл (Sigma Aldrich, США). Помимо этого, производили смену питательной среды, а после добавления молекул активации, клетки культивировали еще 3 сут.

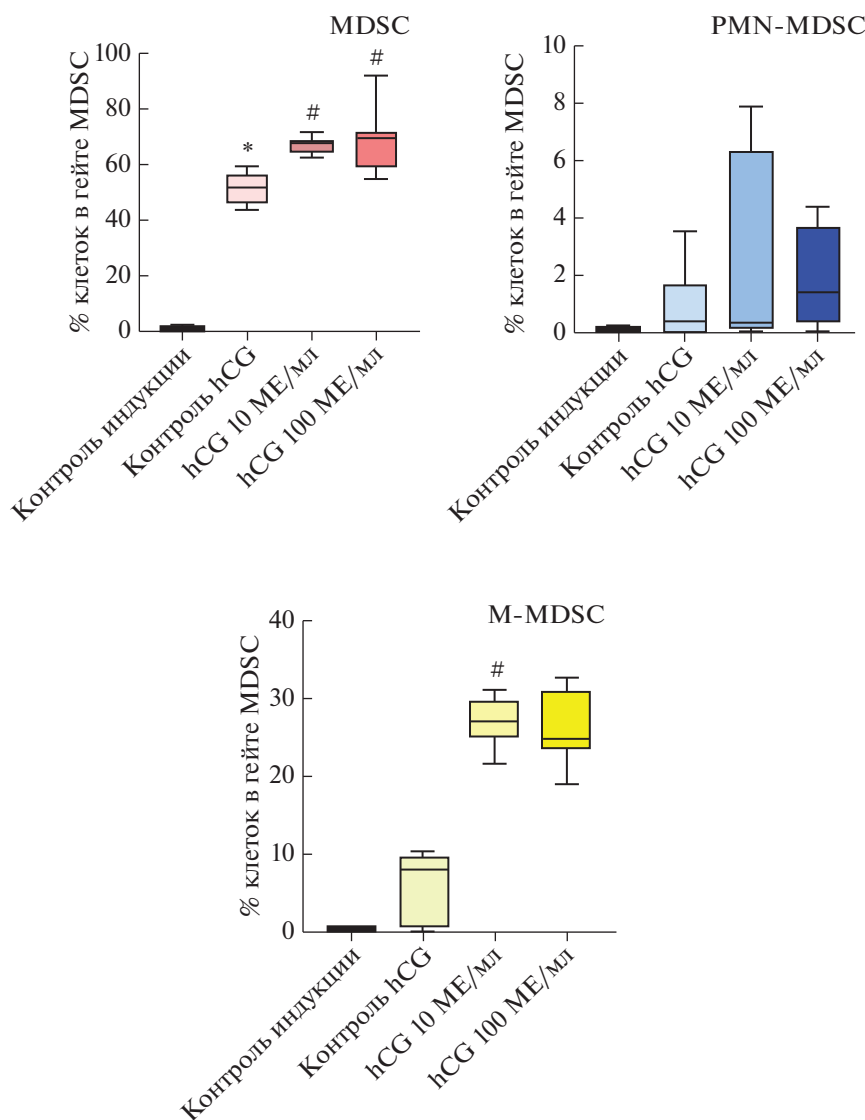
**Проточная цитометрия.** После недели культивирования клетки окрашивали мечеными флуорохромами антителами: anti-HLA-DR-AlexaFluor750, anti-CD33-APC, anti-CD11b-AlexaFluor405, anti-CD66b-PE, anti-CD14-PerCP (R&D Systems, США). Также для того чтобы исключить возможное присутствие лимфоцитов и НК-клеток, использовали три красителя: anti-CD19-AF700, anti-CD56-AF700, anti-CD3-AF700 (Lin). В качестве контролей, определяющих негативные популяции, использовали FMO (fluorescence minus one) пробы. Регистрация результатов была произведе-

на на проточном цитофлуориметре Cytoflex S (Beckman Coulter, США).

По данным бокового (SSC, side scatter) и прямого светорассеяния (FSC, forward scatter) осуществляли гейтирование. После этого определяли живые клетки с использованием красителя Zombie Aqua (Biolegend, США), выделяя в этом регионе клетки, не несущие линейные маркеры (Lin) и HLA-DR. Затем эту популяцию отображали на двухпараметрическом графике CD33 и CD11b ( $\text{Lin}^- \text{HLA-DR}^- \text{CD33}^+ \text{CD11b}^+$  или MDSC). Для определения субпопуляций MDSC дополнительно оценивали наличие маркеров CD66b и CD14. Ниже приведена тактика гейтирования клеток на примере одного эксперимента (рис. 1).

**Оценка экспрессии Arg1 и IDO в MDSC.** Был проведен анализ внутриклеточной экспрессии ферментов Arg1 и IDO путем пермеабилзации клеток с помощью моноклональных антител к IDO (R&D Systems) и Arg1 (R&D Systems). Измерения проводили также методом проточной цитофлуориметрии.

**Анализ цитокинового профиля в культурах  $\text{CD11b}^+$ -клеток.** Определение цитокинов производили, используя супернатанты культур с помощью коммерческого набора Bio-Plex Pro Human Inflammation panel 1 37-plex (BioRad Laboratories,



**Рис. 2.** Влияние hCG на дифференцировку MDSC и их субпопуляций (PMN-MDSC и M-MDSC) ( $n = 7$ , Me (Q1–Q3)). # – статистически значимые ( $p < 0.05$ ) различия по сравнению с контролем индукции, \* – статистически значимые ( $p < 0.05$ ) различия по сравнению с контролем hCG с использованием непараметрического критерия Фридмана.

США) методом Luminex xMAP. Результаты регистрировали, используя систему мультиплексного анализа Bio-Plex MAGPIX (BioRad Laboratories). Обработка данных была осуществлена в программе Belysa. Для построения стандартных кривых использовали пятипараметрический логистический (5PL) метод анализа. Результаты представлены в пг/мл.

**Статистическая обработка данных.** Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 8. Для сравнения зависимых выборок был использован непараметрический аналог дисперсионного анализа повторных измерений – критерий Фридмана. Статистические различия считались значимыми при  $p < 0.05$ . Часть

данных представлена в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей (Me (Q1–Q3)).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Влияние hCG на дифференцировку MDSC, PMN-MDSC и M-MDSC.** По истечении 7 сут культивирования клеток их жизнеспособность составила 98.13 (94.09–98.84)%. В наших экспериментах выбранные цитокины способны направлять индукцию CD11b<sup>+</sup>-клеток в MDSC, что свидетельствует об адекватности выбранной модели (рис. 2).

Показано, что hCG в обеих концентрациях повышал общий уровень MDSC в культуре (рис. 2).

**Таблица 1.** Влияние hCG на внутриклеточную экспрессию Arg1 и IDO в MDSC в культуре CD11b<sup>+</sup>-клеток после 7 сут инкубации (*n* = 7, Me (Q1–Q3))

	Arg1, %	IDO, %
Контроль индукции	0.150 (0.025–0.447)	0.49 (0.245–0.736)
Контроль hCG	0.920 (0.212–1.538)	7.84 (6.74–9.177)
hCG 10 МЕ/мл	1.335 (0.39–1.978)	15.11 (14.297–15.65)
hCG 100 МЕ/мл	0.145 (0.082–0.312)	7.72 (6.207–9.797)

*Примечание:* результаты выражены в процентах от общей популяции MDSC в культуре; для статистического анализа был использован непараметрический критерий Фридмана, в результате достоверных различий ( $p < 0.05$ ) не обнаружено.

Что касается субпопуляций, то установлено, что hCG (10 МЕ/мл) способен достоверно увеличивать уровень M-MDSC, но не PMN-MDSC. Скорее всего, это связано с тем, что наша модель получения MDSC не способствуют образованию субпопуляции PMN-MDSC. Известно, что при беременности расширение пула MDSC происходит за счет PMN-MDSC, однако M-MDSC также играют важную регуляторную роль [2]. На сегодняшний день нет исследований во взаимодействии фетоплацентарных гормонов с MDSC, тем не менее известно влияние гормонов на дифференцировку MDSC. Так, эстрадиол в зависимости от его концентрации может играть дихотомическую роль на MDSC [18]. Также известно, что уровень M-MDSC положительно коррелирует с уровнями прогестерона и эстрогена в сыворотке беременных женщин, а введение 17 $\beta$ -эстрадиола, но не прогестерона, усиливал как экспансию, так и супрессивную активность M-MDSC через преобразователь сигнала и активатор транскрипции (STAT-3) [19].

**Влияние hCG на экспрессию ферментов Arg1 и IDO.** Для определения MDSC важно помнить, что эта клеточная популяция не имеет уникального маркера, поэтому для идентификации MDSC необходимо учитывать их функциональные характеристики. Один из иммуносупрессивных механизмов MDSC – синтез ферментов, таких как Arg1, IDO. Их действие основано на истощении питательных веществ – аргинина и триптофана в месте иммунного ответа, что приводит к подавлению пролиферации и активности Т-клеток [20, 21]. В настоящем исследовании был оценен уровень IDO и Arg1.

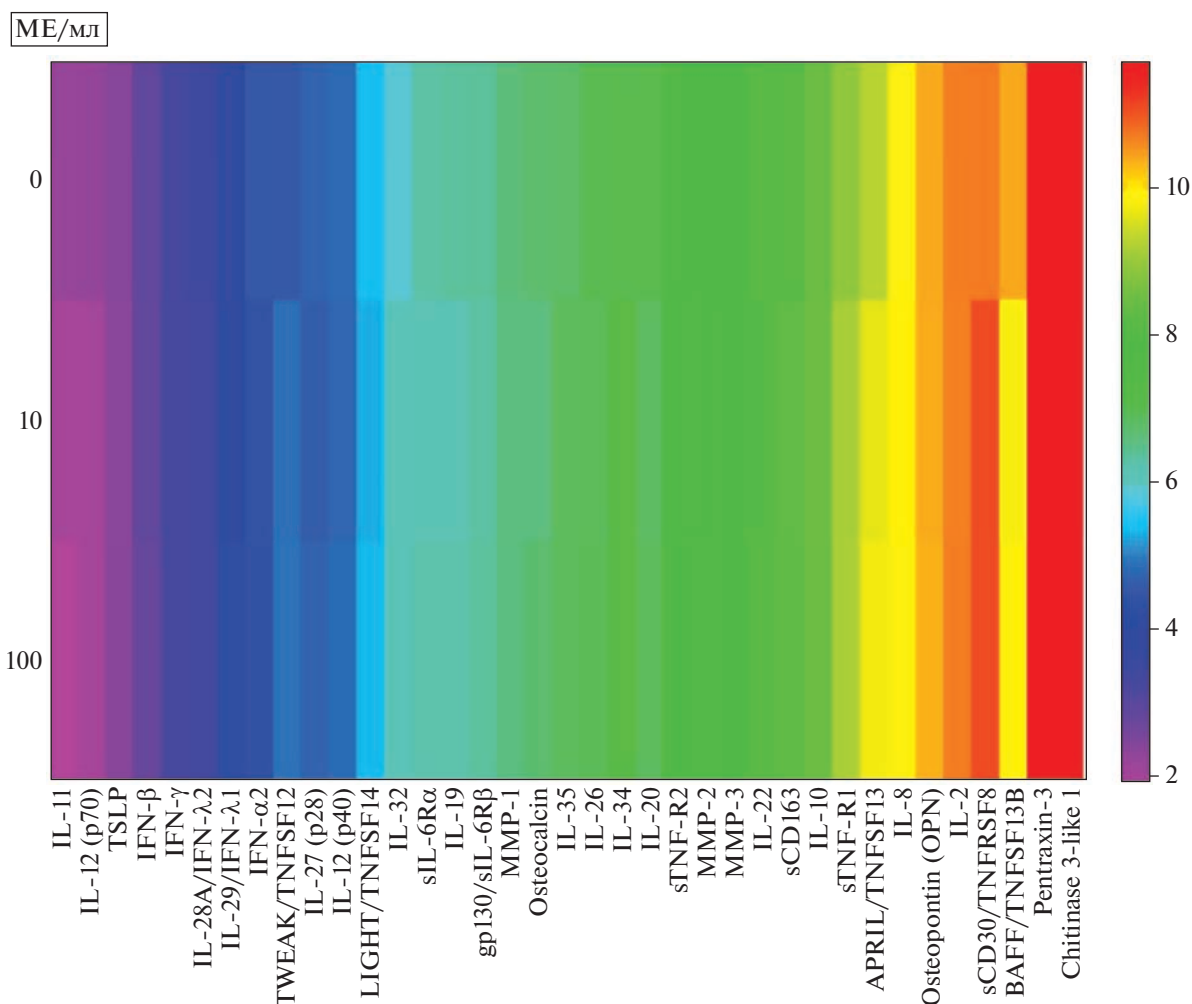
В результате проведенного исследования показано, что hCG не влиял на экспрессию Arg1 (табл. 1). Однако чрезвычайно низкий уровень экспрессии этого фермента свидетельствует не об отсутствии эффекта гормона, а о том, что в наших

экспериментальных условиях Arg1 не индуцируется. Возможно, это связано с тем, что индукция Arg1 происходит в противовоспалительном микроокружении, а также в присутствии антигенной стимуляции [22, 23]. Также известно, что цитокины, продуцируемые Т-клетками 2 типа (IL-4, IL-13) способны индуцировать Arg1 в макрофаги 2 типа и в MDSC [24]. Еще одним объяснением может быть тот факт, что ингибирование, опосредованное MDSC, требует прямого контакта с клеткой, а Arg не экспрессируется в MDSC конститутивно. Цитокин-индуцированная экспрессия аргиназы-1 может сводиться к 2 стратегиям: 1) IL-6 + IL-4 – IL-6 индуцирует экспрессию IL-4-рецептора (IL-4R) на поверхности клеток, и через этот рецептор и запускается продукция аргиназы-1; 2) GM-CSF + IL-10, где GM-CSF аналогично индуцирует IL-10 [25]. В нашей же экспериментальной модели был использован другой набор цитокинов для индукции. Тем не менее на сегодняшний день механизм экспрессии аргиназы в MDSC остается не до конца выясненным.

В отношении экспрессии IDO достоверных эффектов hCG также не было обнаружено. Однако присутствует видимая тенденция к увеличению уровня экспрессии этого фермента почти в два раза под воздействием hCG в концентрации 10 МЕ/мл (табл. 1).

Таким образом, показано, что hCG не оказывает влияния на экспрессию IDO в MDSC, однако наблюдается тенденция к повышению уровня IDO под воздействием hCG в концентрации 10 МЕ/мл. Представленная экспериментальная система не позволяет в полной мере оценить влияние гормона на экспрессию Arg1.

**Влияние hCG на цитокиновый профиль в супернатантах культур CD11b<sup>+</sup>-клеток.** Иммунные реакции организма опосредованы сигнальными молекулами – цитокинами. Цитокины, обладая различными эффектами, как провоспалительны-



**Рис. 3.** Тепловая карта эффектов hCG на цитокиновый профиль супернатантов культур. В построении тепловой карты использованы натуральные логарифмы концентраций цитокинов.

ми, так и противовоспалительными, обеспечивают связи различные системы органов между собой.

В нашем исследовании был использован метод мультиплексного анализа цитокинов. В результате проведенного исследования установлено, что достоверного влияния hCG на следующие цитокины и биологически активные молекулы обнаружено не было: IL-27 (p28), IL-2, IL-8, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-20, IL-26, IL-27 (p28), IL-28A/IFN $\lambda$ 2, IL-32, IL-34, LIGHT/TNFSF14, TSLP, TWEAK/TNFSF12, IL-22, IL-10, IL-11, IL-19, IL-35, Pentraxin3, Chitinase3-like, APRIL/TNFSF13, BAFF/TNFSF13B, sTNFR-1, sTNFR-2, sCD30/TNFRSF8, MMP-1, MMP-2, MMP-3, sCD163, gp130/sIL-6R $\beta$ , sIL-6R $\alpha$ , osteocalcin, osteopontin, IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  (рис. 3).

Таким образом, установлено, что hCG не оказывает влияния на экспрессию изучаемых цитокинов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для протекания успешной беременности необходимо скоординировано поддерживать иммунную толерантность. Иммунная толерантность заключается в отсутствии материнского организма формировать иммунный ответ на развивающийся плод и плаценту. Поскольку этот тонкий процесс должен иметь баланс между защитой организма матери и плода от инфекций и толерантностью к антигенам эмбриона, то его регуляция происходит на всех уровнях организации. В первую очередь формируется преобладание Treg и Th2-клеток над Th17 и Th1-клетками [26]. На сегодняшний день стало очевидно, что врожденная система также принимает участие в формировании иммунной толерантности. Так, в 2011 году установлено, что MDSC являются клетками, принимающими важное участие в этом процессе [27].

В результате проведенных экспериментов установлено, что ключевой белковый гормон бере-

менности hCG достоверно повышает уровень MDSC, включая субпопуляцию M-MDSC. Однако стоит отметить, что низкая концентрация hCG (10 МЕ/мл) оказывала более выраженное воздействие на дифференцировку M-MDSC. Пик экспрессии hCG соответствует границе первого и второго триместров беременности (11–12 неделя) и совпадает с пиком экспрессии стадиспецифичных антигенов плода, связанной с основной закладкой новых тканей. Именно этот период считается наиболее уязвимым для атаки иммунной системой материнского организма. Первый триместр беременности является провоспалительным, а задача иммунной системы матери на этом этапе – содействие имплантации эмбриона. Низкая концентрация hCG соответствует началу беременности, когда иммунная толерантность особенно важна, поскольку от нее напрямую зависит сохранение плода. В начале беременности эмбрион экспрессирует аллоантигены, а затем и стадиспецифичные антигены, которые являются чужеродными для материнского организма [28].

Продемонстрировано, что hCG не влияет на экспрессию Arg1 и IDO в MDSC, тем не менее наблюдается общая тенденция также низкой концентрации hCG (10 МЕ/мл) на увеличение уровня фермента IDO в клетках. Помимо этого, hCG не влиял на продукцию цитокинов иммунными клетками, возможно, это связано с тем, что hCG проявляет иммуномодулирующие свойства на другом уровне. Так, известно, что hCG повышает уровень регуляторной популяции – Treg [15].

В целом полученные нами эффекты касаются только субпопуляции M-MDSC, которая, вероятно, является мишенью для hCG.

Ранее мы исследовали влияние других фетоплацентарных белков – альфа-фетопротейна (AFP), гликоделина (Gd) и трофобластического  $\beta$ 1-гликопротеина (PSG) в той же экспериментальной модели. Нами было показано, что PSG стимулировал конверсию CD11b<sup>+</sup>-клеток в M-MDSC, не влияя на общее количество MDSC [29]. Интересно, что AFP и Gd, в отличие от hCG, также не увеличивали общую популяцию MDSC, однако все белки оказывали влияние на субпопуляцию M-MDSC. Показано, что все изучаемые фетоплацентарные белки не влияли на дифференцировку PMN-MDSC и Arg1, что указывает на особенность разработанной модели конверсии MDSC из CD11b<sup>+</sup>-клеток. Что касается продукции цитокинов, то в отличие от hCG белки AFP и Gd имели влияние на продукцию цитокинов миелоидными супрессорными клетками, при этом гликоделин подавлял выработку провоспалительных цитокинов IFN- $\alpha$ 2, IL-26, IL-19, TWEAK (данные не опубликованы), а AFP – регуляторного IL-19 [30, 31].

Таким образом, фетоплацентарные белки способны регулировать дифференцировку MDSC, преимущественно индуцируя развитие M-MDSC, а также ряд функциональных параметров (IDO, Arg1, цитокины), что дает нам основание предполагать, что это новый аспект формирования иммунной толерантности в период беременности. Известно, что именно перечисленные параметры (IDO, Arg1, цитокины) играют чрезвычайно важную роль в реализации иммунорегуляторных эффектов MDSC во время беременности [32].

В целом мы показали способность hCG действовать как иммунорегуляторная молекула, поскольку показано его влияние на дифференцировку MDSC, реализуя свои эффекты на уровне M-MDSC.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

**Источники финансирования.** Работа выполнена при поддержке гранта Российского Фонда Фундаментальных Исследований № 19-415-590001 и в рамках НИОКТР АААА-А19-119112290007-7.

**Соответствие принципам этики.** Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lutz M.B., Eckert I.N. 2021. Comments on the ambiguity of selected surface markers, signaling pathways and omics profiles hampering the identification of myeloid-derived suppressor cells. *Cell. Immunol.* **364**, 104347. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2021.104347>
2. Köstlin N., Kugel H., Spring B., Leiber A., Marmé A., Henes M., Rieber N., Hartl D., Poets C.F., C. Gille. 2014. Granulocytic myeloid derived suppressor cells expand in human pregnancy and modulate T-cell responses: Cellular immune response. *Eur. J. Immunol.* **44** (9), 2582–2591. <https://doi.org/10.1002/eji.201344200>
3. Пономарев А.В. 2016. Миелоидные супрессорные клетки: общая характеристика. *Иммунология.* **37** (1), 47–50. <https://doi.org/10.18821/0206-4952-2016-37-1-47-50>
4. Ostrand-Rosenberg S. 2018. Myeloid derived-suppressor cells: Their role in cancer and obesity. *Curr. Opin. Immunol.* **51**, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.03.007>
5. Kumar V. Patel S., Tcyganov E., Gabrilovich D. 2016. The Nature of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *Trend. Immunol.* **37**, 208–220. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.01.004>
6. Nair R.R., Sinha P., Khanna A., Singh K. 2015. Reduced myeloid-derived suppressor cells in the blood and endometrium is associated with early miscarriage. *Am. J. Reprod. Immunol.* **73** (6), 479–486. <https://doi.org/10.1111/aji.1235>
7. Харченко Е.П. 2011. Толерантность матери и плода как проявление регуляторного континуума и пластичности их иммунных систем. *Мед. иммунология.* **13** (2–3), 121–132. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2011-2-3-121-132>

8. Paulesu L., Rao C.V., Ietta F., Pietropolli A., Ticconi C. 2018. hCG and Its disruption by environmental contaminants during human pregnancy. *Int. J. Mol. Sci.* **19** (3), 914. <https://doi.org/10.3390/ijms19030914>
9. Giaglis S., Stoikou M., Grimolizzi F., Subramanian B.Y., Shane V.B., Hoesli I., Lapaire O., Hasler P., Than N.G., Hahn S. Neutrophil migration into the placenta: Good, bad or deadly? *Cell Adh. Migr.* **10** (1–2), 208–225. <https://doi.org/10.1080/19336918.2016.1148866>
10. Hahn S., Giaglis S., Hoesli I., Hasler P. 2012. Neutrophil NETs in reproduction: From infertility to pre-eclampsia and the possibility of fetal loss. *Front. Immunol.* **3**, 362. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00362>
11. Rami D., La Bianca C., Zauli G., Radillo O., Bulla R. 2014. The First trimester gravid serum regulates procalcitonin expression in human macrophages skewing their phenotype in vitro. *Mediators Inflamm.* **2014**, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/248963>
12. Furcron A., Romero R., Mial T. N. [et al.]. 2016. Human chorionic gonadotropin has anti-inflammatory effects at the maternal-fetal interface and prevents endotoxin-induced preterm birth, but causes dystocia and fetal compromise in mice. *Biol. Reprod.* **94** (6), 1–13. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.139345>
13. Gaynor L.M., Colucci F. 2017. Uterine natural killer cells: Functional distinctions and influence on pregnancy in humans and mice. *Front. Immunol.* **8**, 467. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00467>
14. Tsampalas M., Gridelet V., Berndt S., Foidart J.-M., Geenen V., Hauterive S.P. 2010. Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties. *J. Reprod. Immunol.* **85** (1), 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.11.008>
15. Zamorina S.A., Shirshv S.V. 2013. Human chorionic gonadotropin is a factor in the induction of immune tolerance in pregnancy. *Immunologia.* **34** (2), 105–107.
16. Заморина С.А., Шардина К.Ю., Тимганова В.П., Бочкова М.С., Ужвиюк С.В., Раев М.Б., Черешнев В.А. 2021. Влияние альфа-фетопротеина на дифференцировку миелоидных супрессорных клеток. *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни.* **501** (1), 569–572. <https://doi.org/10.31857/S2686738921060184>
17. Cole L.A. 2012. hCG, the wonder of today's science. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **10** (1), 24. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-24>
18. Hu C., Zhen Y., Pang B., Lin X., Yi H. 2019. Myeloid-derived suppressor cells are regulated by estradiol and are a predictive marker for IVF outcome. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* **10**, 521. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00521>
19. Pan T., Zhong L., Wu S., Cao Y., Yang Q., Cai Z., Cai X., Zhao W., Ma N., Zhang W. 2016. 17 $\beta$ -Oestradiol enhances the expansion and activation of myeloid-derived suppressor cells via signal transducer and activator of transcription (STAT)-3 signalling in human pregnancy. *Clin. Exp. Immunol.* **185** (1), 86–97.
20. Fallarino F., Grohmann U., Bianchi V.C.R., Orabona C., Spreca A., Fioretti M.C., Puccetti P. 2002. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ.* **9** (10), 1069–1077. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401073>
21. Fletcher M., Ramirez M., Sierra R.A., Raber P., Thevenot P., Khani A.A., Sanchez-Pino D., Hernandez C., Wyczechowska D.D., Ochoa A.C., Rodriguez P.C. 2015. l-Arginine depletion blunts antitumor T-cell responses by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* **75** (2), 275–283. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1491>
22. Bansal V., Ochoa J.B. 2003. Arginine availability, arginase, and the immune response. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **6**, 223–228. <https://doi.org/10.1097/00075197-200303000-00012>
23. Cook P.C., Jones L.H., Jenkins S.J., Wynn T.A., Allen J.E., MacDonald A.S. 2012. Alternatively activated dendritic cells regulate CD4<sup>+</sup> T-cell polarization in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109**, 9977–9982. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121231109>
24. Bronte V., Cingarlini S., Apolloni E., Serafini P., Mari-go I., De Santo C., Macino B., Marin O., Zanovello P. 2003. Effective genetic vaccination with a widely shared endogenous retroviral tumor antigen requires CD40 stimulation during tumor rejection phase. *J. Immunol.* **171**, 6396–6405.
25. Bian Z., Abdelaal A.M., Shi L., Liang H., Xiong L., Kidder K., Venkataramani M., Culpepper C., Zen K., Liu Y. 2018. Arginase-1 is neither constitutively expressed in nor required for myeloid-derived suppressor cell-mediated inhibition of T-cell proliferation. *Eur. J. Immunol.* **48** (6), 1046–1058. <https://doi.org/10.1002/eji.201747355>
26. Saito S., Nakashima A., Shima T., Mika I. 2010. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* **63** (6), 601–610. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00852>
27. Mauti L.A., Le Bitoux M., Baumer K. 2011. Myeloid-derived suppressor cells are implicated in regulating permissiveness for tumor metastasis during mouse gestation. *J. Clin. Invest.* **121** (7), 2794–2807. <https://doi.org/10.1172/JCI41936>
28. Underwood J.L., Ruzkiewicz M., Barnden K.L. 1985. Does antigenic modulation cause the absence of major histocompatibility complex antigens on the syncytiotrophoblast? *Transplant. Proc.* **17**, 921–924.
29. Тимганова В.П., Шардина, К.Ю., Бочкова М.С., Ужвиюк С.В., Усанина Д.И., Заморина С.А. 2023. Влияние трофобластического  $\beta$ 1-гликопротеина на дифференцировку миелоидных супрессорных клеток. *Мед. иммунология.* **25** (3), 1179–1186. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-EOP-2838>
30. Заморина С.А., Тимганова В.П., Бочкова М.С., Шардина К.Ю., Ужвиюк С.В., Храмцов П.В., Кропанева М.Д., Раев М.Б. 2021. Роль гликоделина в регуляции дифференцировки миелоидных супрессорных клеток. *Мед. иммунология.* **23** (4), 641–646. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-ROG-2209>
31. Шардина К.Ю., Заморина С.А., Тимганова В.П., Бочкова М.С., Ужвиюк С.В., Черешнев В.А. 2023. Альфа-фетопротеин как фактор дифференцировки и функциональной активности миелоидных супрессорных клеток. *Клеточные технологии в биологии и медицине.* (В печати).
32. Шардина К.Ю., Заморина С.А., Раев М.Б., Черешнев В.А. 2022. Роль миелоидных супрессорных клеток в процессах формирования иммунной толерантности в период беременности. *Цитология.* **64** (2), 116. <https://doi.org/10.31857/S0041377122020067>



## Effects of Human Chorionic Gonadotropin on Differentiation and Functional Activity of Myeloid-Derived Suppressor Cells

K. Yu. Shardina<sup>1</sup>, \*, V. P. Timganova<sup>1</sup>, M. S. Bochkova<sup>1</sup>, S. V. Uzhviyuk<sup>1</sup>, S. A. Zamorina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia*

*\*e-mail: Shardinak@gmail.com*

The effect of recombinant human chorionic gonadotropin (hCG) at concentrations of 10 and 100 MU/mL, typical for pregnancy, on differentiation and functional activity of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) was investigated. The subject of the study was isolated cells CD11b<sup>+</sup> that acquired the MDSC phenotype as a result of two-step activation with cytokines GM-CSF and IL-1 $\beta$  and lipopolysaccharide (LPS). It was shown that hCG at both concentrations significantly increased the total MDSC pool and at a lower concentration (10 IU/mL) promoted differentiation of the M-MDSC subpopulation. At the same time, 100 MU/mL hCG had no effect on the expression of arginase-1 and indolamine-2,3-dioxygenase (IDO) in MDSCs, but at a concentration of 10 IU/mL there was a tendency to increase IDO expression under the influence of hCG. When the cytokine profile was evaluated by multiplex analysis using Luminex xMAP technology, it was found that hCG did not modulate cytokine production in the CD11b<sup>+</sup> cell culture. Thus, this work demonstrates for the first time that hCG can induce MDSC differentiation.

**Keywords:** myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), *in vitro* cultivation, human chorionic gonadotropin (hCG), CD11b<sup>+</sup> cells, IDO, Arg1