

РЕГУЛЯЦИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ TREG ЭНДОГЕННЫМ МЕЛАТОНИНОМ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ

Глебездина Н. С.¹, Олина А. А.², Некрасова И. В.¹, Куклина Е. М.¹

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; ²ФГБОУ ВО ПГМУ
им. академика Е. А. Вагнера Минздрава России, Пермь, Россия

Исследована роль эндогенного мелатонина в регуляции процесса дифференцировки регуляторных Т-клеток (Treg) в период гестации. Показано различие в регуляции данного процесса гормоном у небеременных и беременных женщин. При беременности выявлено позитивное действие мелатонина на клетки *in vitro*, опосредованное сигналами с мембранных рецепторов для гормона, в ответ на поликлональную активацию.

Ключевые слова: Т-лимфоциты, Treg, дифференцировка, мелатонин, беременность

Регуляторные Т-лимфоциты (Treg) играют важную роль в развитии беременности: эффективная дифференцировка и активация этой клеточной субпопуляции является одним из ключевых механизмов формирования толерантности материнского организма к генетически чужеродному для нее (полуаллогенному) плоду [1]. Различные патологии гестационного периода, такие как невынашивание беременности или развитие преэклампсии, ассоциированы со снижением численности и активности Treg [2]. Поэтому регуляция данной клеточной субпопуляции привлекает пристальное внимание исследователей. Одним из потенциальных регуляторов Treg является эпифизарный гормон мелатонин. Известно, что Treg, как и другие лимфоциты, экспрессируют специфические мембранные рецепторы для гормона, MT1 и MT2 [3], а ключевой дифференцировочный фактор и маркер Treg, FoxP3, находится под контролем фактора транскрипции ROR α , который эффективно регулируется мелатонином и до недавнего времени рассматривался как третий, внутриклеточный, рецептор для данного гормона [4]. В связи с этим, целью настоящей работы было изучение роли эндогенного мелатонина в регуляции Treg в период гестации.

Объектами исследования служили лейкоциты женщин, находящихся в I и III триместрах беременности, и лейкоциты здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста. Уровень и активность Treg оценивали *ex vivo* и *in vitro*, в ответ на поликлональную активацию (анти-CD3/CD28), – по экспрессии мар-

кера дифференцировки Treg – транскрипционного фактора FoxP3, методом проточной цитометрии, а также по продукции ключевого цитокина этих клеток – TGF β , иммуноферментным анализом. Вклад эндогенного мелатонина в дифференцировку определяли при культивировании лимфоцитов в присутствии аутологичной сыворотки (как источника гормона) на фоне блокады мембранных рецепторов для мелатонина, MT1/MT2. Одновременно *ex vivo* определялись уровень мелатонина в сыворотке, а также экспрессия CD4⁺ Т-лимфоцитами ключевого мембранного рецептора для мелатонина, MT1, и мелатонин-регулируемого фактора ROR α . Статистический анализ проводили с использованием непараметрических Т-критерия Вилкоксона и U-критерия Манна-Уитни, корреляционный анализ – по критерию Спирмена (rs).

Исследование *ex vivo* выявило повышение уровня CD4⁺FoxP3⁺ Т-клеток (процент CD4⁺FoxP3⁺ Т-клеток (здесь и далее Me (LQ; UQ)): небеременные – 0,16 (0,05; 0,24); I триместр – 0,21 (0,15; 0,27); III триместр – 0,46 (0,34; 0,62), $p < 0,05$ в сопоставлении с небеременными, $p < 0,05$ в сопоставлении с беременными I триместра и концентрации сывороточного TGF β (концентрация TGF β , пг/мл: небеременные – 5309,89 (4135,67; 8832,55), I триместр – 12355,21 (10277,75; 15697,22), $p < 0,05$, III триместр – 11948,75 (10277,75; 12626,19), $p < 0,05$) в ходе беременности. Наряду с этим наблюдалось увеличение концентрации мелатонина в сыворотке крови в III триместре (концентрация мелато-

нина, пг/мл: небеременные – 21,37 (18,69; 38,47), I триместр – 19,55 (17,70; 34,90), III триместр – 48,59 (42,41; 135,85), $p < 0,05$ в сопоставлении с небеременными, $p < 0,05$ в сопоставлении с беременными I триместра). Несмотря на отсутствие корреляционных связей между рассмотренными выше факторами, тенденция у них одна.

Оценка уровня экспрессии рецептора MT1 не выявила различий в группах беременных и небеременных женщин. Однако установлено достоверное снижение в течение беременности процента $CD4^+$ Т-клеток, экспрессирующих транскрипционный фактор ROR α (процент $CD4^+ROR\alpha^+$ клеток: небеременные – 1,03 (0,50; 1,58); I триместр – 0,94 (0,76; 1,35); III триместр – 0,50 (0,44; 0,78), $p < 0,05$ в сопоставлении с беременными I триместра). Возможно, ингибирование ROR-опосредованной активации транскрипции генов-мишеней происходит за счет взаимодействия ROR α с FoxP3, что, в конечном итоге, оказывает влияние на регуляцию воспалительных реакций и развитие лимфоцитов [5]. Помимо этого, косвенное влияние на ROR α может оказывать и мелатонин.

В условиях поликлональной активации (анти-CD3/CD28) наблюдалось увеличение процента $CD4^+FoxP3^+$ Т-клеток только у небеременных, причем блокада мелатонин-зависимых сигналов это повышение не отменяла. При беременности же процент $CD4^+FoxP3^+$ Т-клеток не менялся (процент $CD4^+FoxP3^+$ Т-клеток: I триместр – 0,24 (0,21; 0,34); III триместр – 0,45 (0,35; 0,57), однако в присутствии ингибитора мелатониновых рецепторов наблюдалось достоверное снижение процентного содержания этих клеток по сравнению с уровнем активированной культуры (процент $CD4^+FoxP3^+$ Т-клеток: I триместр – 0,18 (0,12; 0,25), $p < 0,05$; III три-

местр – 0,34 (0,23; 0,42), $p < 0,05$). Аналогичные закономерности выявлены для небеременных и беременных III триместра при исследовании супернатантов культур активированных $CD4^+$ Т-клеток. Кроме того, у небеременных женщин выявлена отрицательная корреляционная связь между процентным содержанием рецептора ROR α и концентрацией TGF β в культуральных супернатантах: и *in vitro* ($rs = -0,734$, $p < 0,05$), и на фоне ингибитора ($rs = -0,734$, $p < 0,05$).

Таким образом, показано, что эндогенный мелатонин может принимать участие в формировании Treg, при этом позитивные эффекты мелатонина обусловлены MT1/MT2-опосредованными сигналами, а отрицательные – ROR α .

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-60094 мол_а_дк.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wu L., Luo L. – H., Zhang Y. – X., Li Q., Xu B. et al. Alteration of Th17 and Treg cells in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion before and after lymphocyte immunization therapy. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2014, 12, 74.
2. Steinborn A., Schmitt E., Kisielewicz A., Rechenberg S., Seissler N. et al. Pregnancy-associated diseases are characterized by the composition of the systemic regulatory T cell (Treg) pool with distinct subsets of Tregs. *Clin. Exp. Immunol.* 2012, 167(1), 84-98.
3. Lardone P. J., Guerrero J. M., Fernandez-Santos J. M., Rubio A., Martin-Lacave I. et al. Melatonin synthesized by T lymphocytes as a ligand of the retinoic acid-related orphan receptor. *J. Pineal. Res.* 2011, 51(4), 454-462.
4. Farez M. F., Mascanfroni I. D., Mendez-Huergo S. P., Yeste A., Murugaiyan G. et al. Melatonin contributes to the seasonality of multiple sclerosis relapses. *Cell.* 2015, 162 (6), 1338-1352.
5. Ziegler S. F., Buckner J. H. FOXP3 and the regulation of Treg/Th17 differentiation. *Microbes Infect.* 2009, 11(5), 594-598.

THE REGULATION OF TREG DIFFERENTIATION BY ENDOGENOUS MELATONIN DURING PREGNANCY

Glebezdina N. S.¹, Olina A. A.², Nekrasova I. V.¹, Kuklina E. M.¹

¹Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS; ²Perm State Medical University named after academician E. A. Wagner of the Ministry of healthcare of the Russian Federation, Perm, Russia

The role of endogenous melatonin in the regulation of the process of regulatory T cells (Treg) differentiation during the gestation period has been studied. The difference in the regulation of this process by the hormone was shown in non-pregnant and pregnant women. The positive effect of melatonin on the cells *in vitro* mediated by signals from membrane receptors for the hormone in response to polyclonal activation was revealed at pregnancy.

Key words: T lymphocytes, Treg, differentiation, melatonin, pregnancy