
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛ TIM-3 И CD9 НА НАТУРАЛЬНЫХ КИЛЛЕРАХ
(NK) И Т-ЛИМФОЦИТАХ С ФУНКЦИЯМИ NK (NKT) ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ
КРОВИ В РАЗНЫЕ СРОКИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕРЕМЕННОСТИ**

© 2023 г. Е. Г. Орлова^{1, *}, О. А. Логинова¹,
О. Л. Горбунова¹, Н. В. Каримова², С. В. Ширшев¹

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

²ООО Централизованная клинико-диагностическая лаборатория, Пермь, Россия

*E-mail: orlova_katy@mail.ru

Поступила в редакцию 06.03.2023 г.

После доработки 21.03.2023 г.

Принята к публикации 22.03.2023 г.

При физиологически протекающей беременности натуральные киллеры (NK) и Т-лимфоциты с функциями NK (NKT) являются ведущими эффекторами иммунной толерантности организма матери к полуаллогенному плоду, а также выполняют фетотрофическую функцию. Молекулы Tim-3 (T-cell Ig and mucin domain-containing protein 3) и CD9 играют критическую роль в реализации иммунорегуляторной и фетотрофической функций NK и NKT, однако их экспрессия на клетках периферической крови не изучена. Цель работы – исследовать экспрессию Tim-3, CD9 на субпопуляциях NK и NKT периферической крови в разные сроки физиологически протекающей беременности. Объектом исследования являлась периферическая кровь условно-здоровых женщин в I и III триместрах физиологически протекающей беременности. Группу сравнения составили условно-здоровые небеременные женщины в I фазе менструального цикла. Экспрессию молекул Tim-3, CD9 анализировали методом проточной цитофлуориметрии на регуляторных NK (CD16[–]CD56^{bright}) и NKT (CD16[–]CD56⁺), цитотоксических NK (CD16⁺CD56^{dim/–}) и NKT (CD16⁺CD56⁺). Установлено, что в I триместре беременности количество и соотношение регуляторных и цитотоксических NK и NKT не менялось. Экспрессия Tim-3 увеличивалась на всех субпопуляциях NK и NKT за исключением цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK. Экспрессия CD9 возрастала на всех субпопуляциях NK, а на NKT не отличалась от небеременных. При этом на регуляторных NK и NKT в I триместре беременности выявлена прямая корреляция экспрессии CD9 и Tim-3. В III триместре количество регуляторных CD16[–]CD56^{bright}NK увеличивалось, а цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK и регуляторных CD16[–]CD56⁺NKT снижалось по сравнению с небеременными. Количество CD16⁺CD56[–]NK не менялось по триместрам беременности. Экспрессия Tim-3 усиливалась на всех субпопуляциях NK и цитотоксических NKT, а CD9 повышалась только на регуляторных NK. Таким образом, экспрессия молекул Tim-3 и CD9 на разных субпопуляциях NK и NKT менялась по триместрам, что играет важную роль в регуляции их фенотипа и функций при беременности.

Ключевые слова: натуральные киллеры, Т-лимфоциты с функциями натуральных киллеров, Tim-3, CD9, беременность

DOI: 10.31857/S0869813923050072, EDN: XRCARE

ВВЕДЕНИЕ

Натуральные киллеры (NK) и Т-лимфоциты с функциями NK (NKT) при беременности играют критическую роль в формировании иммунной толерантности организма матери к полуаллогенному плоду, а также выполняют фетотрофическую функцию [1, 2]. NK-клетки относятся к эффекторам врожденного иммунитета [1, 2]. Более 90% NK периферической крови имеют фенотип $CD16^+CD56^{dim}$ и обладают высокой цитотоксической активностью в отношении опухолевых и вирус-инфицированных клеток [1, 3]. И лишь около 10% от общего числа NK-клеток имеют регуляторный фенотип $CD16^-CD56^{bright}$, основной функцией которых является продукция широкого спектра цитокинов [1, 3]. При беременности изменение гормонального фона индуцирует трансформацию фенотипа NK периферической крови с цитотоксического на регуляторный и миграцию $CD16^-CD56^{bright}$ NK в матку, где они становятся доминирующей лимфоидной популяцией, о чем свидетельствует сходный паттерн хемокиновых рецепторов периферических и децидуальных $CD16^-CD56^{bright}$ NK [1, 3]. Количество $CD16^+CD56^{dim}$ NK периферической крови, их цитотоксический потенциал, продукция интерферона-гамма (IFN- γ) при беременности снижаются, но увеличивается число интерлейкин (IL)-10-продуцирующих NK, что особенно выражено в I триместре беременности [4]. Повышенное содержание цитотоксических $CD16^+CD56^{dim}$ NK в периферической крови у женщин ассоциировано с нарушением фертильности и спонтанными абортами [1, 3]. Исследования последних лет показали, что в периферической крови присутствует также субпопуляция цитотоксических истощенных $CD16^+CD56^-$ NK, которая характеризуется сниженной цитолитической и секреторной активностью [5–7]. Содержание $CD16^+CD56^-$ NK увеличивается при тяжелых вирусных инфекциях и связано со снижением противовирусной защиты, однако изменения их количества и функций при физиологической беременности не изучены [5–7].

В ранние сроки беременности количество децидуальных NK увеличивается до 70–90% от общего числа лимфоцитов в матке [8, 9]. Децидуальные NK продуцируют ангиогенные факторы (VEGF, PLGF), моделируют рост спиральных артерий, инвазию трофобласта, формирование иммунной толерантности в зоне фето-плацентарного контакта [1, 2, 10]. Секретируя иммуносупрессорные цитокины – IL-10, трансформирующий фактор роста (TGF- β), децидуальные NK индуцируют формирование адаптивных Т-регуляторных клеток (aTreg) из наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитов, которые за счет контактных взаимодействий и продукции IL-10, TGF- β бета подавляют цитотоксические реакции против трофобласта [1, 2, 10, 11].

Децидуальные $CD56^{bright}CD16^-$ NK отличаются от периферических регуляторных $CD56^{bright}CD16^-$ NK высокой экспрессией молекул Tim-3 и CD9, которые регулируют цитотоксическую и миграционную активность, продукцию ангиогенных факторов [8, 9, 12–19]. “Check-point” молекула Tim-3 (T-cell Ig and mucin domain-containing protein 3) присутствует на большинстве лимфоидных клеток, однако NK обладают наибольшей экспрессией Tim-3, которая повышается при их трансформации в децидуальные [13, 14]. Экспрессия Tim-3 усиливается в ответ на активацию клеток и ограничивает продукцию провоспалительных цитокинов, дегрануля-

Список используемых сокращений: Gal-9 – галектин-9; GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; IL – интерлейкин; INF – интерферон; NK – натуральные киллеры; NKT – Т-лимфоциты с функциями натуральных киллеров; PLGF – плацентарный фактор роста; PSG – гликопротеины, специфичные для беременности; TCR – Т-клеточный рецептор; TGF – трансформирующий фактор роста; Tim-3 – иммуноглобулиновый и муциновый домен Т-клеток; TNF – фактор некроза опухоли; Treg – регуляторные Т-клетки; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; БСА – бычий сывороточный альбумин; МПК – мононуклеарные клетки периферической крови; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота.

цию, цитотоксичность, повышает чувствительность к индуцированному апоптозу [15, 16]. Лигандом для Tim-3 является галектин-9 (Gal-9), уровень которого в периферической крови нарастает при беременности [14], поскольку Gal-9 активно продуцируется клетками трофобласта, Treg [17]. Молекула CD9 относится к семейству тетраспонинов и регулирует адгезию и трансэндотелиальную миграцию лейкоцитов, а также экспрессию и активность других адгезионных молекул [19, 20]. Экспрессия CD9 изучена на децидуальных NK, но лишь в единичных исследованиях выявлена на NK и других популяциях лимфоцитов периферической крови при беременности [20, 21]. Лигандами для CD9, в том числе, являются продуцируемые клетками трофобласта ассоциированные с беременностью гликопротеины (“pregnancy specific glycoproteins”, PSG), концентрация которых нарастает в периферической крови пропорционально сроку беременности [22]. Взаимодействие CD9 с PSG регулирует продукцию цитокинов лейкоцитами в матке [22]. Все вышесказанное подтверждает значимость молекул Tim-3 и CD9 для контроля функций NK, однако их экспрессия разными популяциями NK периферической крови при беременности не исследована.

NKT представляют гетерогенную минорную популяцию Т-лимфоцитов периферической крови, выделение которой основано на экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) и молекул NK клеток – CD56, CD16 [23–25]. К NKT относятся как инвариантные (i) NKT, экспрессирующие инвариантный TCR и распознающие гликолипидные антигены, ассоциированные с молекулой CD1d, которая высоко экспрессируется клетками трофобласта, так и NKT-подобные клетки, включающие CD1d-независимые $\alpha\beta$ TCR Т-лимфоциты [26]. Критическая роль NKT в регуляции иммунореактивности определяется способностью к быстрой и массивной продукции цитокинов (INF-gamma, TNF-alpha, IL-4, IL-10), направляющих развития иммунного ответа по клеточно-опосредованному или гуморальному типу [25–27]. Известно, что в ранние сроки физиологической беременности меняется субпопуляционный состав и количество NKT в периферической крови [25, 28]. Выявлено повышение экспрессии активационного маркера CD69, продукции IL-4 и, напротив, снижение цитотоксичности и секреции INF-gamma [28–30]. Избыточное количество NKT и продукция INF-gamma в периферической крови в ранние сроки беременности приводит к спонтанным абортam [25, 31, 32]. NKT не присутствуют в эндометрии вне беременности [33], но в I триместре количество CD56⁺CD16[–] NKT в матке значительно увеличивается [29], а к родам снижается [32]. В зоне фето-плацентарного контакта NKT выполняют фетотрофическую и регуляторную функцию, продуцируют INF-gamma и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), стимулируют рост спиральных артерий и развитие децидуальных макрофагов, пролиферацию децидуальных NK *in situ*, подавляют клеточноопосредованные реакции [29]. Возможность миграции CD56⁺CD16[–] NKT периферической крови в матку при беременности остается не изученной. Развитие NKT происходит в тимусе, продуктивная функция которого снижается при беременности вследствие стероид-индуцированной инволюции. В единичных работах показана экспрессия Tim-3 [17, 34], CD9 [35] на NKT периферической крови, однако их роль в изменении фенотипа и функций NKT при беременности не исследована.

При физиологической беременности иммунореактивность организма матери меняется по триместрам [36]. Первый триместр характеризуется наибольшей частотой спонтанных абортов, что связано с началом экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости клетками трофобласта и “лютео-плацентарной сменой” [37]. В третьем триместре изменения иммунореактивности организма матери связаны с подготовкой к родам. Все высказанное подтверждает значимость и актуальность изучения трансформации фенотипа эффекторов иммунной толеран-

Таблица 1. Клиническая и демографическая характеристика участников исследования

Исследуемые группы	<i>n</i>	Возраст	Срок беременности, недель
Небеременные женщины	10	26 (21–29)	—
Беременные, I триместр	12	26 (22–32)	12 (10–12)
Беременные, III триместр	12	30 (28–31)	30 (28–31)

Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха, Me(Q1–Q3); *n* – количество проведенных исследований.

рантности по триместрам беременности. Цель работы – изучить экспрессию Tim-3 и CD9 на регуляторных и цитотоксических субпопуляциях NK, NKT периферической крови женщин в I и III триместрах физиологически протекающей беременности.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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 патологий беременности в прошлом и настоящем; 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. Клиническая и демографическая характеристика участников исследования представлена в табл. 1. Исследуемые группы не отличались по возрастному составу.

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 (РВМС) выделяли методом седиментации в градиенте плотности фиколл-урографина (1.077 г/см³) по стандартной методике [38]. Затем РВМС дважды отмывали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), содержащем 2 мМ ЭДТА и 0.1% бычьего сывороточного альбумина (БСА). Фенотип клеток (1×10^6 клеток в пробе) анализировали методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре “CytoFlex 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 рис. 1. В гейте РВМС оценивали: общее количество (total) NK-клеток как процент CD56⁺-клеток в гейте CD3/CD14/CD19-негативных мононуклеаров [39]. Субпопуляции NK определяли по коэкспрессии молекул CD56 и CD16 в гейте CD3/CD14/CD19 негативных мононуклеаров: регуляторные (regulatory) NK – CD16[–]CD56^{bright}, цитотоксические (cytotoxic) NK – CD16⁺CD56^{dim} и CD16⁺CD56[–] [17]. Общее количество (total) NKT оценивали как процент CD56⁺-клеток в гейте

Таблица 2. Характеристика моноклональных антител

Моноклональные антитела	Флюорохром	Клон	Изотип	Компания-производитель
Live/Dead	Zombie UV™			BioLegend
CD3	APC/Cy7	UCHT1	Mouse/IgG1, κ	BioLegend
CD14	PE	M5E2	Mouse/IgG2a, κ	BioLegend
CD19	PE	H1B19	Mouse/IgG1, κ	BioLegend
CD56 (NCAM)	Brilliant Violet 605™	HCD56	Mouse/IgG1, κ	BioLegend
CD16	FITC	3G8	Mouse/IgG1, κ	BioLegend
Tim-3 (CD366)	APC	F38-2E2	Mouse/IgG1, κ	BioLegend
CD9	PerCP/Cyanine5.5	HI9a	Mouse/IgG1, κ	BioLegend
Изотипический контроль	APC	MOPC-21	Mouse/IgG1, κ	BioLegend
Изотипический контроль	PerCP/Cyanine5.5	MOPC-21	Mouse/IgG1, κ	BioLegend

Примечание: страна-производитель всех моноклональных антител – США.

CD3⁺-лимфоцитов; регуляторные NKT – как процент CD16⁺CD56⁺, а цитотоксические NKT – как процент CD16⁺CD56⁺-клеток в гейте CD3⁺лимфоцитов (рис. 1) [40]. Экспрессию молекул Tim-3, CD9 изучали на разных субпопуляциях NK и NKT (рис. 1).

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 Бонферрони. Данные в рисунках представлены в виде среднего значения (*Mean*) и стандартной ошибки среднего (*SEM*).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия Tim-3, CD9 на NK периферической крови в I и III триместрах беременности

Установлено, что общее число NK-клеток периферической крови в I триместре беременности не менялось, а в III триместре снижалось по сравнению с небеременными женщинами (рис. 2а). Анализ субпопуляционного состава NK периферической крови показывает, что уменьшение общего числа NK-клеток связано со снижением количества цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK в III триместре беременности. Следует отметить, что цитотоксические CD16⁺CD56^{dim}NK преобладают среди NK периферической крови [9]. При этом количество цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK в III триместре снижалось и по сравнению с небеременными и с I триместром. Показано, что среди цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK присутствует субпопуляция CD16⁺CD56[–]NK (рис. 1а, 2а), которая характеризуется как цитотоксические истощенные NK со сниженной функциональной активностью [5–7]. Процент CD16⁺CD56[–]NK достоверно не изменялся по триместрам бере-

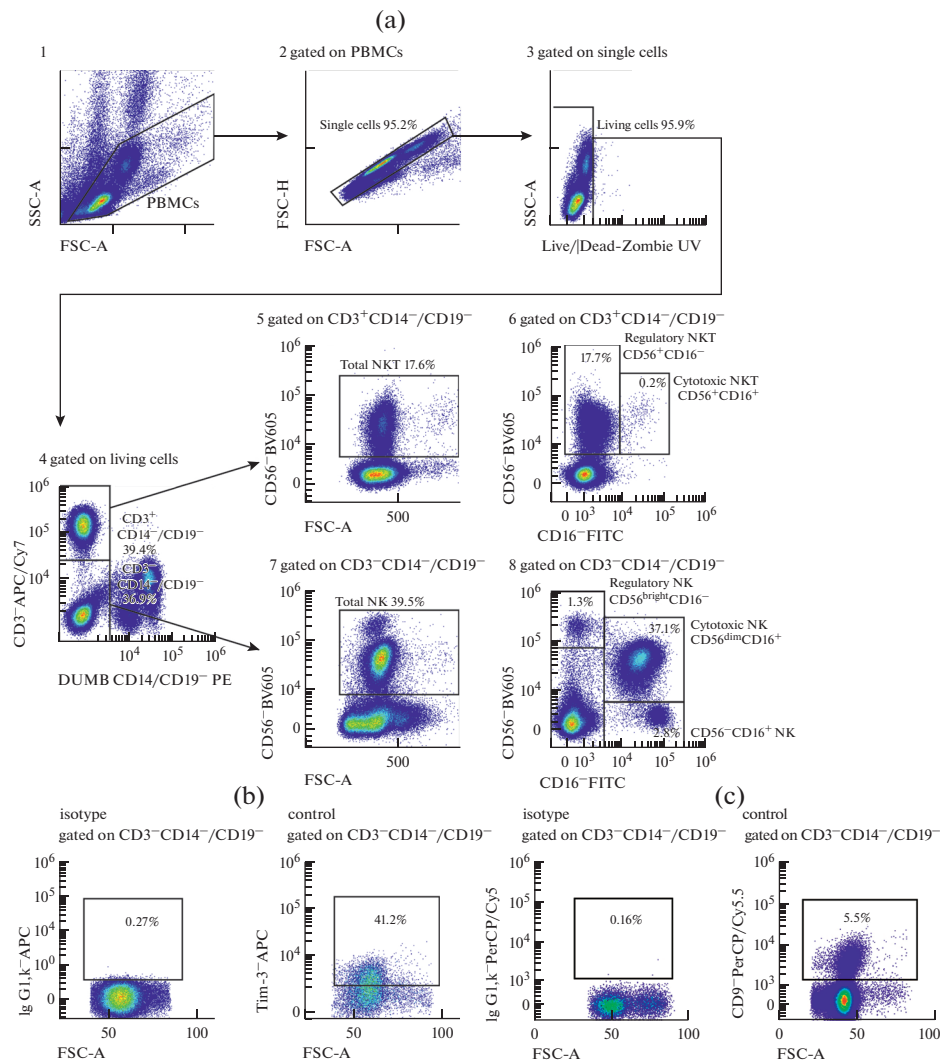


Рис. 1. Стратегия гейтирования NK и NKT периферической крови. (a) 1 – выделение гейта PBMC по параметрам площади прямого (FSC-A) и высоты бокового (SSC-H) светорассеивания; 2 – дискриминация слипшихся клеток (дуплетов) по параметрам площади и высоты прямого светорассеивания (FSC-A/FSC-H); 3 – определение живых клеток LIVE/DEAD-ZOMBIE UV окрашиванием, 4 – выделение популяций $CD3^-$ и $CD3^+$ -клеток в PBMC гейте, 5 – определение общего количества (total) NKT как процента $CD56^+$ -клеток в гейте $CD3^+$ -лимфоцитов; 6 – выделение регуляторной субпопуляции (regulatory) NKT как процента $CD16^-CD56^+$ и цитотоксической субпопуляции (cytotoxic) NKT как процента $CD16^+CD56^+$ клеток в гейте $CD3^+$ -лимфоцитов; 7 – определение общего количества (total) NK как процента $CD56^+$ -клеток в гейте $CD3/CD14/CD19$ -негативных PBMC; 8 – определение регуляторной субпопуляции (regulatory) NK как процента $CD16^-CD56^{bright}$ и цитотоксических субпопуляций (cytotoxic) NK как процента $CD16^+CD56^{dim}$ и $CD16^+CD56^-$ в гейте $CD3/CD14/CD19$ -негативных PBMC; (b, c) – оценка неспецифического связывания с использованием соответствующих изотипических MKA (isotype) для определения уровня экспрессии молекул Tim-3, CD9. На рис. 1 представлены гистограммы одного репрезентативного эксперимента.

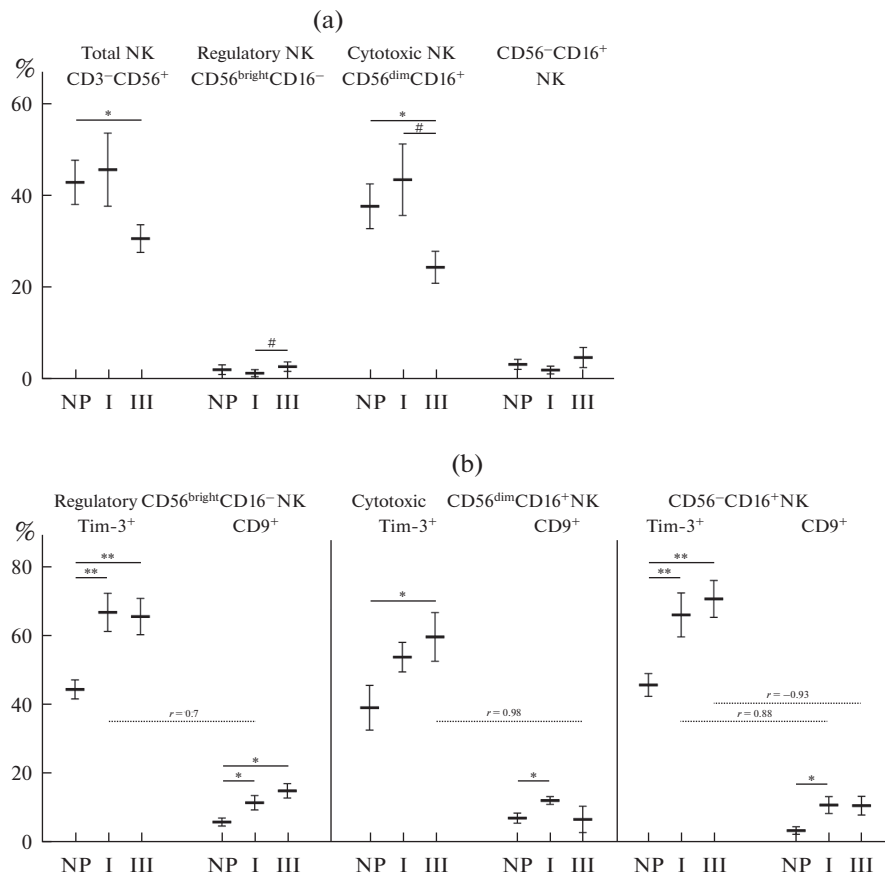


Рис. 2. Оценка (а) общего количества (total) NK (CD3⁺CD56⁺) и субпопуляций NK: цитотоксической (cytotoxic) (CD16⁺CD56^{dim}NK), регуляторной (regulatory) (CD16⁻CD56^{bright}NK) и CD16⁺CD56⁻NK. (б) — оценка экспрессия молекул Tim-3, CD9 на цитотоксических (cytotoxic) (CD16⁺CD56^{dim}NK), регуляторных (regulatory) (CD16⁻CD56^{bright} NK) и CD16⁺CD56⁻NK в I и III триместрах беременности. *Примечание:* На рис. 2а и 2б данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартной ошибки среднего ($Mean \pm SEM$); 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); # $p < 0.05$ по отношению к I триместру, r — коэффициент корреляции Пирсона.

менности (рис. 2а). Количество регуляторных CD16⁻CD56^{bright}NK в I триместре не отличалось от небеременных, но в III триместре их процент увеличивался по сравнению с I триместром (рис. 2а).

Экспрессия Tim-3 усиливалась в I триместре на регуляторных CD16⁻CD56^{bright}NK, цитотоксических истощенных CD16⁺CD56⁻NK и цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK, но на последних недостоверно (рис. 2б), тогда как в III триместре экспрессия Tim-3 была повышена на всех субпопуляциях NK по сравнению с небеременными.

Экспрессия CD9 также менялась по триместрам беременности. Процент регуляторных CD9-позитивных CD16⁻CD56^{bright}NK был выше и в I, и в III триместрах по

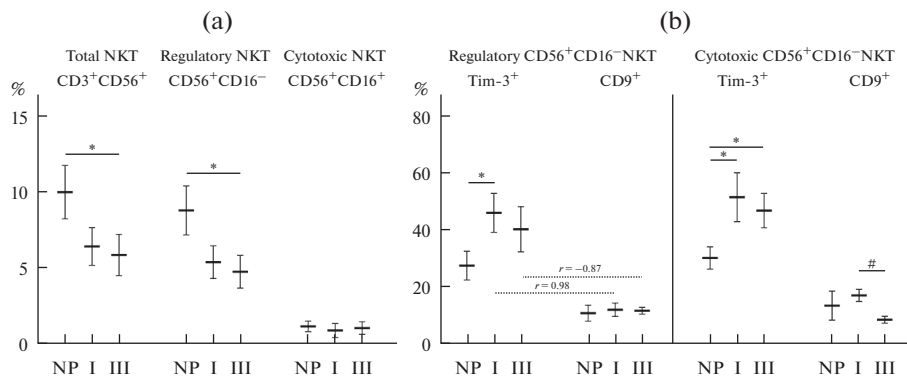


Рис. 3. Оценка (а) общего количества (total) NKT (CD3⁺CD56⁺) и субпопуляций NKT: цитотоксической (cytotoxic) (CD16⁺CD56⁺ NKT), регуляторной (regulatory) (CD16⁻CD56⁺ NKT). (б) – оценка экспрессия молекул Tim-3, CD9 на цитотоксических (cytotoxic) (CD16⁺CD56⁺ NKT), регуляторных (regulatory) (CD16⁻CD56⁺ NKT) в I и III триместрах беременности. *Примечание:* На рис. 3а и 3б данные представлены в виде среднего ± стандартной ошибки среднего (Mean ± SEM); 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); # $p < 0.05$ по отношению к I триместру, r – коэффициент корреляции Пирсона.

сравнению с небеременными (рис. 2б). На цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK и CD16⁺CD56⁻NK экспрессия CD9 была повышена в I триместре по сравнению с небеременными (рис. 3а, б). В III триместре экспрессия CD9 на цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK снижалась по сравнению с I триместром, а на CD16⁺CD56⁻NK сохранялась повышенной, хотя и не отличалась достоверно от небеременных.

По данным корреляционного анализа экспрессия CD9 прямо коррелировала с присутствием Tim-3 на регуляторных CD16⁻CD56^{bright}NK ($r = 0.7$; $p < 0.05$) и цитотоксических истощенных CD16⁺CD56⁻NK ($r = 0.88$; $p < 0.05$) у беременных в I триместре. Выявленная корреляция свидетельствует о возможной взаимосвязи экспрессии этих молекул для субпопуляций NK с низкой цитотоксической активностью. А в III триместре экспрессия CD9 имела обратную зависимость с присутствием Tim-3 на цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK ($r = -0.98$; $p < 0.05$) и цитотоксических истощенных CD16⁺CD56⁻NK ($r = -0.93$; $p < 0.05$), что, по-видимому, связано с ограничением миграционной активности Tim-3⁺ цитотоксических NK.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что в ранние сроки беременности увеличивается экспрессия молекул Tim-3, CD9 на цитотоксических и регуляторных NK периферической крови, тогда как их общее количество и соотношение не изменяется. В поздние сроки беременности общее количество NK снижается за счет уменьшения числа цитотоксических клеток, а процент регуляторных NK увеличивается, как и экспрессия CD9 на них. Экспрессия Tim-3 остается повышенной и на цитотоксических, и на регуляторных NK.

Экспрессия Tim-3, CD9 на NKT периферической крови в I и III триместрах беременности

Общее количество CD56⁺NKT в I триместре не отличалось от небеременных, а в III триместре процент CD56⁺NKT достоверно снижался (рис. 3а). Число регуля-

торных CD16⁻CD56⁺NKT изменялось аналогично общему количеству NKT (рис. 3а). Следует отметить, что в отличие от НК, в популяции NKT периферической крови преобладают регуляторные CD16⁻CD56⁺NKT. Количество цитотоксических CD16⁺CD56⁺NKT было сравнимо с небеременными и в I, и в III триместрах беременности (рис. 3а).

Экспрессия Tim-3 увеличивалась в I триместре на цитотоксических CD16⁺CD56⁺NKT и на регуляторных CD16⁻CD56⁺NKT, а в III триместре беременности только на цитотоксических CD16⁺CD56⁺NKT (рис. 3б). Экспрессия CD9 как на регуляторных CD16⁻CD56⁺NKT, так и на цитотоксических CD16⁺CD56⁺NKT не отличалась от небеременных, но в III триместре она снижалась на цитотоксических CD16⁺CD56⁺NKT по сравнению с I триместром (рис. 3б). При этом в I триместре беременности экспрессия CD9 прямо коррелировала с количеством Tim-3 на регуляторных CD16⁻CD56⁺NKT ($r = 0.98$; $p < 0.05$), однако в III триместре, напротив, была выявлена обратная зависимость ($r = -0.87$; $p < 0.05$).

Таким образом, в I триместре беременности количество и соотношение разных субпопуляций NKT не изменялись, а экспрессия Tim-3 усиливалась на всех субпопуляциях NKT. В III триместре беременности общее количество NKT уменьшалось за счет снижения процента регуляторных NKT, а процент цитотоксических NKT не изменялся, но экспрессия Tim-3 на них увеличивалась.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При физиологически протекающей беременности количество и функциональная активность НК и NKT периферической крови существенно меняются, что обусловлено изменением гормонально-цитокинового фона и необходимо для изменения иммунореактивности организма матери с целью сохранения и развития полуживотного плода [1, 25, 28]. В матке нарастает количество регуляторных НК и NKT, которые являются ведущими эффекторами иммунной толерантности в зоне фето-плацентарного контакта и выполняют фетотрофическую функцию, модулируют рост спиральных артерий [1, 25, 28]. Децидуальные НК и NKT характеризуются высокой экспрессией молекул Tim-3, CD9, которые играют критическую роль в регуляции их функций [12–19]. Tim-3-сигналинг на НК угнетает их дегрануляцию, цитотоксичность, моделирует продукцию цитокинов [14, 41]. Экспрессия CD9 необходима для взаимодействия с клетками эндотелия и трансэндотелиальной миграции, но также ограничивает дегрануляцию и влияет на продукцию цитокинов [19]. В поздние сроки физиологически протекающей беременности количество децидуальных НК и NKT снижается, а изменения иммунореактивности организма матери связаны с подготовкой к родам [42]. Учитывая критическую роль Tim-3 и CD9 в регуляции функций НК и NKT, а также возможность пополнения децидуальной популяции лимфоцитов клетками периферической крови, важно изучить экспрессию Tim-3, CD9 на цитотоксических и регуляторных периферических НК и NKT в разные сроки беременности.

В проведенном исследовании установлено, что в I триместре физиологически протекающей беременности общее количество и соотношение регуляторных и цитотоксических НК и NKT в периферической крови не менялось. Но экспрессия Tim-3 увеличивалась на регуляторных и цитотоксических NKT, регуляторных CD16⁻CD56^{bright}NK и цитотоксических истощенных CD16⁺CD56⁻NK, кроме цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK. Однако процент Tim-3⁺CD16⁺CD56^{dim}NK также увеличивался в I триместре, хотя и недостоверно. Повышение экспрессии Tim-3 на всех изученных субпопуляциях НК и NKT в I триместре согласуется с угнетением их цитотоксической активности и изменением спектра продуцируемых цитокинов

(снижение выработки IFN-gamma, увеличение секреции IL-4), что характерно для ранних сроков беременности [28–30]. Сходные закономерности экспрессии Tim-3 на периферических CD56⁺NK описаны в ранние сроки беременности и другими авторами [14, 41]. Следует отметить, что именно регуляторная субпопуляция NKT периферической крови способна к быстрой и массивной продукции поляризующих цитокинов, направляющих развитие иммунного ответа по клеточноопосредованному или гуморальному типу [28–30]. Можно полагать, что увеличение экспрессии Tim-3 на них является одним из потенциальных механизмов, регулирующих продукцию IFN-gamma в ранние сроки беременности, хотя данные механизмы для NKT не исследованы [28–30].

В нашей работе показано, что экспрессия CD9 в ранние сроки беременности повышалась на всех типах NK и не менялась на NKT. Увеличение экспрессии CD9 на регуляторных NK находилось в прямой зависимости от присутствия Tim-3, что, по-видимому, раскрывает один из потенциальных механизмов, способствующих миграции периферических CD16[–]CD56^{bright}NK с низкой цитотоксической активностью в матку на ранних сроках беременности. Децидуальные NK характеризуются коэкспрессией Tim-3 и CD9 [20]. Увеличение экспрессии CD9 в сочетании с Tim-3 на цитотоксических NK, по-видимому, в большей мере ассоциировано с угнетением их цитотоксической активности и, возможно, миграцией во вторичные лимфоидные органы [43]. Отсутствие изменений в экспрессии CD9 на NKT в ранние сроки беременности связано, по-видимому, с их ограниченной способностью к миграции. Однако выявленная прямая корреляция между присутствием CD9 и Tim-3 на регуляторных NKT свидетельствует о взаимосвязи экспрессии этих молекул на клетках с ограниченной цитотоксичностью.

Таким образом, можно полагать, что увеличение экспрессии CD9 и Tim-3 на NK-клетках и Tim-3 на NKT периферической крови в I триместре физиологически протекающей беременности играет важную в регуляции их функциональной активности, а именно является одним из механизмов снижения их цитотоксичности, модулирует продукцию цитокинов, определяет миграцию регуляторных CD56^{bright}CD16[–]NK в матку [14, 41].

В III триместре физиологически протекающей беременности общее количество NK и NKT снижалось, причем для популяции NK за счет уменьшения числа цитотоксических CD56^{dim}CD16⁺NK, а среди NKT снижался процент регуляторных CD56⁺CD16⁺NKT. Количество же регуляторных CD56^{bright}CD16[–]NK, напротив, увеличивалось. Экспрессия Tim-3 усиливалась на всех субпопуляциях NK и цитотоксических NKT, а CD9 повышалась только на регуляторных NK.

Снижение количества цитотоксических CD56^{dim}CD16⁺NK при увеличении экспрессии Tim-3 на них, а также на цитотоксических NKT в поздние сроки беременности, по-видимому, является одним из механизмов системного угнетения цитотоксической активности клеток крови при беременности [8, 44, 45] и может быть обусловлено действием гормонов, продуцируемых плацентой. Так, прогестерон, концентрация которого нарастает к концу беременности, усиливает апоптоз NK-клеток [46]. Необходимо отметить, что цитотоксические NK обладают наибольшей экспрессией рецепторов к прогестерону в отличие от регуляторных [41, 46]. Можно полагать, что экспрессия Tim-3 на NK и NKT периферической крови усиливается под влиянием прогестерона, концентрация которого нарастает к концу беременности, поскольку в ряде экспериментальных работ выявлена зависимость экспрессии Tim-3 на CD56⁺NK и CD56⁺NKT периферической крови от эффектов прогестерона [34]. Экспрессия Tim-3 повышает чувствительность к апоптозу, что также может объяснять снижение количества NK и NKT периферической крови в III триместре беременности [16]. Однако и другие гормоны, продуцируе-

мые плацентой, а также цитокины влияют на функциональную активность НК и НКТ периферической крови. Показана прямая зависимость присутствия Tim-3 на CD56⁺NK от увеличения концентрации TGF-1beta [14, 41]. Другими авторами установлено, что белки беременности, продуцируемые трофобластом, модулируют экспрессию Tim-3 и CD9 на периферических НК [20]. В наших предыдущих исследованиях показано, что инкубация НК периферической крови человека *in vitro* с гормонами, продуцируемыми плацентой (эстрадиол, эстриол, прогестерон, хорионический гонадотропин, лептин, грелин, киспептин), в концентрациях, характерных для разных триместров беременности, оказывала значимые модулирующие эффекты на экспрессию CD16, молекул клеточной адгезии, продукцию перфорина и гранзима, цитокинов, а также регуляторных микроРНК [46–48]. Экспрессия CD9 на цитотоксических НК в поздние сроки не отличалась от небеременных и имела обратную зависимость с присутствием Tim-3, что, по-видимому, связано с ограничением миграционной активности Tim-3⁺ цитотоксических НК.

Увеличение количества регуляторных НК также может быть обусловлено трансформирующим действием гормонов беременности и иммуносупрессорных цитокинов (TGF-1beta, IL-10), способствующих приобретению децидуально-подобного фенотипа НК-клетками [47–49]. Повышенная экспрессия Tim-3 и CD9 сохранялась на регуляторных НК периферической крови в поздние сроки беременности, что, по-видимому, в большей степени ассоциировано с ограничением дегрануляции и регуляцией продукцией цитокинов, чем с миграцией в матку [50]. Так, в единичных работах показано, что секреция IL-2 была снижена у Tim-3⁺CD56^{dim}NK по сравнению с Tim-3⁺CD56^{dim}NK, тогда как Tim-3⁺CD56^{bright}NK продуцировали больше INF-gamma, чем Tim-3⁺CD56^{bright}NK [41]. В III триместре экспрессия CD9 на всех исследуемых субпопуляциях НК (кроме регуляторных) и НКТ не отличалась от небеременных, что, по-видимому, характеризует уменьшение их миграционной активности и согласуется с данными литературы о том, что максимальное количество децидуальных НК и НКТ регистрируется в I триместре беременности, а далее их количество снижается [50].

Цитотоксические истощенные CD16⁺CD56⁻NK присутствуют в периферической крови небеременных, и их процент достоверно не менялся ни в I, ни в III триместрах физиологически протекающей беременности. Экспрессия Tim-3 на них была повышена как в I, так и в III триместрах беременности, а CD9 только в ранние сроки. Функции CD16⁺CD56⁻NK при физиологической беременности требуют дальнейшего изучения.

Снижение общего количества периферических НКТ в III триместре беременности происходит за счет уменьшения числа регуляторных НКТ, которые преобладают над цитотоксическими, процент которых не меняется. Уменьшение числа регуляторных НКТ может объясняться стероид-зависимым угнетением продуктивной функции тимуса, где проходит дифференцировка НКТ, следствием чего является характерная для беременности лимфопения [51]. Динамика субпопуляций регуляторных CD56⁺CD16⁻НКТ и цитотоксических CD56⁺CD16⁺НКТ по триместрам физиологической беременности не изучена. В единичных работах описано изменение количества активированных CD8⁺CD56⁺НКТ в периферической крови в III триместре беременности [39] и снижение общего количества CD56⁺НКТ [44]. Повышенная экспрессия Tim-3 сохранялась на цитотоксических CD56⁺CD16⁺НКТ, процент которых не изменялся, что, по-видимому, связано с ограничением их цитотоксической активности.

Таким образом, экспрессия молекул Tim-3 и CD9 на разных субпопуляциях НК и НКТ менялась по триместрам, что играет важную роль в регуляции их фенотипа и функций при беременности. Следует отметить, что экспрессия CD9 и Tim-3 ха-

рактеризует приобретение децидуально-подобного проангиогенного фенотипа NK клетками, свойственного и для NK в опухолевом микроокружении, где ведущую роль в трансформации фенотипа играют иммуносупрессорные цитокины TGF- β и IL-10 [43, 52, 53].

В целом, можно заключить, что экспрессия изученных молекул на регуляторных и цитотоксических популяциях NK и NKT периферической крови меняется по триместрам беременности, что дополняет наше понимание механизмов регуляции фенотипа и функций NK и NKT периферической крови. Модуляция экспрессии исследованных молекул на NK и NKT периферической крови представляет один из потенциальных терапевтических подходов в регуляции функций NK и NKT для повышения эффективности вспомогательных репродуктивных технологий, а при онкологических заболеваниях необходима для восстановления цитотоксической функции клеток.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено локальным этическим комитетом Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН (протокол № 16 от 5.06.2022 г.) и проведено в соответствии с этическими стандартами национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е.Г.О. и С.В.Ш.), сбор данных (О.А.Л.; Н.В.К.; О.Л.Г.), обработка данных (Е.Г.О.; О.А.Л.; О.Л.Г.), написание и редактирование манускрипта (Е.Г.О.; О.А.Л.; Н.В.К.; О.Л.Г.; С.В.Ш.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Saito S, Nakashima A, Myojo-Higuma S, Shiozaki A* (2008) The balance between cytotoxic NK cells and regulatory NK cells in human pregnancy. *J Reprod Immunol* 77(1): 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2007.04.007>
2. *Shojaei Z, Jafarpour R, Mehdizadeh S, Bayatipoor H, Pashangzadeh S, Motalebnezhad M* (2022) Functional prominence of natural killer cells and natural killer T cells in pregnancy and infertility: A comprehensive review and update. *Pathol Res Pract* 238: 154062. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.154062>
3. *Di Santo JP* (2008) Functionally distinct NK-cell subsets: developmental origins and biological implications. *Eur J Immunol* 38(11): 2948–2951. <https://doi.org/10.1002/eji.200838830>
4. *Veenstra van Nieuwenhoven AL, Bouman A, Moes H, Heineman MJ, de Leij LF, Santema J, Faas MM* (2002) Cytokine production in natural killer cells and lymphocytes in pregnant women compared with women in the follicular phase of the ovarian cycle. *Fertil Steril* 77(5): 1032–1037. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(02\)02976-x](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(02)02976-x)
5. *Wijaya RS, Read SA, Schibeci S, Han S, Azardaryany MK, van der Poorten D, Lin R, Yuen L, Lam V, Douglas MW, George J, Ahlenstiel G.* (2021). Expansion of dysfunctional CD56⁺CD16⁺ NK cells in chronic hepatitis B patients. *Liver Int: Offic J Int Associat Study Liver*, 41(5): 969–981. <https://doi.org/10.1111/liv.14784>
6. *Orrantia A, Terrén I, Izquierdo-Lafuente A, Alonso-Cabrera JA, Sandá V, Vitallé J, Moreno S, Tassias M, Uranga A, González C, Mateos JJ, García-Ruiz JC, Zenarruzabeitia O, Borrego F* (2020) A NKp80-Based Identification Strategy Reveals that CD56neg NK Cells Are Not Completely

- Dysfunctional in Health and Disease. *Science* 23(7): 101298.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101298>
7. Cocker ATH, Liu F, Djaoud Z, Guethlein LA, Parham P (2022) CD56-negative NK cells: Frequency in peripheral blood, expansion during HIV-1 infection, functional capacity and KIR expression. *Front Immunol* 13: 992723.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.992723>
 8. Whettlock EM, Woon EV, Cuff AO, Browne B, Johnson MR, Male V (2022) Dynamic Changes in Uterine NK Cell Subset Frequency and Function Over the Menstrual Cycle and Pregnancy. *Front Immunol* 13: 880438.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.880438>
 9. Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, Masch R, Lockwood CJ, Schachter AD, Park PJ, Strominger JL (2003) Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med* 198(8): 1201–1212.
<https://doi.org/10.1084/jem.20030305>
 10. Михайлова ВА, Белякова КЛ, Сельков СА, Соколов ДИ (2017) Особенности дифференцировки NK-клеток: CD56dim и CD56bright NK-клетки во время и вне беременности. *Мед иммунол* 19(1): 19–26. [Mikhailova VA, Belyakova KL, Selkov SA, Sokolov DI (2017) Features of NK cell differentiation: CD56dim and CD56bright NK cells during and outside pregnancy. *Med Immunol* 19(1): 19–26. (In Russ)].
<https://doi.org/10.15789/1563-0625-2017-1-19-26>
 11. Sotnikova N, Voronin D, Antsiferova Y, Bukina E (2014) Interaction of decidual CD56⁺ NK with trophoblast cells during normal pregnancy and recurrent spontaneous abortion at early term of gestation. *Scand J Immunol* 80(3): 198–208.
<https://doi.org/10.1111/sji.12196>
 12. Du X, Zhu H, Jiao D, Nian Z, Zhang J, Zhou Y, Zheng X, Tong X, Wei H, Fu B (2022) Human-induced CD49a⁺ NK Cells promote fetal growth. *Front Immunol* 13: 821542.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.821542>
 13. Khademi M, Illés Z, Gielen AW, Marta M, Takazawa N, Baecher-Allan C, Brundin L, Hannerz J, Martin C, Harris RA, Hafler DA, Kuchroo VK, Olsson T, Piehl F, Wallström ET (2004) Cell Ig- and mucin-domain-containing molecule-3 (TIM-3) and TIM-1 molecules are differentially expressed on human Th1 and Th2 cells and in cerebrospinal fluid-derived mononuclear cells in multiple sclerosis. *J Immunol* 172(11): 7169–7176.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.11.7169>
 14. Sun J, Yang M, Ban Y, Gao W, Song B, Wang Y, Zhang Y, Shao Q, Kong B, Qu X (2016) Tim-3 Is upregulated in NK cells during early pregnancy and inhibits NK cytotoxicity toward trophoblast in galectin-9 dependent pathway. *PLoS One* 11(1): e0147186.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147186>
 15. Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, Zheng XX, Strom TB, Kuchroo VK (2005) The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol* 6(12): 1245–1252.
<https://doi.org/10.1038/ni1271>
 16. Hou H, Liu W, Wu S, Lu Y, Peng J, Zhu Y, Lu Y, Wang F, Sun Z (2014) Tim-3 negatively mediates natural killer cell function in LPS-induced endotoxic shock. *PLoS One* 9(10): e110585.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110585>
 17. Meggyes M, Lajko A, Palkovics T, Totsimon A, Illes Z, Szereday L, Miko E (2015). Feto-maternal immune regulation by TIM-3/galectin-9 pathway and PD-1 molecule in mice at day 14.5 of pregnancy. *Placenta* 36(10): 1153–1160.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.07.124>
 18. Cerdeira AS, Rajakumar A, Royle CM, Lo A, Husain Z, Thadhani RI, Sukhatme VP, Karumanchi SA, Kopcow HD (2013). Conversion of peripheral blood NK cells to a decidual NK-like phenotype by a cocktail of defined factors. *J Immunol* (Baltimore, Md: 1950), 190(8): 3939–3948.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202582>
 19. Reyes R, Cardenas B, Machado-Pineda Y, Cabañas C (2018) Tetraspanin CD9: A key regulator of cell adhesion in the immune system. *Front Immunol* 9: 863.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00863>
 20. Lee CL, Vijayan M, Wang X, Lam KKW, Koistinen H, Seppala M, Li RHW, Ng EHY, Yeung WSB, Chiu PCN (2019) Glycodelin-A stimulates the conversion of human peripheral blood CD16-CD56bright NK cell to a decidual NK cell-like phenotype. *Hum Reprod* 34(4): 689–701.
<https://doi.org/10.1093/humrep/dey378>
 21. Орлова ЕГ, Логинова ОА, Горбунова ОЛ, Каримова НВ, Ширишев СВ (2022) Особенности экспрессии молекул Tim-3, CD9, CD49a лимфоцитами периферической крови при физиологической беременности. [Электронный ресурс] *Вестн уральской мед акад науки* 19(5): 461–473. [Orlova EG, Loginova OA, Gorbunova OL, Karimova NV, Shirshov SV (2022) Features of TIM-3, CD9, CD49a molecule expressions by peripheral blood lymphocytes during physiological pregnancy. [Online] *Vestn Ural Med Akad Nauki* 19(5): 461–473. (In Russ)].
<https://doi.org/10.22138/2500-0918-2022-19-5-461-473>

22. Moore T, Dveksler GS (2014) Pregnancy-specific glycoproteins: complex gene families regulating maternal-fetal interactions. *Int J Dev Biol* 58(2–4): 273–280.
<https://doi.org/10.1387/ijdb.130329gd>
23. Kronenberg M, Gapin L (2002) The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2: 557–568.
<https://doi.org/dx.doi.org/10.1038/nri854>
24. Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Dias JC, Pascoal VP, Teixeira-Carvalho A, Lage PS, Elói-Santos SM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA (2005) Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3⁺CD16⁺CD56⁺ natural killer T cells and CD4⁺CD25⁺ high regulatory T lymphocytes. *Scand J Immunol* 62(3): 297–308.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2005.01668.x>
25. Yuan J, Li J, Huang SY, Sun X (2015) Characterization of the subsets of human NKT-like cells and the expression of Th1/Th2 cytokines in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion. *J Reprod Immunol* 110: 81–88.
<https://doi.org/10.1016/j.jri.2015.05.001>
26. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L (2004) NKT cells: what's in a name? *Nature Rev Immunol* 4(3): 231–237.
<https://doi.org/10.1038/nri1309>
27. Borzychowski AM, Croy BA, Chan WL, Redman CWG, Sargent IL (2005) Changes in systemic type 1 and type 2 immunity in normal pregnancy and preeclampsia may be mediated by natural killer cells. *Eur J Immunol* 35: 3054–3063.
<https://doi.org/10.1002/eji.200425929>
28. Boyson JE, Rybalov B, Koopman LA, Exley M, Balk SP, Racke FK, Schatz F, Masch R, Wilson SB, Strominger JL (2002) CD1d and invariant NKT cells at the human maternal-fetal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 9(21): 13741–13746.
<https://doi.org/10.1073/pnas.162491699>
29. Shi Y, Ling B, Zhou Y, Gao T, Feng D, Xiao M, Feng L (2007) Interferon-gamma expression in natural killer cells and natural killer T cells is suppressed in early pregnancy. *Cell Mol Immunol* 4(5): 389–394.
30. Southcombe J, Redman C, Sargent I (2010) Peripheral blood invariant natural killer T cells throughout pregnancy and in preeclamptic women. *J Reprod Immunol* 87(1–2): 52–59.
<https://doi.org/10.1016/j.jri.2010.07.003>
31. Van den Heuvel MJ, Peralta CG, Hatta K, Han VK, Clark DA (2007) Decline in number of elevated blood CD3⁺CD56⁺ NKT cells in response to intravenous immunoglobulin treatment correlates with successful pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 58(5): 447–459.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2007.00529.x>
32. Hosseini S, Shokri F, Pour SA, Khoshnoodi J, Jeddi-Tehrani M, Zarnani AH (2019) Diminished frequency of menstrual and peripheral blood NKT-like cells in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion and infertile women. *Reprod Sci* 26(1): 97–108.
<https://doi.org/10.1177/1933719118766261>
33. Ito K, Karasawa M, Kawano T, Akasaka T, Koseki H, Akutsu Y, Kondo E, Sekiya S, Sekikawa K, Harada M, Yamashita M, Nakayama T, Taniguchi M (2000) Involvement of decidual Vα14 NKT cells in abortion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(2): 740–744.
<https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.740>
34. Lajko A, Meggyes M, Polgar B, Szereday L (2018) The immunological effect of Galectin-9/TIM-3 pathway after low dose Mifepristone treatment in mice at 14.5 day of pregnancy. *PLoS One* 13(3): e0194870.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194870>
35. Trittel S, Vashist N, Ebensen T, Chambers BJ, Guzmán CA, Riese P (2019) Invariant NKT cell-mediated modulation of ILC1s as a tool for mucosal immune intervention. *Front Immunol* 10: 1849.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01849>
36. Шупуев СВ (2009) Иммунология материнско-фетальных взаимодействий. Екатеринбург. УрО РАН. [Shirshov SV (2009) Immunology of maternal-fetal interactions. Ekaterinburg. (In Russ)].
37. Szekeres-Bartho J (2009) Progesterone-mediated immunomodulation in pregnancy: its relevance to leukocyte immunotherapy of recurrent miscarriage. *Immunotherapy* (5): 873–882. PMID: <https://doi.org/10.2217/imt.09.5420636029>
38. Gutierrez C (1979) Purification of human T and B cells by a discontinuous density gradient of percoll. *J Immunol Methods* 29(1): 57–63.
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(79\)90125-x](https://doi.org/10.1016/0022-1759(79)90125-x)
39. De Andrés C, Fernández-Paredes L, Tejera-Alhambra M, Alonso B, Ramos-Medina R, Sánchez-Ramón S (2017) Activation of Blood CD3⁺CD56⁺CD8⁺ T cells during pregnancy and multiple sclerosis. *Front Immunol* 8: 196.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00196>
40. Zhou J, Zhao X, Wang Z, Wang J, Sun H, Hu Y (2013) High circulating CD3⁺CD56⁺CD16⁺ natural killer-like T cell levels predict a better IVF treatment outcome. *J Reprod Immunol* 97(2): 197–203.
<https://doi.org/10.1016/j.jri.2012.12.006>

41. Meggyes M, Miko E, Polgar B, Bogar B, Farkas B, Illes Z, Szereday L (2014) 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* 9(3): e92371.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092371>
42. Williams PJ, Searle RF, Robson SC, Innes BA, Bulmer JN (2009) Decidual leucocyte populations in early to late gestation normal human pregnancy. *J Reprod Immunol* 82(1): 24–31.
<https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.08.001>
43. Gemelli M, Noonan DM, Carlini V, Pelosi G, Barberis M, Ricotta R, Albini A (2022) Overcoming resistance to checkpoint Inhibitors: natural killer cells in non-small cell lung cancer. *Front Oncol* 12: 886440.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2022.886440>
44. Meggyes M, Nagy DU, Saad Al Deen I, Parkanyi B, Szereday L (2023) CD8⁺ and CD8[−] NKT cells exhibit phenotypic changes during pregnancy. *Immunol Invest* 52(1): 35–57.
<https://doi.org/10.1080/08820139.2022.2119863>
45. Mikhailova VA, Kudryavtsev IV, Serebryakova MK, Milyutina YP, Demidova ES, Panina AN, Bazhenov DO, Belikova ME, Selkov SA, Sokolov DI (2020) Trophoblast cell influence on peripheral blood natural killer cell proliferation and phenotype in non-pregnant women and women in early pregnancy. *Immunobiology* 225(3): 151910.
<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2020.151910>
46. Arruvito L, Giulianelli S, Flores AC, Paladino N, Barboza M, Lanari C, Fainboim L (2008) NK cells expressing a progesterone receptor are susceptible to progesterone-induced apoptosis. *J Immunol* 180(8): 5746–5753.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5746>
47. Shirshov SV, Nekrasova IV, Gorbunova OL, Orlova EG (2017) Hormonal regulation of NK cell cytotoxic activity. *Dokl Biol Sci* 472(1): 28–30.
<https://doi.org/10.1134/S0012496617010021>
48. Shirshov SV, Nekrasova IV, Gorbunova OL, Orlova EG, Maslennikova IL (2017) MicroRNA in hormonal mechanisms of regulation of NK cell function. *Dokl Biochem Biophys* 474(1): 168–172.
<https://doi.org/10.1134/S160767291703005X>
49. Mikhailova V, Grebenkina P, Khokhlova E, Davydova A, Salloum Z, Tyshchuk E, Zagainova V, Markova K, Kogan I, Selkov S, Sokolov D (2022) Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in the Context of NK Cell-Trophoblast Interactions. *Int J Mol Sci* 23(4): 2387.
<https://doi.org/10.3390/ijms23042387>
50. Van den Heuvel MJ, Chantakru S, Xuemei X, Evans SS, Tekpetey F, Mote PA, Clarke CL, Croy BA (2005) Trafficking of circulating pro-NK cells to the decidualizing uterus: regulatory mechanisms in the mouse and human. *Immunol Invest* 34(3): 273–293.
<https://doi.org/10.1081/imm-200064488>
51. Shinomiya N, Tsuru S, Tsugita M, Katsura Y, Takemura T, Roku-tanda M, Nomoto K (1991) Thymic depletion in pregnancy: kinetics of thymocytes and immunologic capacities of the hosts. *J Clin Lab Immunol* 34: 11–22.
52. Montaldo E, Vacca P, Chiossone L, Croxatto D, Loiacono F, Martini S, Ferrero S, Walzer T, Moretta L, Mingari MC (2016) Unique comes(+) NK cell subsets are present in uterus and decidua during early pregnancy. *Front Immunol* 6: 646.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00646>
53. Albini A, Gallazzi M, Palano MT, Carlini V, Ricotta R, Bruno A, Stetler-Stevenson WG, Noonan DM (2021) TIMP1 and TIMP2 downregulate TGFβ induced decidual-like phenotype in natural killer cells. *Cancers (Basel)* 13(19): 4955.
<https://doi.org/10.3390/cancers13194955>

Tim-3, CD9 Molecule Expressions on Natural Killer (NK) and T-Lymphocytes with NK Functions (NKT) of the Peripheral Blood at Different Trimesters of Physiological Pregnancy

E. G. Orlova^{a, *}, O. A. Loginova^a, O. L. Gorbunova^a, N. V. Karimova^b, and S. V. Shirshov^a

^a*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms RAS – Branch of Perm Federal Research Center UB RAS, Perm, Russia*

^b*LLC Centralized Clinical and Diagnostic Laboratory, Perm, Russia*

*e-mail: orlova_katy@mail.ru

Natural killer cells (NK) and T-lymphocytes with NK functions (NKT) are the leading effectors of the mother's immune tolerance to a semi-allogeneic fetus and have a fetal trophic effect during physiological pregnancy. Tim-3 (T-cell Ig and mucin domain-containing protein 3) and CD9 molecules play a critical role in the immunoregulatory and

fetal trophic functions of NK and NKT, but their expression in peripheral blood cells has not been studied. The aim of this work was to study the expression of Tim-3 and CD9 in peripheral blood NK and NKT during physiological pregnancy. The object of the study was the peripheral blood of healthy women in I and III trimesters of a physiological pregnancy. The control group consisted of healthy non-pregnant women in the first phase of the menstrual cycle. Expression of Tim-3, CD9 molecules was analyzed by flow cytometry on regulatory NK ($CD16^{-}CD56^{bright}$) and NKT ($CD16^{-}CD56^{+}$), cytotoxic NK ($CD16^{+}CD56^{dim/-}$) and NKT ($CD16^{+}CD56^{+}$). It was found that in the first trimester of pregnancy, the total number and subpopulation composition of NK and NKT cells did not change. Tim-3 expression increased in all NK and NKT subpopulations, except for cytotoxic $CD16^{+}CD56^{dim}$ NK. CD9 expression increased in all NK subpopulations, but in NKT did not differ from non-pregnant. At the same time, a direct correlation between CD9 and Tim-3 expressions was revealed in regulatory NK and NKT in the first trimester of pregnancy. In the third trimester, the regulatory $CD16^{-}CD56^{bright}$ NK number increased, while cytotoxic $CD16^{+}CD56^{dim}$ NK and regulatory $CD16^{-}CD56^{+}$ NKT decreased compared to non-pregnant women. The number of $CD16^{+}CD56^{-}$ NK did not change in I and III trimesters of a physiological pregnancy. Tim-3 expression was upregulated in all NK and cytotoxic NKT subpopulations, while CD9 was upregulated only in regulatory NKs. Thus, Tim-3 and CD9 molecule expressions of s on different NK and NKT subpopulations changed during I and III trimesters of a physiological pregnancy, which plays an important role in the regulation of their phenotype and functions.

Keywords: natural killers, T-lymphocytes with natural killer functions, Tim-3, CD9, pregnancy