

УДК 632.939:612.112.94:612.63

*Е.Г. Орлова^{1,2}, О.А. Логинова¹, О.Л. Горбунова¹,
Н.В. Каримова³, С.В. Ширшев¹*

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛ TIM-3, CD9, CD49a ЛИМФОЦИТАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕРЕМЕННОСТИ

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН,
г. Пермь, Российская Федерация;

²Пермский государственный национальный исследовательский университет,
г. Пермь, Российская Федерация;

³ООО “Централизованная клиничко-диагностическая лаборатория”,
г. Пермь, Российская Федерация

Резюме. Физиологически протекающая беременность характеризуется существенными изменениями фенотипа и функций лимфоцитов периферической крови. Так, в первой половине беременности в матке значительно увеличивается количество лимфоцитов, мигрирующих туда из периферической крови и экспрессирующих молекулы Tim-3, CD49a, CD9, которые ограничивают их цитотоксичность и участвуют в их миграции. Однако экспрессия этих молекул на лимфоцитах периферической крови при физиологической беременности не изучена. **Цель работы** — исследовать экспрессию молекул Tim-3, CD49a, CD9 в общем пуле лимфоцитов и на CD3⁺T-лимфоцитах периферической крови женщин в I и III триместрах физиологически протекающей беременности. Объектом изучения являлась периферическая кровь условно-здоровых женщин с физиологически протекающей беременностью в I и III триместрах. Группа сравнения — условно-здоровые небеременные женщины в I фазе менструального цикла. Экспрессию молекул Tim-3, CD49a, CD9 анализировали в общем пуле лимфоцитов и на CD3⁺T-лимфоцитах периферической крови методом проточной цитофлюориметрии. Установлено, что в I триместре в общем пуле лимфоцитов экспрессия Tim-3 и CD49a была выше, а CD9 не изменялась по сравнению с небеременными. В III триместре в общем пуле лимфоцитов экспрессия Tim-3 и CD49a не отличалась, а CD9 была ниже, чем у небеременных. На CD3⁺-T-лимфоцитах и в I, и в III триместре экспрессия Tim-3 не отличалась, а CD49a и CD9 снижена по сравнению с небеременными. Таким образом, экспрессия молекул Tim-3, CD49a, CD9 изменялась по триместрам беременности как в общем пуле лимфоцитов, так и CD3⁺-T-лимфоцитах периферической крови, что значимо для регуляции их цитотоксической функции и миграционной активности.

Ключевые слова: Tim-3, CD49a, CD9, CD3⁺T-лимфоциты, беременность

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Орлова Екатерина Григорьевна
orlova_katy@mail.ru

Дата поступления 29.11.2022 г.

Образец цитирования:

Орлова Е.Г., Логинова О.А., Горбунова О.Л., Каримова Н.В., Ширшев С.В. Особенности экспрессии молекул Tim-3, CD9, CD49a лимфоцитами периферической крови при физиологической беременности. [Электронный ресурс] Вестник уральской медицинской академической науки. 2022, Том 19, №5, с. 461–473, DOI: 10.22138/2500-0918-2022-19-5-461-473

Физиологически протекающая беременность характеризуется лимфопенией, а также существенными изменениями в популяции лимфоцитов периферической крови, что обусловлено, главным обра-

зом, влиянием гормонов, продуцируемых плацентой [1, 2]. С одной стороны, формирование пула периферических Т-лимфоцитов происходит в тимусе, продуктивная функция которого снижается вследствие стероид-индуцированной инволюции, что ограничивает поступление наивных Т-лимфоцитов в периферическую кровь [3]. С другой стороны, под действием гормонов беременности усиливаются альтернативные механизмы, направленные на поддержание численности и клонального разнообразия Т-лимфоцитов периферической крови, такие как гомеостатическая пролиферация и внетимическая дифференцировка Т-лимфоцитов во вторичных лимфоидных органах [4]. Кроме этого, формирование периферической иммунной толерантности в зоне фето-плацентарного контакта под влиянием гормонов беременности сопровождается системным угнетением цитотоксической активности и продукции провоспалительных цитокинов разными популяциями лимфоцитов, в том числе и в периферической крови [2, 5, 6]. Продуцируемые плацентой гормоны и факторы, секретируемые клетками развивающегося трофобласта, стимулируют миграцию в фето-плацентарную зону лимфоидных клеток из периферической крови, которые выполняют там иммунорегуляторную и фетотрофическую функцию [6, 7]. Показано, что при беременности в децидуальной оболочке увеличивается количество лимфоидных клеток, коэкспрессирующих молекулы Tim-3, CD9, CD49a [8–10], однако экспрессия этих молекул на лимфоцитах периферической крови при беременности до конца не изучена. Согласно современным представлениям молекула Tim-3 (T-cell Ig and mucin domain-containing protein 3), относящаяся к «check-point» молекулам, играет ключевую роль в регуляции цитотоксичности разных популяций лимфоцитов [8]. Tim-3 присутствует на большинстве лимфоидных клеток [8]. Экспрессия Tim-3 усиливается в ответ на активацию клеток и ограничивает продукцию провоспалительных цитокинов, дегрануляцию, повышает чувствительность к индуцированному апоптозу [11]. Лигандом для Tim-3 является галектин-9, уровень которого в периферической крови увеличивается при беременности [12]. В единичных исследованиях показано, что CD49a, относящаяся к семейству интегринов, негативно влияет на цитотоксичность и продукцию провоспалительных цитокинов клетками крови [13, 14]. Экспрессия CD49a существенно увеличена на лимфоцитах периферических лимфоидных органов, но характерна и для клеток периферической крови, отражая их миграционную активность [14, 15]. Молекула CD9 относится к семейству тетраспонинов и регулирует адгезию и трансэндотелиальную миграцию лейкоцитов, взаимодействие с антиген-презентирующими клетками, а также экспрессию и активность других адгезионных молекул [16]. Долгое время считалось, что экспрессия CD9 характерна в большей степени для лимфоцитов периферических лимфоидных органов [17], но описана и для периферических лейкоцитов [18, 19]. Лигандами для CD9 в том числе являются и продуцируемые клетками трофобласта PSG (pregnancy specific glycoproteins), концентрация которых нарастает в периферической крови пропорционально сроку беременности [17]. Взаимодействие CD9 с PSG регулирует продукцию цитокинов лейкоцитами в матке [20]. Динамика экспрессии CD9 на лимфоцитах периферической крови при физиологической беременности не изучена. Все вышесказанное подтверждает значимость и актуальность изучения экспрессии этих молекул в общем пуле лимфоцитов периферической крови и на CD3⁺Т-лимфоцитах при беременности. Известно, что разные триместры беременности неравноценны по риску спонтанных иммунных аборт. Первый триместр беременности характеризуется наибольшей частотой спонтанных иммунных абортов, что отчасти связано с экспрессией молекул МНС клетками трофобласта и требует, по-видимому, наиболее эффективных регуляторных механизмов, обеспечивающих периферическую толерантность [2]. В третьем триместре происходит подготовка к родам, что также связано с глубокими изменениями в иммунореактивности организма матери.

Поэтому **целью** данной работы являлось изучение экспрессии молекул Tim-3, CD49a и CD9 в общем пуле лимфоцитов и на CD3⁺ Т-лимфоцитах периферической крови в I и в III триместрах физиологически протекающей беременности.

Материалы и методы

1. Объекты исследования

Исследовали периферическую кровь условно-здоровых небеременных (I фаза менструального цикла) и женщин с физиологически протекающей беременностью в I и III триместрах. Критериями включения являлось: наличие одной и более успешно завершившихся беременностей; отсутствие в

прошлом патологий течения беременности; отсутствие в настоящем данных за наличие патологии беременности; отсутствие острых и хронических соматических, эндокринных, аутоиммунных, генетических заболеваний; отрицание диет, приема контрацептивных и гормональных, противовоспалительных или антибактериальных препаратов; наличие добровольного информированного согласия на использование биологического материала. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ИЭГМ УрО РАН и проведено в соответствии с этическими принципами, изложенными в Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации, с изменениями 2013 г. и Конвенцией о защите прав и достоинства человека в связи с применением достижений биологии и медицины, 1999 г. Клиническая и демографическая характеристика участников исследования представлена в таблице 1. Исследуемые группы не отличались по возрастному составу.

Таблица 1
Клиническая и демографическая характеристика участников исследования
Table 1
Clinical and demographic characteristics of the study participants

Исследуемые группы/ Studied groups	N	Возраст, лет / Ages	Срок беременности, недель / Gestation period, weeks
Небеременные женщины/ Non-pregnant women	10	26 (21-29)	-
Беременные, I триместр/ I trimester pregnancy	12	26 (22-32)	12 (10-12)
Беременные, III триместр/ III trimester pregnancy	12	30 (28-31)	30 (28-31)

Примечание: данные представлены в виде Медианы и межквартильного размаха, Me(Q1-Q3); N — количество проведенных исследований

Note: the data are presented as Median and interquartile range, Me(Q1-Q3); N is the number of studies

2. Анализ фенотипа клеток

Венозную кровь забирали из локтевой вены утром натощак объемом 2 мл в вакуумные пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА). Мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) выделяли методом седиментации в градиенте плотности фиколл-урографина (1,077 г/см³) по стандартной методике [4]. Затем МПК дважды отмывали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), содержащем 2 мМ ЭДТА и 0,1% бычьего сывороточного альбумина (БСА). Фенотип клеток (1×10⁶ клеток в пробе) анализировали методом проточной цитофлюориметрии на проточном цитометре «CytFlex S» (BeckmanCoulter, США) с использованием программы «CytExpert 2.0» (BeckmanCoulter, США). Окрашивание моноклональными антителами проводили согласно инструкции производителя (Табл. 2). Анализировали не менее 100 000 событий в каждой пробе. Для уменьшения неспецифического связывания и адгезии клеток окрашивание проводили в ФСБ, содержащем 2 мМ ЭДТА и 0,1% БСА, без использования консервантов. Для контроля неспецифического связывания и выделения негативного по флуоресценции окна использовали соответствующие изотипические и негативные контроли. Стратегия гейтирования представлена на рисунке 1. Оценивали экспрессию Tim-3, CD49a и CD9 в общем пуле лимфоцитов и на CD3⁺T-лимфоцитах.

Таблица 2
Характеристика моноклональных антител
Table 2
Characteristics of monoclonal antibodies

Моноклональные антитела / Monoclonal antibodies	Флюорохром / Fluorochrome	Клон / Clone	Изотип / Isotype	Фирма / Firm (*)
CD3	PE	OKT3	Mouse/IgG2a, κ	eBioscience™,
Tim-3 (CD366)	APC	F38-2E2	Mouse/IgG1, κ	BioLegend
CD9	PerCP/Cyanine5.5	HI9a	Mouse/IgG1, κ	BioLegend
CD49a	APC/Fire™ 750	TS2/7	Mouse/IgG1, κ	BioLegend
Isotype control	APC	MOPC-21	Mouse/IgG1, κ	BioLegend
Isotype control	PerCP/Cyanine5.5	MOPC-21	Mouse/IgG1, κ	BioLegend
Isotype control	APC/Fire™ 750	MOPC-21	Mouse/IgG1, κ	BioLegend

* — страна-производитель всех моноклональных антител — США /

* — country of origin of all monoclonal antibodies — USA

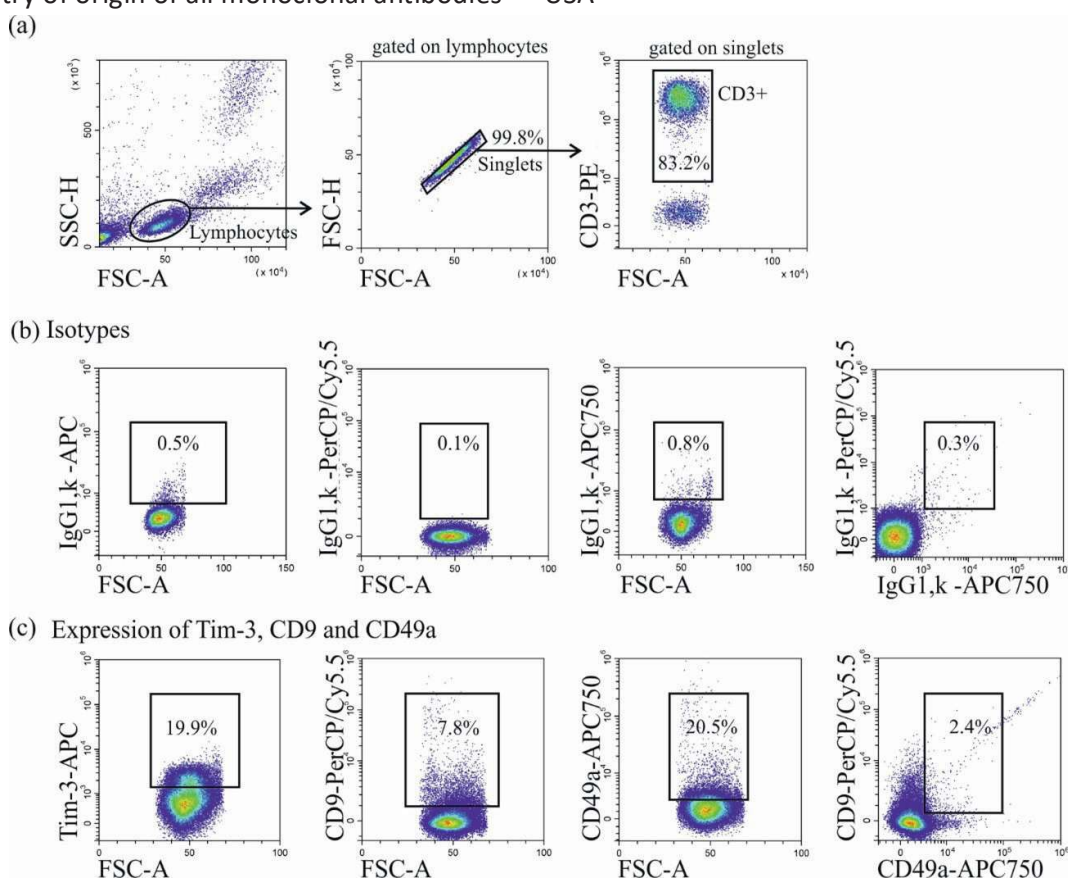


Рисунок 1. Стратегия гейтирования общего пула лимфоцитов и CD3⁺-лимфоцитов. (a) Выделение лимфоцитарного гейта по параметрам площади прямого (FSC-A) и высоты бокового (SSC-H) светорассеивания; Дискриминация слипшихся клеток (дуплетов) по параметрам площади и высоты прямого светорассеивания (FSC-A/ FSC-H); Определение CD3⁺-Т-лимфоцитов в общем лимфоцитарном гейте; (b) Репрезентативные точечные гистограммы изотипических контролей и гейтирования экспрессии молекул Tim3, CD9, CD49a и коэкспрессии CD9 и CD49a

Figure 1. The strategy of gating the total lymphocytes and CD3⁺-lymphocytes. (a) Isolation of the lymphocyte gate according to the parameters of FSC-A/SSC-H; next step for identification of viable cells and gated out of doublets and dead cells (FSC-A/ FSC-H); next step for determination of CD3⁺-T-lymphocytes is gated with basis on the expression of CD3; Representative histograms of isotypic controls (b) and the determination of Tim3, CD9, CD49a expression and CD9 and CD49a co-expression (c).

3. Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием программы Prism 8.0.1. Нормальность распределения оценивали по критерию Колмогорова-Смирнова. Для анализа статистической значимости различий использовали t-тест для независимых выборок. Взаимосвязь признаков оценивали, рассчитывая коэффициент корреляции Пирсона (r). При множественных сравнениях использовали однофакторный или многофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим тестом Бонферони. Данные в рисунках представлены в виде среднего значения (mean) и стандартной ошибки среднего (SEM). Уровни статистической значимости обозначены как * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Результаты и обсуждение

При анализе общего пула CD3⁺T-лимфоцитов периферической крови установлено, что в I триместре беременности их количество снижалось, а в III триместре не отличалось от небеременных (Рис. 2). Подобная динамика CD3⁺T-лимфоцитов при физиологической беременности показана и в работах других авторов [21–23]. Уменьшение общего количества CD3⁺T-лимфоцитов в I триместре можно объяснить снижением продуктивной функции тимуса вследствие его стероид-индуцированной инволюции при беременности [3], но также и активной миграцией лимфоцитов в периферические лимфоидные органы и матку [24–26]. Следует также отметить, что для физиологической беременности характерна лимфопения [1]. Тогда как восстановление количества CD3⁺T-лимфоцитов в III триместре, по-видимому, связано с усилением гомеостатической пролиферации под влиянием гормонов, продуцируемых плацентой при беременности [4].

В общем пуле лимфоцитов периферической крови экспрессия молекул Tim-3 и CD49a увеличивалась в I триместре беременности и не отличалась от небеременных в III триместре (Рис. 3). Причем в III триместре экспрессия CD49a была достоверно ниже, чем в I триместре беременности (Рис. 3). Как упоминалось ранее, молекулы Tim-3 и CD49a играют важную роль в снижении цитотоксичности и продукции провоспалительных цитокинов клетками крови. Можно полагать, что увеличение экспрессии Tim-3 и CD49a в общем пуле лимфоцитов в I триместре является одним из механизмов системного угнетения цитотоксичности в ранние сроки беременности. Количество Tim-3⁺CD3⁺T-лимфоцитов периферической крови не изменялось, а CD49a⁺CD3⁺T-лимфоцитов снижалось и в I, и в III триместрах по сравнению с небеременными (Рис. 2). Следовательно, можно заключить, что экспрессия Tim-3 и CD49a увеличивалась в I триместре беременности на лимфоцитах, не экспрессирующих CD3, к которым принадлежат, главным образом, натуральные киллеры (NK) [8, 13, 14]. В работах других авторов показано, что в I триместре беременности экспрессия Tim-3 и CD49a увеличивается на децидуальных NK [8, 13, 14]. В немногочисленных исследованиях описано, что субпопуляции CD3⁺T-лимфоцитов периферической крови характеризуются разным уровнем экспрессии Tim-3 [27]. Отсутствие изменений в экспрессии Tim-3 в общем пуле CD3⁺T-лимфоцитов при беременности, по-видимому, объясняется разнонаправленными эффектами в субпопуляциях CD3⁺T-лимфоцитов периферической крови, CD4 и CD8 лимфоцитах, что в настоящее время изучено, главным образом, для цитотоксических популяций [12, 27].

Молекула CD9 регулирует адгезию и трансэндотелиальную миграцию лейкоцитов, а также взаимодействие с антиген-презентирующими клетками [16]. Экспрессия CD9 в общем пуле лимфоцитов в I триместре не отличалась от небеременных, а в III триместре снижалась (Рис. 3). Количество CD3⁺T-лимфоцитов, экспрессирующих CD9, было ниже и в I, и в III триместрах, чем у небеременных (Рис. 2). Можно заключить, что в I триместре экспрессия CD9 не меняется или увеличивается на лимфоцитах, не экспрессирующих CD3, то есть в первую очередь на NK периферической крови, что значимо для их миграции в матку [9]. А в III триместре экспрессия CD9 в общем пуле лимфоцитов уменьшалась, главным образом, за счет снижения количества CD9⁺CD3⁺T-лимфоцитов, что подтверждается положительной корреляционной связью ($r=0,73$; $p < 0,05$). Учитывая ведущую роль CD9 для взаимодействия с клетками эндотелия и миграции в очаги воспаления, можно полагать, что снижение экспрессии CD9 на CD3⁺T-лимфоцитах, включающие как CD4⁺T-хелперы, так и цитотоксические CD8⁺T-лимфоциты и T-клетки с функциями NK (NKT), также отражает механизм системного угнетения цитотоксических клеточно-опосредованных иммунных реакций при беременности.

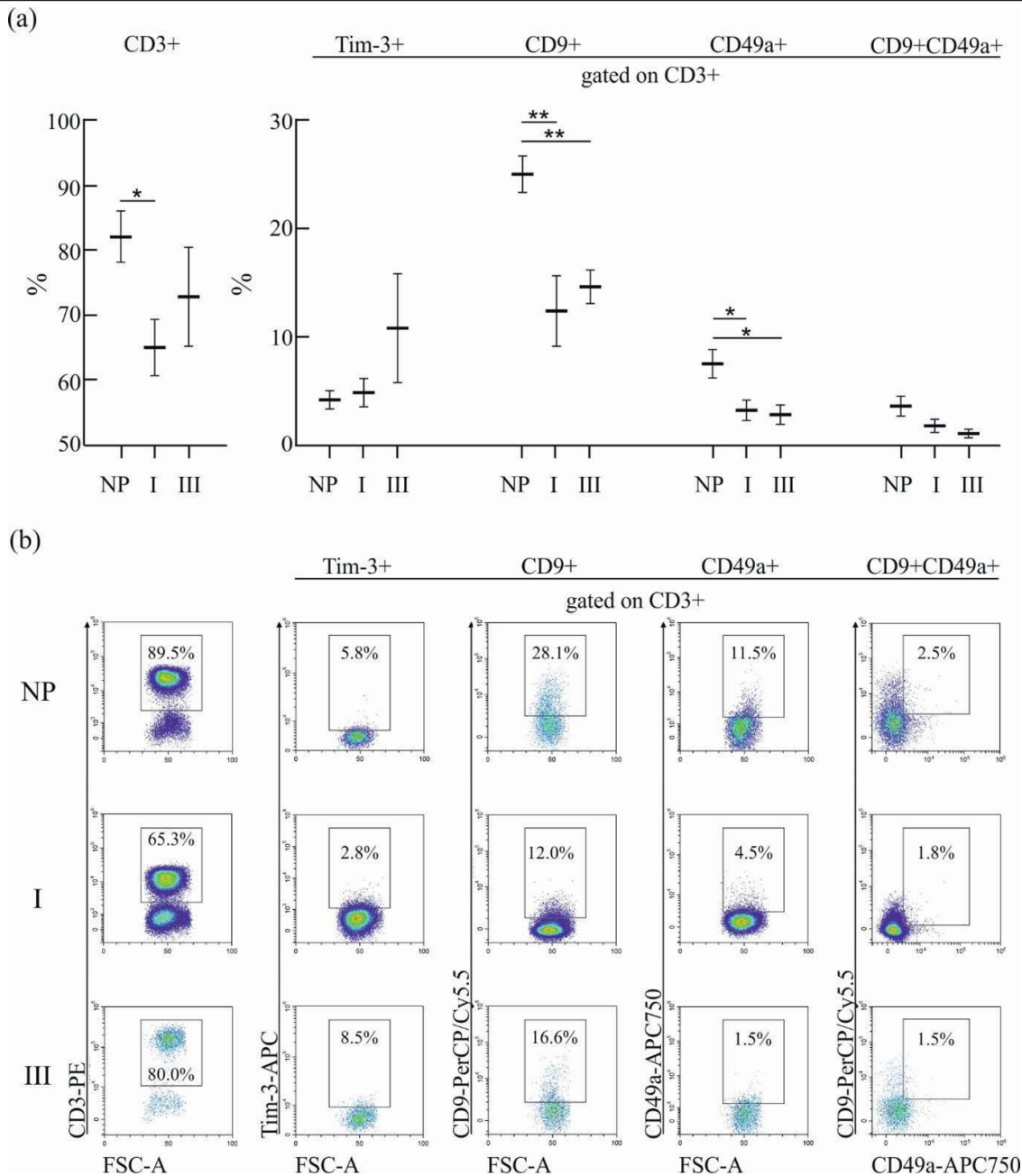


Рисунок 2. Экспрессия молекул Tim3, CD9 и CD49a CD3⁺Т-лимфоцитами периферической крови

(a) Процент CD3⁺Т-лимфоцитов в общем лимфоцитарном гейте, а также процент клеток, экспрессирующих молекулы Tim3, CD9, CD49a и коэкспрессирующих CD9 и CD49a в гейте CD3⁺Т-лимфоцитов в группах сравнения. Данные представлены в виде среднего±стандартной ошибки среднего (Mean ± SEM) (b) Репрезентативные точечные гистограммы, демонстрирующие экспрессию CD3 в общем лимфоцитарном гейте, а также экспрессию Tim3, CD9, CD49a и коэкспрессию CD9 и CD49a в гейте CD3⁺Т-лимфоцитов в исследуемых группах.

Примечание: NP (non-pregnant) — небеременные, I — I триместр беременности, III — III триместр беременности; *p<0,05, **p<0,01 по t-тесту для независимых выборок по отношению к группе небеременных (NP).

Figure 2. Expression of Tim3, CD9 and CD49a molecules by CD3⁺T-lymphocytes of peripheral blood

((a) The percentage of CD3⁺T-lymphocytes in the total lymphocyte gate, as well as the percentage of cells expressing Tim3, CD9, CD49a molecules and co-expressing CD9 and CD49a in the CD3⁺T-lymphocyte gate. The data are presented as mean ± standard error of mean (Mean ± SEM)

(b) Representative dot histograms showing CD3 expression in the total lymphocyte gate; as well as Tim3, CD9, CD49a expression and CD9 and CD49a co-expression in the CD3⁺T-lymphocyte gate. Note: NP (non-pregnant) — non-pregnant, I — I trimester of pregnancy, III — III trimester of pregnancy; *p<0.05, **p<0.01 according to the t-test for independent samples to non-pregnant (NP).

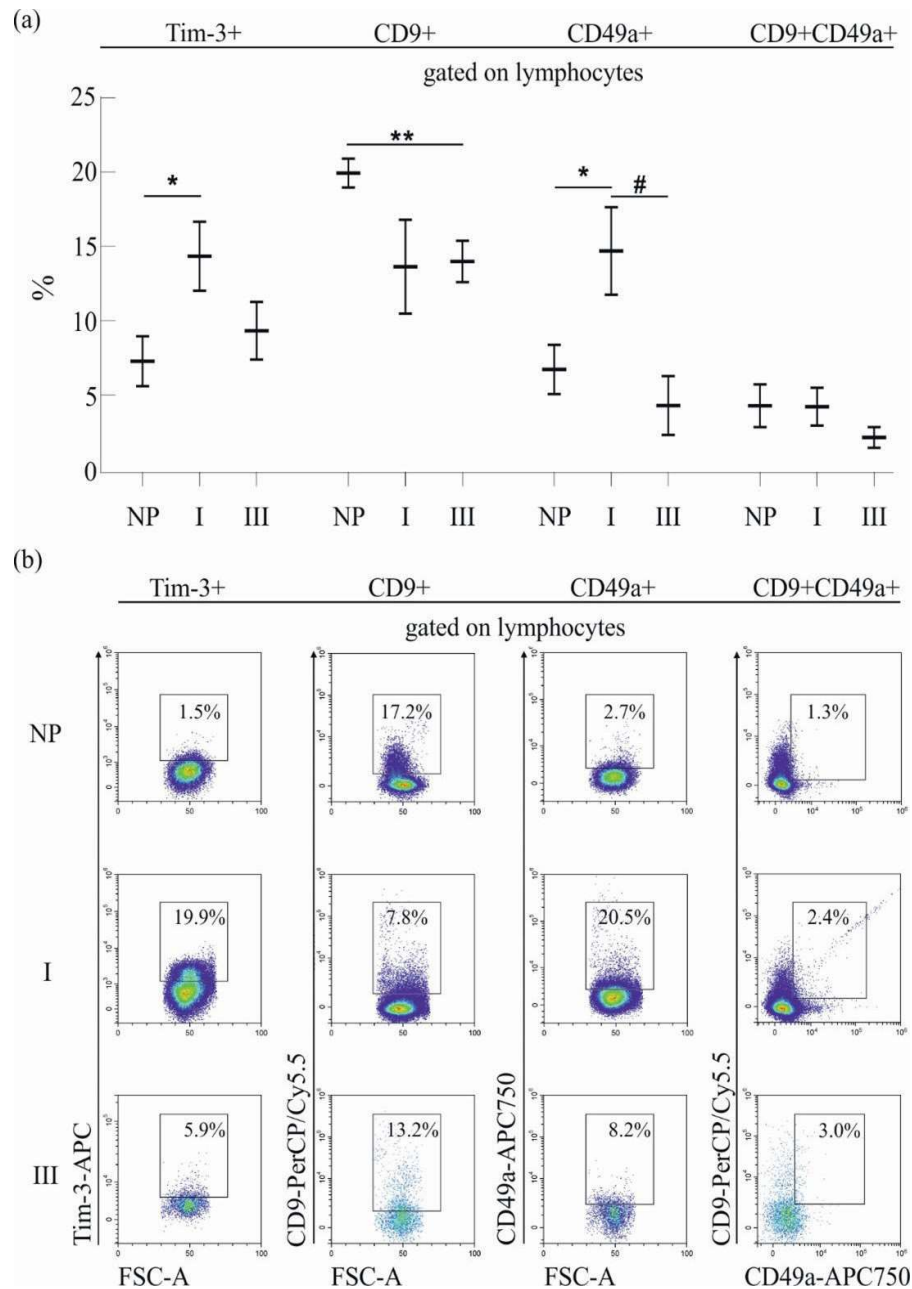


Рисунок 3. Экспрессия молекул Tim3, CD9 и CD49a в гейте лимфоцитов периферической крови (а) Процент клеток, экспрессирующих молекулы Tim3, CD9, CD49a и коэкспрессирующих CD9 и CD49a в гейте лимфоцитов в группах сравнения. Данные представлены в виде среднего \pm стандартной ошибки среднего (Mean \pm SEM). (б) Репрезентативные точечные гистограммы, демонстрирующие экспрессию Tim3, CD9, CD49a и коэкспрессию CD9 и CD49a в гейте лимфоцитов в группах сравнения.

Примечание: NP (non-pregnant) — небеременные, I — I триместр беременности, III — III триместр беременности; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по t-тесту для независимых выборок по отношению к группе небеременных (NP); # — $p < 0,05$ между I — III триместром.

Figure 3. Expression of Tim3, CD9 and CD49a molecules in the gate of peripheral blood lymphocytes. (a) Percentage of cells expressing Tim3, CD9, CD49a molecules and co-expressing CD9 and CD49a in the lymphocyte gate. The data are presented as Mean \pm standard error of mean (Mean \pm SEM). (b) Representative dot histograms showing the expression of Tim3, CD9, CD49a and co-expression of CD9 and CD49a in the lymphocyte gate. Note: NP — non-pregnant, I — I trimester of pregnancy, III — III trimester of pregnancy; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ according to the t-test for independent samples to non-pregnant (NP); # — $p < 0.05$ between I — III trimesters.

При этом общее количество лимфоцитов, коэкспрессирующих CD9 и CD49a, как и CD9⁺CD49a⁺CD3⁺T-лимфоцитов, достоверно не менялось по триместрам беременности (Рис. 2, 3). При этом была выявлена положительная корреляция между экспрессией молекул Tim-3 и CD49a в общем пуле лимфоцитов ($r=0,69$; $p<0,05$). Возможно, что экспрессия Tim-3 на лимфоцитах играет значимую роль в индукции экспрессии CD49a. Учитывая, что CD49a вместе с CD9 регулирует миграцию лимфоцитов, можно полагать, что экспрессия Tim-3 вовлечена в регуляцию миграции лимфоцитов при беременности.

Заключение

В результате проведенных исследований установлено, что I триместр физиологической беременности характеризуется увеличением экспрессии молекул Tim-3 и CD49a на клетках, не экспрессирующих CD3, в общем пуле лимфоцитов периферической крови, что отражает механизм снижения цитотоксичности, главным образом, для НК. В III триместре беременности снижение экспрессии молекул CD9 и CD49a характерно, главным образом, для CD3⁺T-лимфоцитов, что влияет на снижение цитотоксичности и миграционной активности субпопуляций CD4, CD8 и NKT. Полученные результаты дополняют наше понимание механизмов регуляции цитотоксичности и миграционной активности лимфоцитов периферической крови при физиологически протекающей беременности. Регуляция экспрессии молекул Tim-3, CD9 и CD49a на разных субпопуляциях лимфоцитов периферической крови представляет один из потенциальных терапевтических подходов для влияния на их цитотоксические функции, что значимо как для благополучного исхода беременности, так и для лечения онкологических заболеваний.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Abu-Raya B., Michalski C., Sadarangani M., Lavoie P. M. Maternal Immunological Adaptation During Normal Pregnancy // *Frontiers in immunology*, 2020, 11, 575197. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.575197>.
2. Ширшев С.В. (2009) Иммунология материнско-фетальных взаимодействий. Екатеринбург, УрО РАН. 582 с.
3. Taves, M. D., Ashwell, J. D. (2022). Effects of sex steroids on thymic epithelium and thymocyte development // *Frontiers in immunology*, 13, 975858. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.975858>
4. Shirshov S.V., Kuklina E.M., Maksimov A.Y., Krapivina O.A., Parshakova N. S. Extrathymic rearrangement of alphabetaT-lymphocyte antigen receptor genes during pregnancy // *Biochemistry*. 2007. V. 72(9), P. 983–988. doi:10.1134/s000629790709009x.
5. Ширшев С.В., Некрасова И.В., Горбунова О.Л., Орлова Е.Г. Гормональная регуляция цитотоксической активности НК-клеток // Доклады академии наук. - 2017.-Т.-472, №1.- С.106-108. <https://doi.org/10.1134/S0012496617010021>.
6. Mori M., Bogdan A., Balassa T., Csabai T., Szekeres-Bartho J. The decidua-the maternal bed embracing the embryo-maintains the pregnancy // *Seminars in immunopathology*, 2016, 38(6), 635–649. <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0574-0>.
7. Saito S., Nakashima A., Myojo-Higuma S., Shiozaki A. The balance between cytotoxic NK cells and regulatory NK cells in human pregnancy // *J. of Reprod. Immunol.* 2008. V. 77(1), P. 14–22. doi: 10.1016/j.jri.2007.04.007.
8. Sun J., Yang M., Ban Y., Gao W., Song B., Wang Y., Zhang Y., Shao Q., Kong B., Qu X. Tim-3 is up regulated in NK cells during early pregnancy and inhibits NK cytotoxicity toward trophoblast in galectin-9 dependent pathway // *PloS one*. 2016. V. 11(1), e0147186. doi: 10.1371/journal.pone.0147186.
9. Lee C.L., Vijayan M., Wang X., Lam K.K.W., Koistinen H., Seppala M., Li R.H.W., Ng, E.H. Y., Yeung, W.S.B., Chiu, P.C.N. Glycodelin-A stimulates the conversion of human peripheral blood CD16-CD56bright NK cell to a decidual NK cell-like phenotype // *Human Reprod.* 2019. V. 34(4), P. 689–701. doi: 10.1093/humrep/dey378.
10. Cerdeira A.S., Rajakumar A., Royle C.M., Lo A., Husain Z., Thadhani R.I., Sukhatme V.P., Karumanchi S.A., Korcow H.D. Conversion of peripheral blood NK cells to a decidual NK-like phenotype by a cocktail of defined factors // *J. of immunol.* 2013. V. 190(8), P. 3939–3948. doi: 10.4049/jimmunol.1202582.
11. Xu Y., Zhang H., Huang Y., Rui X., Zheng F. Role of TIM-3 in ovarian cancer // *Clin. & transl. oncol.*

2017. V. 19(9), P. 1079–1083. doi: 10.1007/s12094-017-1656-8.

12. Meggyes M., Miko E., Polgar B., Bogar B., Farkas B., Illes Z., Szereday L. Peripheral blood TIM-3 positive NK and CD8⁺ T cells throughout pregnancy: TIM-3/galectin-9 interaction and its possible role during pregnancy // *PloS one*. 2014. V. 9(3), e92371. doi: 10.1371/journal.pone.0092371.

13. Du X., Zhu H., Jiao D., Nian Z., Zhang J., Zhou Y., Zheng X., Tong X., Wei H., Fu B. Human-induced CD49a⁺ NK cells promote fetal growth // *Front. in Immunol*. 2022. V. 13, P. 821542. doi: 10.3389/fimmu.2022.821542.

14. Li H., Hou Y., Zhang S., Zhou Y., Wang D., Tao S., Ni F. CD49a regulates the function of human decidual natural killer cells // *Am. J. of Reprod. Immunol*. 2019. V. 81(4), e13101. doi: 10.1111/aji.13101.

15. Martrus G., Kautz T., Lunemann S., Richert L., Glau L., Salzberger W., Goebels H., Langeneckert A., Hess L., Poch T., Schramm C., Oldhafer K.J., Koch M., Tolosa E., Nashan B., Altfeld M. Proliferative capacity exhibited by human liver-resident CD49a⁺CD25⁺NK cells // *PloS one*. 2017. V. 12(8), e0182532. doi: 10.1371/journal.pone.0182532.

16. Reyes R., Cardeñas B., Machado-Pineda Y., Cabañas C. Tetraspanin CD9: a key regulator of cell adhesion in the immune system // *Front. in Immunol*. 2018. V. 9, P. 863. doi: 10.3389/fimmu.2018.00863.

17. Koopman L.A., Kopcow H.D., Rybalov B., Boyson J.E., Orange J.S., Schatz F., Masch R., Lockwood C.J., Schachter A.D., Park P.J., Strominger J.L. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential // *The J. of exp. medicine*. 2003. V. 198(8), P. 1201–1212. doi: 10.1084/jem.20030305.

18. Fukuhara M., Muto S., Inomata S., Yamaguchi H., Mine H., Takagi H., Ozaki Y., Watanabe M., Inoue T., Yamaura T., Okabe N., Matsumura Y., Hasegawa T., Osugi J., Hoshino M., Higuchi M., Shio Y., Suzuki H. The clinical significance of tertiary lymphoid structure and its relationship with peripheral blood characteristics in patients with surgically resected non-small cell lung cancer: a single-center, retrospective study // *Cancer immunology, 2022, immunotherapy : CII*, 71(5), 1129–1137. <https://doi.org/10.1007/s00262-021-03067-3>

19. Sánchez-Rodríguez E.N., Nava-Salazar S., Mendoza-Rodríguez C.A., Moran C., Romero-Arauz J.F., Ortega E., Granados J., Cervantes-Peredo A., Cerbón M. Persistence of decidual NK cells and KIR genotypes in healthy pregnant and preeclamptic women: a case-control study in the third trimester of gestation // *Reprod. Boil. and endocrinol*. 2011. V. 9, P. 8. doi: 10.1186/1477-7827-9-8.

20. Moore T., Williams J. M., Becerra-Rodríguez M. A., Dunne M., Kammerer R., Dveksler G. Pregnancy-specific glycoproteins: evolution, expression, functions and disease associations. *Reproduction (Cambridge, England)*, 2022. 163(2), R11–R23. <https://doi.org/10.1530/REP-21-0390>.

21. Wang, W., Zhao, Y., Zhou, X., Sung, N., Chen, L., Zhang, X., Ma, D., Zhu, P., & Kwak-Kim, J. Dynamic changes in regulatory T cells during normal pregnancy, recurrent pregnancy loss, and gestational diabetes // *Journal of reproductive immunology*, 2022, 150, 103492. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2022.103492>

22. Salazar Garcia M. D., Mobley Y., Henson J., Davies M., Skariah A., Dambaeva S., Gilman-Sachs A., Beaman K., Lampley C., & Kwak-Kim J. Early pregnancy immune biomarkers in peripheral blood may predict preeclampsia // *Journal of reproductive immunology*, 2018, 125, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2017.10.048>

23. Yuan J., Li J., Huang S.Y., Sun X. Characterization of the subsets of human NKT-like cells and the expression of Th1/Th2 cytokines in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion // *J. of Reprod. Immunol*. 2015. V. 110, P. 81–88. doi: 10.1016/j.jri.2015.05.001.

24. Tilburgs T., Roelen D.L., van der Mast B.J., de Groot-Swings G.M., Kleijburg C., Scherjon S.A., Claas F.H. Evidence for a selective migration of fetus-specific CD4⁺CD25^{bright} regulatory T cells from the peripheral blood to the decidua in human pregnancy // *J. of Immunol*. 2008. V. 180(8), P. 5737–5745. doi: 10.4049/jimmunol.180.8.5737.

25. Kim C.J., Romero R., Chaemsaihong P., Kim J.S. Chronic inflammation of the placenta: definition, classification, pathogenesis, and clinical significance // *Am. J. of obstetrics and gynecol*. 2015. V. 213(4), S53–S69. doi: 10.1016/j.ajog.2015.08.041.

26. Pérez Leirós C., Ramhorst R. Tolerance induction at the early maternal-placental interface through selective cell recruitment and targeting by immune polypeptides // *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)*, 2013, 69(4), 359–368. <https://doi.org/10.1111/aji.12087>

27. Zych M., Roszczyk A., Kniotek M., Dąbrowski F., Zagożdżon R. Differences in immune checkpoints expression (TIM-3 and PD-1) on T cells in women with recurrent miscarriages-preliminary studies // *J. of Clin. Med*. 2021. V. 10(18), P. 4182. doi: 10.3390/jcm10184182.

Авторы

Орлова Екатерина Григорьевна

«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН
Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции
Российская Федерация, 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13
ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»
Старший преподаватель кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета
Российская Федерация, 614068, г. Пермь, ул. Букирева, 15
orlova_katy@mail.ru

Логинова Ольга Александровна

«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН
Кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции
Российская Федерация, 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13
jallopukki@ya.ru

Горбунова Ольга Леонидовна

«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН
Кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции
Российская Федерация, 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13
olia15_77@mail.ru

Каримова Нина Вячеславовна

ООО «Централизованная клиничко-диагностическая лаборатория»
Заведующая лабораторией
Российская Федерация, 614025, г. Пермь, ул. Серпуховская, д. 4а, оф. 1
Karimova.n@ckdl.ru

Ширшев Сергей Викторович

«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН
Доктор медицинских наук, профессор, Заслуженный деятель науки РФ, заведующий лабораторией
иммунорегуляции
Российская Федерация, 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13
shirshev@iegm.ru

*E.G. Orlova^{1,2}, O.A. Loginova¹, O.L. Gorbunova¹,
N.V. Karimova³, S.V. Shirshv¹*

FEATURES OF TIM-3, CD9, CD49a MOLECULE EXPRESSIONS BY PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES DURING PHYSIOLOGICAL PREGNANCY

¹Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS – branch of Perm Federal
Research Center UB RAS, Perm, Russian Federation;

²Perm State National Research University, Perm, Russian Federation;

³LLC “Centralized Clinical and Diagnostic Laboratory”, Perm, Russian Federation

Abstract. Physiological pregnancy is characterized by significant changes in the phenotype and functions of peripheral blood lymphocytes. Thus, the number of lymphocytes migrating from peripheral blood in the uterus and expressing Tim-3, CD49a, CD9 molecules which limit their cytotoxicity and participate in their migration, is significantly increased in the first half of pregnancy. However, the expression of these

molecules on peripheral blood lymphocytes during physiological pregnancy has not been studied. **The aim** of the work was to study the expression of Tim-3, CD49a, CD9 molecules in the total pool of lymphocytes and on CD3⁺T-lymphocytes of peripheral blood of women in the I and III trimesters of physiological pregnancy. The object of the study was the peripheral blood of healthy women with physiological pregnancy in the I and III trimesters. The comparison group is healthy non-pregnant women in the first phase of the menstrual cycle. The expression of Tim3, CD49a, and CD9 molecules was analyzed in a pool of lymphocytes and on CD3⁺T-lymphocytes of peripheral blood by flow cytometry. It was found that in the first trimester, the expression of Tim-3 and CD49a in the total pool of lymphocytes was higher, and CD9 did not change compared to non-pregnant women. In the third trimester, the expression of Tim-3 and CD49a in the total pool of lymphocytes did not change, and CD9 was lower than in non-pregnant women. The expression of Tim-3 did not change on CD3⁺-T lymphocytes in both I and III trimesters, and CD49a and CD9 were lower compared to non-pregnant women. Thus, the expression of Tim-3, CD49a, and CD9 molecules varied during the trimesters of pregnancy both in the total pool of lymphocytes and CD3⁺-T lymphocytes of peripheral blood, which is significant for the regulation of their cytotoxic function and migration activity.

Keywords: Tim-3, CD49a, CD9, CD3⁺T-lymphocytes, pregnancy

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Ekaterina G. Orlova

orlova_katy@mail.ru

Received: 29.11.2022

For citation:

Orlova E.G., Loginova O.A., Gorbunova O.L., Karimova N.V., Shirshov S.V. Features of TIM-3, CD9, CD49a molecule expressions by peripheral blood lymphocytes during physiological pregnancy. [Online] Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2022, Vol. 19, no. 5, pp. 461–473. DOI: 10.22138/2500-0918-2022-19-5-461-473 (In Russ)

REFERENCES

1. Abu-Raya B., Michalski C., Sadarangani M., Lavoie P. M. Maternal Immunological Adaptation During Normal Pregnancy. *Frontiers in immunology*, 2020, 11, 575197. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.575197>.
2. Shirshov S.V. (2009) *Immunologija materinsko-fetal'nykh vzaimodejstvij* [Immunology of maternal-fetal interactions: monogr.]. Ekaterinburg, 2009. 582 p. (In Russ.).
3. Taves, M. D., Ashwell, J. D. (2022). Effects of sex steroids on thymic epithelium and thymocyte development. *Frontiers in immunology*, 13, 975858. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.975858>.
4. Shirshov S.V., Kuklina E.M., Maksimov A.Y., Krapivina O.A., Parshakova N. S. Extrathymic rearrangement of alphabetaT-lymphocyte antigen receptor genes during pregnancy. *Biochemistry*. 2007. V. 72(9), P. 983–988. doi:10.1134/s000629790709009x.
5. Shirshov, S. V., Nekrasova, I. V., Gorbunova, O. L., & Orlova, E. G. (2017). Hormonal regulation of NK cell cytotoxic activity. *Doklady biological sciences : proceedings of the Academy of Sciences of the USSR, Biological sciences sections*, 472(1), 28–30. <https://doi.org/10.1134/S0012496617010021>.
6. Mori M., Bogdan A., Balassa T., Csabai T., Szekeres-Bartho J. The decidua-the maternal bed embracing the embryo-maintains the pregnancy. *Seminars in immunopathology*, 2016, 38(6), 635–649. <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0574-0>.
7. Saito S., Nakashima A., Myojo-Higuma S., Shiozaki A. The balance between cytotoxic NK cells and regulatory NK cells in human pregnancy. *J. of Reprod. Immunol.* 2008. V. 77(1), P. 14–22. doi: 10.1016/j.jri.2007.04.007.
8. Sun J., Yang M., Ban Y., Gao W., Song B., Wang Y., Zhang Y., Shao Q., Kong B., Qu X. Tim-3 is up regulated in NK cells during early pregnancy and inhibits NK cytotoxicity toward trophoblast in galectin-9 dependent pathway. *PloS one*. 2016. V. 11(1), e0147186. doi: 10.1371/journal.pone.0147186.
9. Lee C.L., Vijayan M., Wang X., Lam K.K.W., Koistinen H., Seppala M., Li R.H.W., Ng, E.H. Y., Yeung, W.S.B., Chiu, P.C.N. Glycodelin-A stimulates the conversion of human peripheral blood CD16-CD56bright NK cell to a decidual NK cell-like phenotype. *Human Reprod.* 2019. V. 34(4), P. 689–701. doi: 10.1093/

humrep/dey378.

10. Cerdeira A.S., Rajakumar A., Royle C.M., Lo A., Husain Z., Thadhani R.I., Sukhatme V.P., Karumanchi S.A., Kopcow H.D. Conversion of peripheral blood NK cells to a decidual NK-like phenotype by a cocktail of defined factors. *J. of immunol.* 2013. V. 190(8), P. 3939–3948. doi: 10.4049/jimmunol.1202582.

11. Xu Y., Zhang H., Huang Y., Rui X., Zheng F. Role of TIM-3 in ovarian cancer. *Clin. & transl. oncol.* 2017. V. 19(9), P. 1079–1083. doi: 10.1007/s12094-017-1656-8.

12. Meggyes M., Miko E., Polgar B., Bogar B., Farkas B., Illes Z., Szereday L. Peripheral blood TIM-3 positive NK and CD8+ T cells throughout pregnancy: TIM-3/galectin-9 interaction and its possible role during pregnancy. *PloS one.* 2014. V. 9(3), e92371. doi: 10.1371/journal.pone.0092371.

13. Du X., Zhu H., Jiao D., Nian Z., Zhang J., Zhou Y., Zheng X., Tong X., Wei H., Fu B. Human-induced CD49a+ NK cells promote fetal growth. *Front. in Immunol.* 2022. V. 13, P. 821542. doi: 10.3389/fimmu.2022.821542.

14. Li H., Hou Y., Zhang S., Zhou Y., Wang D., Tao S., Ni F. CD49a regulates the function of human decidual natural killer cells. *Am. J. of Reprod. Immunol.* 2019. V. 81(4), e13101. doi: 10.1111/aji.13101.

15. Martrus G., Kautz T., Lunemann S., Richert L., Glau L., Salzberger W., Goebels H., Langeneckert A., Hess L., Poch T., Schramm C., Oldhafer K.J., Koch M., Tolosa E., Nashan B., Altfeld M. Proliferative capacity exhibited by human liver-resident CD49a+CD25+NK cells. *PloS one.* 2017. V. 12(8), e0182532. doi: 10.1371/journal.pone.0182532.

16. Reyes R., Cardeñes B., Machado-Pineda Y., Cabañas C. Tetraspanin CD9: a key regulator of cell adhesion in the immune system. *Front. in Immunol.* 2018. V. 9, P. 863. doi: 10.3389/fimmu.2018.00863.

17. Koopman L.A., Kopcow H.D., Rybalov B., Boyson J.E., Orange J.S., Schatz F., Masch R., Lockwood C.J., Schachter A.D., Park P.J., Strominger J.L. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *The J. of exp. medicine.* 2003. V. 198(8), P. 1201–1212. doi: 10.1084/jem.20030305.

18. Fukuhara M., Muto S., Inomata S., Yamaguchi H., Mine H., Takagi H., Ozaki Y., Watanabe M., Inoue T., Yamaura T., Okabe N., Matsumura Y., Hasegawa T., Osugi J., Hoshino M., Higuchi M., Shio Y., Suzuki H. The clinical significance of tertiary lymphoid structure and its relationship with peripheral blood characteristics in patients with surgically resected non-small cell lung cancer: a single-center, retrospective study. *Cancer immunology, 2022, immunotherapy : CII*, 71(5), 1129–1137. <https://doi.org/10.1007/s00262-021-03067-3>.

19. Sánchez-Rodríguez E.N., Nava-Salazar S., Mendoza-Rodríguez C.A., Moran C., Romero-Arauz J.F., Ortega E., Granados J., Cervantes-Peredo A., Cerbón M. Persistence of decidual NK cells and KIR genotypes in healthy pregnant and preeclamptic women: a case-control study in the third trimester of gestation. *Reprod. Boil. and endocrinol.* 2011. V. 9, P. 8. doi: 10.1186/1477-7827-9-8.

20. Moore T., Williams J. M., Becerra-Rodríguez M. A., Dunne M., Kammerer R., Dveksler G. Pregnancy-specific glycoproteins: evolution, expression, functions and disease associations. *Reproduction (Cambridge, England)*, 2022. 163(2), R11–R23. <https://doi.org/10.1530/REP-21-0390>.

21. Wang, W., Zhao, Y., Zhou, X., Sung, N., Chen, L., Zhang, X., Ma, D., Zhu, P., & Kwak-Kim, J. Dynamic changes in regulatory T cells during normal pregnancy, recurrent pregnancy loss, and gestational diabetes. *Journal of reproductive immunology*, 2022, 150, 103492. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2022.103492>

22. Salazar Garcia M. D., Mobley Y., Henson J., Davies M., Skariah A., Dambaeva S., Gilman-Sachs A., Beaman K., Lampley C., & Kwak-Kim J. Early pregnancy immune biomarkers in peripheral blood may predict preeclampsia. *Journal of reproductive immunology*, 2018, 125, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2017.10.048>

23. Yuan J., Li J., Huang S.Y., Sun X. Characterization of the subsets of human NKT-like cells and the expression of Th1/Th2 cytokines in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion. *J. of Reprod. Immunol.* 2015. V. 110, P. 81–88. doi: 10.1016/j.jri.2015.05.001.

24. Tilburgs T., Roelen D.L., van der Mast B.J., de Groot-Swings G.M., Kleijburg C., Scherjon S.A., Claas F.H. Evidence for a selective migration of fetus-specific CD4+CD25bright regulatory T cells from the peripheral blood to the decidua in human pregnancy. *J. of Immunol.* 2008. V. 180(8), P. 5737–5745. doi: 10.4049/jimmunol.180.8.5737.

25. Kim C.J., Romero R., Chaemsaitong P., Kim J.S. Chronic inflammation of the placenta: definition, classification, pathogenesis, and clinical significance. *Am. J. of obstetrics and gynecol.* 2015. V. 213(4), S53–S69. doi: 10.1016/j.ajog.2015.08.041.

26. Pérez Leirós C., Ramhorst R. Tolerance induction at the early maternal-placental interface through selective cell recruitment and targeting by immune polypeptides. *American journal of reproductive immunology* (New York, N.Y. : 1989), 2013, 69(4), 359–368. <https://doi.org/10.1111/aji.12087>

27. Zych M., Roszczyk A., Kniotek M., Dąbrowski F., Zagożdżon R. Differences in immune checkpoints expression (TIM-3 and PD-1) on T cells in women with recurrent miscarriages-preliminary studies. *J. of Clin. Med.* 2021. V. 10(18), P. 4182. doi: 10.3390/jcm10184182.

Authors:

Ekaterina G. Orlova

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS – branch of Perm Federal Research Center
UB RAS

Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher of the Laboratory of Immunoregulation

13 Goleva Perm Russian Federation

Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

Senior Lecturer at the Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Biology

15 Bukireva Perm Russian Federation 614068

orlova_katy@mail.ru

Olga A. Loginova

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS – branch of Perm Federal Research Center
UB RAS

Ph.D. (Biology), Junior Researcher of the Laboratory of Immunoregulation

13 Goleva Perm Russian Federation

jallopukki@ya.ru

Olga L. Gorbunova

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS – branch of Perm Federal Research Center
UB RAS

Ph.D. (Biology), Researcher of the Laboratory of Immunoregulation,

13 Goleva Perm Russian Federation

olia15_77@mail.ru

Nina V. Karimova

LLC “Centralized Clinical and Diagnostic Laboratory”

Head of the Centralized Clinical and Diagnostic Laboratory

1, 4a Serpukhovskaya Perm Russian Federation 614025

Karimova.n@ckdl.ru

Sergey V. Shirshv

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS – branch of Perm Federal Research Center
UB RAS

Doctor of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Immunoregulation

13 Goleva Perm Russian Federation

shirshv@iegm.ru