

МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

УДК 612.018

Н. С. Глебездина^а, И. В. Некрасова^а, А. А. Олина^б, Е. М. Куклина^а

^а Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

^б Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера, Пермь, Россия

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ МЕЛАТОНИНА В КОНТРОЛЕ РАЗВИТИЯ Т-ЛИМФОЦИТОВ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ IL-17 (TH17), В ПЕРИОД ГЕСТАЦИИ

Проведено изучение роли эндогенного мелатонина в регуляции дифференцировки Th17 при беременности. Объектами служили лейкоциты женщин, находящихся в I триместре беременности, а также лейкоциты здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста. Вклад эндогенного мелатонина определяли при культивировании лимфоцитов в присутствии аутологичной сыворотки на фоне блокады мелатонин-зависимых сигналов с использованием ингибитора мембранного мелатонинового рецептора (MT). Методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител устанавливали процент CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих RORγt, и уровень экспрессии на клетках данного транскрипционного фактора, определяемый как средняя интенсивность свечения (MFI) *ex vivo*, а также после 48 ч. культивирования. Выявлены различия в группах беременных и небеременных женщин по степени экспрессии RORγt (MFI). При изучении процента Th17 клеток как *ex vivo*, так и в процессе активации, достоверных отличий между группами не обнаружено. Несмотря на то, что действие мелатонина через поверхностный рецептор MT при исследовании процента CD4⁺RORγt⁺ лимфоцитов выявлено в обеих исследуемых группах, участие данного гормона в регуляции MFI установлено лишь в группе беременных, что может быть связано с вовлечением внутриклеточного рецептора для гормона – RORα.

Ключевые слова: Th17; дифференцировка; Т-лимфоциты; мелатонин; беременность.

N. S. Glebezdina^а, I. V. Nekrasova^а, A. A. Olina^б, E. M. Kuklina^а

^а Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch RAS, Perm, Russian Federation

^б Perm State University of Medicine named after Academician E.A. Wagner, Perm, Russian Federation

STUDY OF THE ROLE OF MELATONIN IN THE CONTROL OF TH17 DEVELOPMENT DURING THE GESTATION PERIOD

The study of the role of endogenous melatonin in the regulation of Th17 differentiation during pregnancy was carried out. The objects of the study were leukocytes of women in the trimester I of pregnancy, as well as leukocytes of healthy non-pregnant women of reproductive age. The influence of endogenous melatonin was determined by culturing lymphocytes in the presence of autologous serum with blockade of melatonin-dependent signals using inhibitor of membrane melatonin receptor (MT). The percentage of CD4 + T-cells expressing RORγt and the expression level of this transcription factor, defined as the Middle Fluorescence Intensity (MFI) *ex vivo*, as well as after 48 hours of culture were studied by flow cytometry using appropriate monoclonal antibodies for surface and intracellular staining. As a result, differences in the groups of pregnant and nonpregnant women according to the level of RORγt expression (MFI) were revealed. Wherein the study of Th17 cells percent both *ex vivo* and in the activation process did not find significant differences between the groups. Despite the fact that the effect of melatonin through surface receptor (MT) were observed in both groups under study percent of CD4⁺RORγt⁺ lymphocytes, the impact of the hormone in the regulation of MFI was found only in pregnant women. It likely to be connected with the involvement of the intracellular receptor for the hormone - RORα.

Key words: Th17; differentiation; T lymphocytes; melatonin; pregnancy.

Введение

Эпифизарный гормон мелатонин вовлечен в контроль многих физиологических функций организма, в том числе процессов репродукции. В пе-

риод гестации мелатонин активно синтезируется также яичниками и плацентой [Reiter et al., 2013]. Сывороточная концентрация гормона последовательно нарастает в ходе гестации [Tamura et al., 2008]. Показана значимая роль мелатонина в ус-

пешном развитии беременности, прежде всего, как эффективного антиоксиданта, защищающего от окислительного повреждения плод и плаценту [Tamura et al., 2008; Lanoix, Guerin, Vaillancourt, 2012; Reiter et al., 2013; Wang et al., 2013]. За счет высокой антиоксидантной активности он рассматривается в настоящее время как перспективный препарат для предупреждения ряда осложнений в развитии беременности, в частности, преэклампсии [Hobson et al., 2013]. В то же время, гормон способен эффективно регулировать функции клеток иммунной системы, в первую очередь – CD4⁺ Т-лимфоцитов, продуцирующих IL-17 (Th17), поскольку один из двух ключевых факторов дифференцировки Th17, ROR α , служит одновременно одним из рецепторов для мелатонина [Куклина, Глебздина, Некрасова, 2015]. Стоит отметить, что Т-клеточная субпопуляция Th17, несмотря на сравнительно небольшую численность, играет принципиальную роль в защите организма от экстраклеточных патогенов, напрямую участвует в развитии воспаления, а также в индукции аутоиммунных патологий [Jadidi-Niaragh, Mirshafiey, 2008]. Однако при беременности гиперактивация Th17 может приводить к «срыву» периферической толерантности материнского организма к генетически чужеродному (полуаллогенному) плоду и, как следствие, к аборту [Liu et al., 2011; Wu et al., 2014]. Учитывая ключевую роль субпопуляции Th17 в развитии беременности, ее регуляция мелатонином в этот период представляет особый интерес.

Цель настоящей работы – оценка роли эндогенного мелатонина в регуляции дифференцировки Th17 при беременности.

Материал и методы исследования

Объектами исследования служили лейкоциты женщин, находящихся в I триместре беременности (средний возраст 28.00 ± 5.29 лет, $n = 10$), как наиболее критичном в плане индукции спонтанных аборт, а также лейкоциты здоровых неберемен-

ных женщин репродуктивного возраста (средний возраст 31.80 ± 6.43 лет, $n = 10$). В работе использовали суспензию мононуклеарных клеток периферической крови, выделенных центрифугированием в градиенте плотности фикола-верографина (1.077 г/см^3), и фракционированные методом иммуномагнитной сепарации («R&D Systems», США) CD4⁺ Т-лимфоциты на фоне стандартной поликлональной активации (анти-CD3/CD28, «Invitrogen», США). Вклад эндогенного мелатонина определяли при культивировании лимфоцитов в присутствии аутологичной сыворотки на фоне блокады мелатонин-зависимых сигналов с использованием лузидола («R&D Systems», США) – ингибитора мембранного мелатонинового рецептора (MT). Уровень CD4⁺ROR γ ⁺ Т-лимфоцитов оценивали как *ex vivo*, так и после 48 ч. культивирования методом проточной цитометрии с использованием соответствующих моноклональных антител для поверхностного и внутриклеточного окрашивания («Novus Biologicals», США). При этом устанавливали процент CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих ROR γ , и уровень экспрессии на клетках данного транскрипционного фактора, определяемый как средняя интенсивность свечения (Middle Fluorescence Intensity, MFI; условные единицы). Для контроля неспецифического связывания и выделения негативного по флюоресценции лимфоцитарного окна использовали соответствующие изотипические контроли. Жизнеспособность лимфоцитов, определяемая в тесте с эозином после 48 ч. культивирования, составляла 95–98%. Статистический анализ проводили с использованием парного и непарного t-критерия Стьюдента, непараметрических критериев Вилкоксона и Манн-Уитни.

Результаты и их обсуждение

Показано, что уровень CD4⁺ROR γ ⁺ Т-клеток, оцениваемый *ex vivo*, не отличался в группах беременных I триместра и небеременных женщин. При этом обнаружены достоверные отличия между группами по MFI (таблица).

Изменение процентного содержания и MFI Th17-лимфоцитов в условиях активации и ингибирования

Экспериментальные условия		Небеременные женщины	Женщины, находящиеся в I триместре беременности
Процент CD4 ⁺ ROR γ ⁺ Т-клеток	<i>Ex vivo</i>	1.48±0.09	1.63±0.20
	Культура 48 ч.	2.55±0.18 ^b	2.84±0.36 ^b
	Культура 48 ч. + ингибитор	1.60±0.18 ^c	1.19±0.17 ^c
MFI, у.е.	<i>Ex vivo</i>	20.37±0.91	26.63±2.63 ^a
	Культура 48 ч.	26.24±1.04 ^b	21.25±0.89 ^{ab}
	Культура 48 ч. + ингибитор	28.07±1.72 ^b	23.89±1.32 ^c

Примечание. а – $p < 0.05$ по сравнению с небеременными; б – $p < 0.05$ по сравнению с *ex vivo*; в – $p < 0.05$ по сравнению с 48-часовой активацией.

По результатам 48-часовой активации в присутствии аутологичной сыворотки установлено повышение процента CD4⁺ROR γ ⁺ Т-клеток как у небеременных женщин, так и в группе

беременных женщин, так и в группе беременных. При этом уровень экспрессии ROR γ в CD4⁺ Т-лимфоцитах в группе небеременных также возрас-

тал, а в группе беременных наоборот снижался (таблица).

На фоне блокады мелатонин-зависимых сигналов процент CD4+ROR γ t⁺ Т-клеток снижался практически до уровня, сравнимого с исходным (*ex vivo*). Степень экспрессии ROR γ t в CD4⁺ Т-лимфоцитах беременных женщин при внесении ингибитора наоборот возрастала. В то же время в группе небеременных интенсивность свечения ROR γ t осталась практически неизменной (таблица).

Таким образом, хотя процент Th17 клеток у женщин, находящихся в I триместре беременности, и небеременных женщин не отличался как *ex vivo*, так и после 48-часовой активации при исследовании такого показателя, как MFI ROR γ t, выявлены интересные различия. Так, при активации Т-лимфоцитов в группе небеременных MFI растет параллельно с увеличением процента CD4+ROR γ t⁺ клеток, а в группе беременных снижается.

Несмотря на то, что действие мелатонина через поверхностный рецептор MT при исследовании процента CD4+ROR γ t⁺ лимфоцитов выявлено в обеих исследуемых группах, участие данного гормона в регуляции MFI установлено лишь в группе беременных, т.к. под действием лизиндола степень экспрессии ROR γ t в группе небеременных не менялась. Вероятно, это может быть связано с вовлечением внутриклеточного рецептора для гормона – ROR α .

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

Библиографический список

- Куклина Е.М., Глебездина Н.С., Некрасова И.В. Роль мелатонина в контроле дифференцировки Т-лимфоцитов, продуцирующих IL-17 (Th17) // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015. Т. 160, № 11. С. 604–607.
- Hobson S.R. et al. Phase I pilot clinical trial of antenatal maternally administered melatonin to decrease the level of oxidative stress in human pregnancies affected by pre-eclampsia (PAMPR): study protocol // *British Medical Journal Open*. 2013. Vol. 3 (9). e003788.
- Jadidi-Niaragh F., Mirshafiey A. Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis // *Scandinavian Journal of Immunology*. 2011. Vol. 74 (1). P. 1–13.
- Lanoix D., Guerin P., Vaillancourt C. Placental melatonin production and melatonin receptor expression are altered in preeclampsia: new insights into the role of this hormone in pregnancy // *Journal of Pineal Research*. 2012. Vol. 53 (4). P. 417–425.
- Liu Y.S. et al. Study on the relationship between Th17 cells and unexplained recurrent spontaneous abortion // *American Journal of Reproductive Immunology*. 2011. Vol. 65 (5). P. 503–511.
- Reiter R.J. et al. The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives // *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*. 2013. Vol. 13 (3). P. 373–384.
- Tamura H. et al. Melatonin and pregnancy in the human // *Reproductive Toxicology*. 2008. Vol. 25 (3). P. 291–303.
- Wang F.W. et al. Protective effect of melatonin on bone marrow mesenchymal stem cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis in vitro // *Journal of Cellular Biochemistry*. 2013. Vol. 114 (10). P. 2346–2355.
- Wu L. et al. Alteration of Th17 and Treg cells in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion before and after lymphocyte immunization therapy // *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2014. Vol. 12. P. 74.

References

- Kuklina E.M., Glebezina N.S., Nekrasova I.V. [Role of Melatonin in the Regulation of Differentiation of T Cells Producing Interleukin-17 (Th17)]. *Bulleten' ėksperimental'noj biologii i mediciny*. V. 160. N. 5 (2016): pp. 656-658. (In Russ.).
- Hobson S.R., Lim R., Gardiner E.E., Alers N.O., Wallace E.M. Phase I pilot clinical trial of antenatal maternally administered melatonin to decrease the level of oxidative stress in human pregnancies affected by pre-eclampsia (PAMPR): study protocol. *British Medical Journal Open*. V. 3, N. 9 (2013): e003788.
- Jadidi-Niaragh F., Mirshafiey A. Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. *Scandinavian Journal of Immunology*. V. 74. N. 1 (2011): pp. 1-13.
- Lanoix D., Guerin P., Vaillancourt C. Placental melatonin production and melatonin receptor expression are altered in preeclampsia: new insights into the role of this hormone in pregnancy. *Journal of Pineal Research*. V. 53. N. 4 (2012): pp. 417-425.
- Liu Y.S., Wu L., Tong X.H., Wu L.M., He G.P., Zhou G.X., Luo L.H., Luan H.B. Study on the relationship between Th17 cells and unexplained recurrent spontaneous abortion. *American Journal of Reproductive Immunology*. V. 65. N. 5 (2011): pp. 503-511.
- Reiter R.J., Tan D.X., Rosales-Corral S., Manchester L.C. The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*. V. 13. N. 3 (2013): pp. 373-384.
- Tamura H., Nakamura Y., Terron M.P., Flores L.J., Manchester L.C., Tan D.X., Sugino N., Reiter

- R.J. Melatonin and pregnancy in the human. *Reproductive Toxicology*. V. 25. N. 3 (2008): pp. 291-303.
- Wang F.W., Wang Z., Zhang Y.M., Du Z.X., Zhang X.L., Liu Q., Guo Y.J., Li X.G., Hao A.J. Protective effect of melatonin on bone marrow mesenchymal stem cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*. V. 114. N. 10 (2013): pp. 2346-2355.
- Wu L., Luo L.H., Zhang Y.X., Li Q., Xu B., Zhou G.X., Luan H.B., Liu Y.S. Alteration of Th17 and Treg cells in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion before and after lymphocyte immunization therapy. *Reproductive Biology and Endocrinology*. V. 12 (2014): p. 74.

Поступила в редакцию 05.09.2016

Об авторах

Глебездина Наталья Сергеевна, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН
614081, Пермь, ул. Голева, 13;
glebezdina_n@mail.ru; (342)2808431

Некрасова Ирина Валерьевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН
614081, Пермь, ул. Голева, 13; nirina5@mail.ru

Олина Анна Александровна, доктор медицинских наук, профессор, доцент кафедры акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» МЗ РФ
614000, г. Пермь, ул. Екатерининская, 85;
olina29@mail.ru; (342)2364472

Куклина Елена Михайловна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН
614081, Пермь, ул. Голева, 13; ibis_07@mail.ru

About the authors

Glebezdina Natalya Sergeevna, candidate of biology, junior researcher of laboratory immunoregulation
Institute of Ecology and Genetics of Microorganism UB RAS. 13, Golev str., Perm, Russia, 614081; glebezdina_n@mail.ru; (342)2808431

Nekrasova Irina Valeryevna, candidate of biology, researcher of laboratory immunoregulation
Institute of Ecology and Genetics of Microorganism UB RAS. 13, Golev str., Perm, Russia, 614081; nirina5@mail.ru

Olina Anna Alexandrovna, doctor of medical sciences, professor, associate professor, of the Department of Obstetrics and Gynecology Perm State Medical University after E. A. Wagner.
85, Ekaterininskaya str., Perm Russia, 614081; olina29@mail.ru; (342)2364472

Kuklina Elena Michajlovna, doctor of biology, leading researcher of laboratory immunoregulation
Institute of Ecology and Genetics of Microorganism UB RAS. 13, Golev str., Perm, Russia, 614081; ibis_07@mail.ru