

УДК 612.01.8;612.017.1;611.018.53

МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ ЛЕПТИНА И ГРЕЛИНА НА СОЗРЕВАНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК*

© 2019 Е.Г. Орлова**, С.В. Ширшев, О.А. Логинова

*Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН –
филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН,
614081 Пермь; электронная почта: orlova_katy@mail.ru*

Поступила в редакцию 03.07.18

После доработки 17.09.18

Принята к публикации 17.09.18

Исследованы молекулярные механизмы иммуномодулирующих эффектов лептина и грелина в концентрациях, характерных для беременности, на созревание и функциональную активность дендритных клеток (ДК), генерированных из моноцитов периферической крови женщин. Установлено, что присутствие лептина при созревании ДК не влияет на уровень CD1c⁺ДК, экспрессирующих CD83, CD86 и HLA-DR, но увеличивает количество и активность индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO). Культивирование в присутствии грелина, а также комбинации лептина с грелином снижает процент CD1c⁺ДК, экспрессирующих CD86, но не влияет на уровень CD83⁺ и HLA-DR⁺CD1c⁺ДК. Кроме того, грелин уменьшает количество молекул IDO, не оказывая влияния на активность фермента. Одновременное присутствие двух гормонов стимулирует индуцированную активность IDO, не влияя на количество фермента в ДК. Действие лептина и грелина на исследуемые функции ДК в ряде случаев коррелирует с повышением уровня сАМР. Таким образом, установлены новые механизмы регуляции лептином и грелином толерогенной функции ДК применительно к беременности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: лептин, грелин, беременность, дендритные клетки, IDO, сАМР

DOI: 10.1134/S0320972519010056

Дендритные клетки (ДК) являются основными антигенпрезентирующими клетками, которые иницируют и направляют развитие иммунного ответа. В зависимости от зрелости и функциональной активности ДК регулируют направленность дифференцировки наивных CD4⁺T-хелперных клеток (Th-клеток) и тип иммунного ответа, способствуя как усилению функций эффекторных T-клеток против чужеродных агентов, так и угнетению иммунного ответа, потенцируя генерацию индуцибельных (i) регуляторных T-клеток (Treg), определяющих толерантность [1, 2].

Беременность является ярким примером формирования толерантности иммунной систе-

мы матери к генетически чужеродному плоду при сохранении защитных свойств материнского организма в целом [3]. При нормально протекающей беременности в периферической крови увеличивается доля незрелых ДК, обладающих способностью индуцировать состояние иммунной толерантности [1, 3]. Эти клетки характеризуются сниженной экспрессией костимуляторных/коактиваторных молекул (CD40, CD80, CD83, CD86), высоким уровнем продукции противовоспалительных цитокинов IL-10 и TGF-β1, повышенной активностью фермента индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) [1–3]. Толерогенные (незрелые) ДК угнетают T-клеточный ответ, усиливая генерацию iTreg и умень-

Принятые сокращения: ДК – дендритные клетки; ЛПС – липополисахарид; Ас – аденилатциклаза; АМРК – АМР-активируемая протеинкиназа; сАМР – аденозин-3',5'-циклофосфат; СаМ – кальмодулин; CD – поверхностный лейкоцитарный антиген; CREB – белок, связывающий сАМР-чувствительный элемент; DAG – диацилглицерол; ЕРАС – обмениваемый фактор, напрямую активируемый сАМР; ERK – киназа, регулируемая внеклеточными сигналами; GHS-R – рецептор грелина; HLA-DR – молекула главного комплекса совместимости II класса человека; IDO – индоламин-2,3-диоксигеназа; IL – интерлейкин; ITIM2 – мотив 2, ингибирующий фосфорилирование тирозина; IP₃ – инозитол-1,4,5-трифосфат; JAK – Янус-киназа; JNK – c-Jun-NH₂-концевая протеинкиназа; LepR – рецептор лептина; MAPK – протеинкиназа, активируемая митогенами; MyD88 – белок первичного ответа 88 миелоидной линии дифференцировки; NF-κB – ядерный фактор κB; p38MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа p38; PDE3B – фосфодиэстераза 3B; PIP₂ – фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат; PI3K – фосфатидилинозитол 3-киназа; PKA – протеинкиназа A; PKB/Akt – протеинкиназа B; PKC – протеинкиназа C; PLC – фосфолипаза C; SOCS3 – супрессор транскрипции сигнала цитокинов 3; STAT3 – передатчик сигнала и активатор транскрипции 3; TLR-4 – Toll-подобные рецепторы 4.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochemistry>, в рубрике «Papers in Press», BM18-187, 12.11.2018.

** Адресат для корреспонденции.

шая уровень Т-хелперов, продуцирующих IL-17 (Th17), вызывая анемию и апоптоз цитотоксических Т-клеток [3].

В отличие от цитокинов, IDO является ведущим фактором индукции периферической толерантности при беременности [1–4]. Фермент экспрессируется синцитиотрофобластом, клетками децидуальной оболочки, плацентарными ДК и макрофагами [5]. IDO является индуцибельным ферментом, конвертирующим L-триптофан в кинуренин, 3-гидроксикинуренин и 3-гидроксиантралиловую кислоту [1–4], что приводит к дефициту триптофана, необходимого для полноценной трансляции белков в активированных Т-клетках, а токсичные продукты его деградации индуцируют апоптоз Th1 [6] и цитотоксических Т-лимфоцитов [1–5]. Показано, что угнетение активности IDO у беременных самок мышей способствует индукции антифетального иммунного ответа [7]. Кроме этого, кинуренины способны смещать баланс Th17/Treg в пользу последних [8]. Поэтому высокая активность IDO обеспечивает один из ключевых механизмов, формирующий материнско-фетальную толерантность [9].

Учитывая, что гормоны плаценты могут, в силу экспрессии специфических рецепторов на лейкоцитах, модулировать функциональную активность клеток иммунной системы [10–13], гормоны можно рассматривать как физиологические индукторы толерогенных ДК. Пептидные гормоны – лептин и грелин – являются функциональными антагонистами, регулирующими энергетический гомеостаз, работу иммунной и репродуктивной систем [10]. Действуя на уровне гипоталамуса, лептин и грелин разнонаправленно контролируют чувство голода и аппетит, регулируя потребление пищи, метаболизм жировой ткани, энергетический гомеостаз, процессы роста и развития [10]. Оба гормона обладают выраженной иммунорегуляторной активностью [13–16]. При беременности концентрации лептина и грелина в периферической крови значительно увеличиваются, поскольку оба гормона регулируют имплантацию, активно вырабатываются плацентой, контролируют рост и развитие плода [10]. Рецепторы к лептину (LepR) и грелину (GHS-R) обнаружены на ДК [12, 17, 18] и большинстве клеток иммунной системы [17–22]. Показано, что лептин является провоспалительным гормоном и способствует преобладанию клеточно-опосредованного иммунного ответа [17, 19]. Грелин проявляет противовоспалительную активность, оказывая антагонистическое действие по отношению к лептину, блокируя лептин-индуцированные провоспалительные реакции [12]. Оба гормона

способны взаимно регулировать экспрессию рецепторов друг к другу на клетках-мишенях [12, 20]. Сочетанное действие лептина и грелина как на уровне клетки, так и целого организма приводит к формированию кооперативных эффектов, определяющих энергетический и иммунный гомеостаз [10, 16, 20]. Известно, что лептин усиливает созревание ДК, повышая экспрессию CD40, продукцию IL-12 и способность инициировать Th1-ответ [17, 18, 21]. Ранее нами было показано, что лептин и грелин в концентрациях, характерных для беременности, разнонаправленно модулируют синтез IL-12, IL-10, TGF- β 1 в ДК и опосредованную ДК дифференцировку iTreg и Th17 [14–16], а также активность IDO моноцитов периферической крови [22]. Таким образом, изучение гормональных механизмов, контролирующих функции ДК, является важным для понимания закономерностей формирования иммунного ответа и иммунной толерантности при беременности и может быть использовано в качестве наиболее эффективного подхода для индукции антиген-специфической толерантности к антигенам донора, реципиента или к собственным антигенам.

Анализ данных литературы убедительно доказывает, что эффекты большинства гормонов плаценты направлены на угнетение цитотоксических реакций, формирование иммунного ответа по Th2-типу и генерацию супрессорных Т-клеток в зоне маточно-плацентарного контакта вследствие сAMP-повышающей трансдукции внутриклеточного сигнала [23]. В нашей предыдущей работе показано, что в реализации иммуномодулирующих эффектов грелина и комбинации грелина с лептином участвуют сAMP-зависимые сигнальные пути [15]. По данным других авторов, лептин, действуя на разные типы клеток, также использует сAMP в качестве вторичного мессенджера [24, 25]. Все вышесказанное определяет необходимость оценки роли сAMP в реализации эффектов лептина и грелина в регуляции функций ДК.

Целью данной работы являлось изучение способности лептина и грелина, а также их физиологической комбинации, отражающей уровень данных гормонов в период беременности, оказывать влияние на степень созревания ДК, а также количество и активность IDO с оценкой роли сAMP в данном процессе.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования являлись ДК, генерированные из моноцитов периферической крови здоровых небеременных женщин репро-

дуктивного возраста (19–39 лет, $n = 10$). Забор крови осуществляли в раннюю фолликулярную фазу менструального цикла (1–7-й дни). Мононуклеарные клетки выделяли из гепаринизированной крови с помощью центрифугирования (200 г, 40 мин) в градиенте плотности фикол-верографина (1,077 г/см³; «Sigma», США; «Спофа», Чехия). Генерацию ДК проводили по стандартной методике [26]. Для этого мононуклеарные клетки (1–5 × 10⁶ кл/мл) ресуспендировали в полной питательной среде (среда RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1 мМ NERES, 2 мМ L-глутамин, 100 мкг/мл стрептомицин), засеивали на 24-луночные полистироловые планшеты («Costar», США) по 2 мл на лунку и инкубировали в течение 3 ч при 37 °C и 5%-ном содержании CO₂. За это время моноциты прилипали к поверхности пластика, а неприлипшие мононуклеары смывали с поверхности пластика холодной средой RPMI-1640. Далее в лунки вносили по 2 мл полной питательной среды и гормоны. Лептин («Sigma», США) использовали в концентрации 35 нг/мл, которая отражает его содержание в периферической крови на II и III триместрах беременности [27]. Грелин («Sigma», Израиль) вносили в концентрации 1,25 нг/мл, сопоставимой с уровнем гормона в периферической крови в I и II триместрах беременности [28]. Для исследования совместных эффектов гормоны в культуры добавляли одновременно: лептин (35 нг/мл) + грелин (1,25 нг/мл). В контрольные пробы вместо гормонов вносили физиологический раствор, используемый для растворения гормонов.

Для индукции формирования ДК из моноцитов периферической крови в пробы добавляли GM-CSF (гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор, 100 нг/мл; «R&D», США) и IL-4 (20 нг/мл; «BioLegend», США) [26]. Клетки инкубировали при 37 °C в условиях 5%-ного содержания CO₂ в течение 5 сут. По окончании 3 сут меняли часть среды и повторно добавляли цитокины (IL-4 и GM-CSF) и гормоны, а также вносили индуктор созревания ДК – ЛПС (1 мкг/мл, *E. coli* serotype 0111:B4; «Sigma», США) [26]. По окончании 5 сут удаляли супернатанты, а генерированные ДК делили на части для оценки их фенотипа и функциональной активности. Жизнеспособность клеток, определяемая в тесте с эозином, после 120 ч инкубации с гормонами составляла >95%.

Генерацию ДК оценивали методом проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре «FACSCalibur» («Becton Dickinson», США). На клетках определяли экспрессию поверхностных молекул CD14, CD83, CD86, HLA-DR и CD1c, отражающих дифференцировку моноцитов в ДК,

с использованием соответствующих моноклональных антител (Anti-Human CD14-FITC 61D3/Mouse IgG1; Anti-Human CD83-PE HB15e/Mouse IgG1; Anti-Human CD86-PE IT2.2/Mouse IgG2b; Anti-Human HLA-DR-PE L243/Mouse IgG2a; Anti-Human CD1c-FITC L161/Mouse IgG1 kappa; «eBio», США). Последовательный отбор программными средствами клеток с определенными характеристиками для их дальнейшего анализа осуществляли по параметрам прямого и бокового светорассеивания с учетом логических ограничений в гистограмме распределения клеток по морфологии и размерам, а далее определения в этом регионе специфических маркеров ДК. Мертвые клетки исключали по параметрам прямого и бокового рассеяния. Подсчитывали не менее 10⁵ клеток в пробе. Для контроля неспецифического связывания и выделения негативного по флуоресценции окна использовали соответствующие изотипические контроли (Mouse IgG1-FITC; Mouse IgG1-PE; Mouse IgG2b-PE; Mouse IgG2a-PE; Mouse IgG1 kappa-FITC; «eBio», США).

Для оценки влияния гормонов на созревание ДК исследовали количество CD83⁺, CD86⁺ и HLA-DR⁺ в гейте CD1c-позитивных ДК [29].

Количество молекул фермента IDO в ДК определяли методом ИФА в лизате клеток с использованием коммерческого набора ELISA Kit for Indoleamine-2,3-Dioxygenase (IDO) («Cloud-Clone Corp.», США) согласно инструкции производителя.

Для изучения активности IDO в часть проб вносили L-триптофан (100 мкМ; «Sigma», США) и культивировали в течение 4 ч. По окончании культивирования собирали супернатанты и оценивали в пробах концентрацию кинуренина – первого стабильного продукта при деградации триптофана [2]. В качестве индуктора активности IDO использовали ЛПС (100 нг/мл; *E. coli* serotype 0111:B4, «Sigma», США) [30]. Количество кинуренина в пробах определяли спектрофотометрически по стандартной методике [2]. Спонтанная продукция кинуренина в исследуемых пробах составляла 1,63 ± 0,54 мкМ.

Уровень внутриклеточного cAMP в лизате генерированных ДК определяли методом ИФА с использованием коммерческого набора Direct cAMP ELISA Kit («Enzo Life Sciences», США) согласно инструкции производителя.

Первичную обработку данных, полученных в ходе цитометрии, проводили с помощью программ «WinMDI 2.9» и «Kaluza 1.5». Анализ эмпирических данных осуществляли в программе «STATISTICA 11.0». Проверку нулевой гипотезы о нормальности распределения в выборке проводили с помощью теста χ^2 . Оценку статисти-

ческих отличий для данных, подчиняющихся закону нормального распределения, осуществляли с использованием парного *t*-критерия Стьюдента, а в случае ненормального распределения для определения статистических отличий использовали парный *W*-критерий Уилкоксона. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Для преодоления проблемы множественных сравнений применяли поправку Бонферрони. Для выявления взаимосвязи признаков использовали корреляцию Пирсона (*r*).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Генерация ДК. В данной работе было установлено, что культивирование моноцитов в присутствии IL-4 и GM-CSF приводит к формированию типичного фенотипа ДК, характеризующегося утратой моноцитарного маркера CD14, повышением экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости II класса (HLA-DR), антигенпрезентирующей молекулы CD1c, костимуляторной молекулы CD86 и маркера зрелых ДК CD83, тогда как моноциты, культивируемые в стандартных условиях, характеризуются высоким уровнем экспрессии как CD14, так и HLA-DR (рис. 1). Причем экспрессия HLA-DR на моноцитах была сравнима с созревающими ДК, а количество молекул CD1c, CD83 и CD86 было достоверно ниже, чем на ДК. Следует отметить, что молекула CD1c, именуемая также антиген 1 ДК крови (BDCA-1), является основным маркером классических (миелоидных) ДК, к которым относится как большинство циркулирующих в периферической крови ДК, так и генерируемые из моноцитов ДК *in vitro* [29, 30]. Таким образом, используемая модель обеспечивает успешную генерацию ДК из моноцитов периферической крови.

Влияние лептина на процессы созревания и функциональную активность ДК. Известно, что у мышей гомозиготных линий *ob/ob* (дефект выработки лептина) и *db/db* (мутация рецептора к лептину) снижена экспрессия маркеров созревания CD40, CD80, CD86 и HLA-DR на ДК [31]. Введение лептина таким животным восстанавливает «зрелый» фенотип ДК. Исследование этой способности лептина *in vitro* на генерируемых ДК человека показало, что присутствие гормона в культуре в концентрации, характерной для беременности, не оказывает статистически значимого воздействия на экспрессию мембранных молекул HLA-DR, CD83 и CD86 на CD1c⁺ ДК (рис. 2, табл. 1). По-видимому, при нормально протекающей беременности лептин не реализует свои потенциальные возможности, в отличие от модель-

ных экспериментов на мышах с генетическими дефектами. Известно, что зрелые ДК (миелоидные) принимают активное участие в реакциях, направленных против трансплантируемых антигенных структур [7]. Отсутствие стимулирующего влияния лептина предполагает, что его концентрация во время беременности недостаточна для реализации этого эффекта.

Присутствие лептина на этапе созревания ДК увеличивает как количество, так и ЛПС-стимулированную активность IDO, усиливая метаболизм L-триптофана с образованием кинуренина (табл. 2). Параллельные измерения уровня внутриклеточного cAMP не выявили его повышения под влиянием лептина, реализующего модулирующие эффекты на ДК *in vitro*. Таким образом, можно заключить, что во время беременности лептин не влияет на созревание миелоидных ДК, но повышает их толерогенный потенциал, усиливая процессы синтеза IDO и, как следствие, катаболизма L-триптофана до кинуренина, что способствует анергии и гибели эффекторных Т-лимфоцитов в зоне маточно-плацентарного контакта. Ранее нами было показано, что лептин оказывает аналогичное влияние на ЛПС-стимулированную активность IDO моноцитов периферической крови [22].

Следует отметить, что ЛПС, наряду с IFN- γ , во время беременности является наиболее важным фактором, инициирующим созревание ДК и экспрессию IDO [32]. ЛПС постоянно присутствует в мочеполовых путях как продукт бактериальной контаминации. Взаимодействие ЛПС с TLR-4 (Toll-подобные рецепторы 4), экспонированными на ДК, приводит к последовательной активации MyD88 (белок первичного ответа 88 миелоидной линии дифференцировки), PI3K (фосфатидилинозитол-3-киназа), включая Akt (протеинкиназа B) и p38MAPK (митоген-активируемые протеинкиназы) [30, 33]. Как Akt, так и p38MAPK индуцируют формирование активного NF- κ B (ядерного фактора транскрипции κ B) [33], который непосредственно связывается с промотором *INDO*, усиливая экспрессию IDO [30]. Взаимодействие лептина с LepR на ДК активирует Jak2-киназы (Янус-киназы), которые фосфорилируют белок IRS-2 (субстрат рецептора инсулина 2), также запуская PI3K-Akt-зависимый сигнальный путь [34, 35]. Фосфорилирование Akt-киназы одновременно активирует MAPK и STAT3 (белок сигнальной трансдукции и активатор транскрипции 3), димер которого дополнительно активирует NF- κ B [21]. Следовательно, лептин может усиливать IDO-индуцирующее действие ЛПС через PI3K, MAPK и STAT3, что объясняет полученный нами результат.

Влияние грелина на созревание и толерогенную функцию ДК. Присутствие грелина при созревании ДК в концентрации, характерной для беременности, снижает экспрессию CD86 на

CD1c⁺ДК, но не влияет на количество CD83⁺CD1c⁺ДК и HLA-DR⁺CD1c⁺ДК (рис. 2, табл. 1). Учитывая, что CD86 является коstimулирующей молекулой, необходимой для взаи-

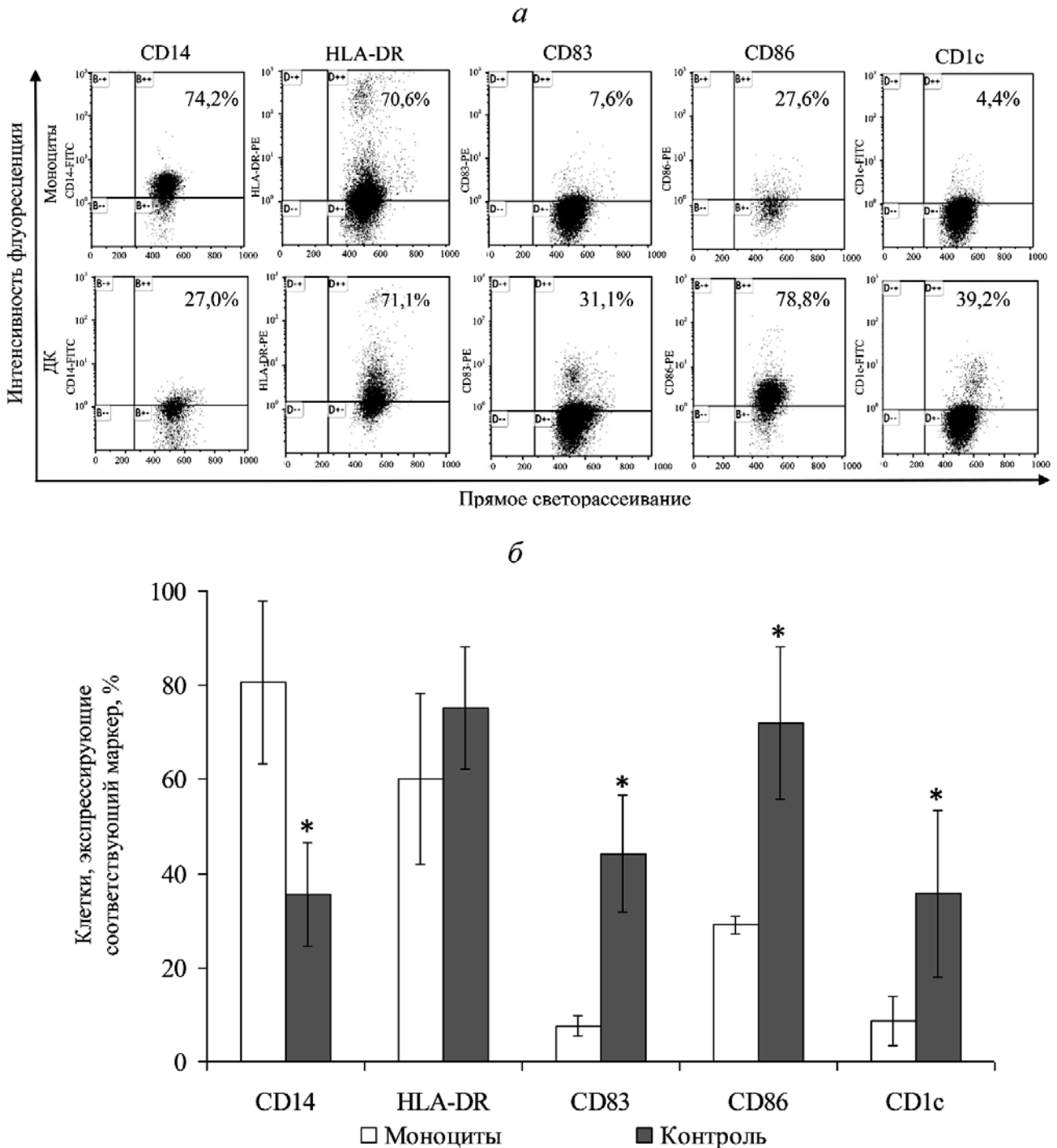


Рис. 1. Экспрессия мембранных молекул CD14, HLA-DR, CD83, CD86 и CD1c на моноцитах и зрелых ДК, полученных из моноцитов с помощью стимуляции IL-4 и GM-CSF с последующей активацией ЛПС. *a* – Гистограммы, характеризующие экспрессию мембранных молекул (приведены гистограммы одного эксперимента); *b* – на диаграмме данные представлены в виде средних арифметических значений и их стандартных ошибок ($M \pm m$); $n = 10$; исследуемые группы – Моноциты и Контроль (зрелые ДК); * различия статистически значимы ($p < 0,05$) согласно парному *t*-критерию Стьюдента по отношению к контролю

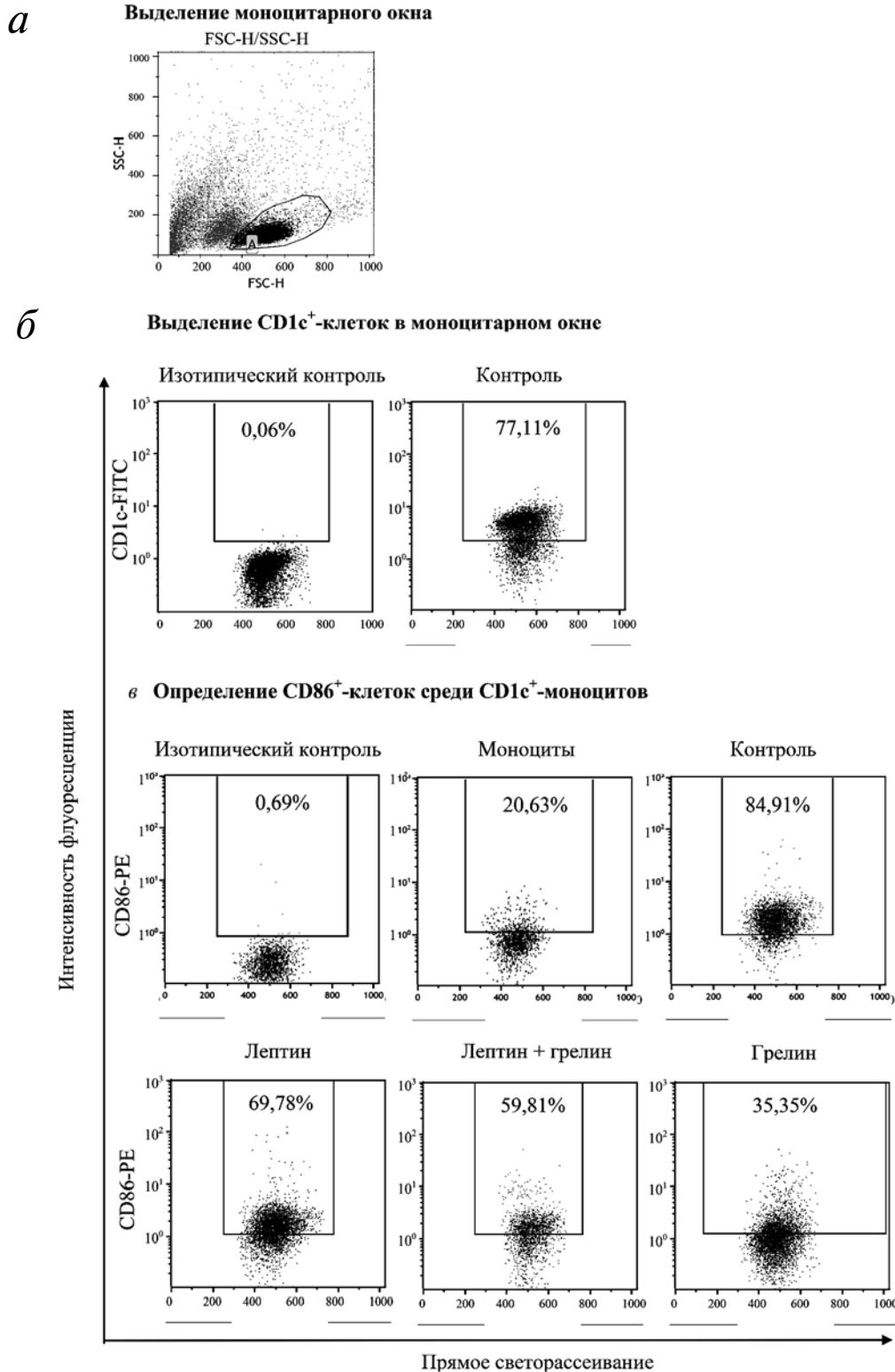


Рис. 2. Гистограммы, характеризующие стратегию гейтирования (*а*, *б*) и определения экспрессии CD86 на CD1c⁺ДК под влиянием гормонов (*в*), представлены гистограммы одного эксперимента; *б* – изотипический контроль, по оси ординат – Mouse IgG1 карма-FITC; *в* – изотипический контроль, по оси ординат – Mouse IgG2b-PE. Зрелые ДК получали из моноцитов периферической крови с помощью стимуляции IL-4 и GM-CSF с последующей активацией ЛПС. Контроль – зрелые ДК; лептин – зрелые ДК, культивировавшиеся в присутствии лептина (35 нг/мл); лептин + грелин – зрелые ДК, культивировавшиеся в присутствии комбинации лептина (35 нг/мл) и грелина (1,25 нг/мл); грелин – зрелые ДК, культивировавшиеся в присутствии грелина (1,25 нг/мл)

Таблица 1. Влияние лептина и грелина на экспрессию мембранных молекул CD1c⁺ДК, генерированных в присутствии гормонов

Экспериментальное воздействие	HLA-DR ⁺ в гейте CD1c ⁺ ДК, %	CD83 ⁺ в гейте CD1c ⁺ ДК, %	CD86 ⁺ в гейте CD1c ⁺ ДК, %
Моноциты	59,6 (46,7–63,1), <i>p</i> = 0,011*	33,0 (31,9–34,8), <i>p</i> = 0,004*	20,6 (18,2–25,4), <i>p</i> = 0,006*
Контроль	73,7 (66,4–75,6)	75,3 (69,1–80,6)	70,6 (59,1–84,9)
Лептин (35 нг/мл)	76,9 (71,5–82,4)	79,9 (64,2–91,1)	69,8 (56,5–88,0)
Лептин (35 нг/мл) + грелин (1,25 нг/мл)	79,9 (68,0–84,4)	74,8 (71,1–79,0)	63,3 (36,2–72,6), <i>p</i> = 0,023*
Грелин (1,25 нг/мл)	72,5 (61,1–78,2)	77,3 (72,0–81,2)	47,1 (35,3–77,5), <i>p</i> = 0,022*

Примечание. Данные представлены в виде медианы с нижней и верхней квартилью. Моноциты – проба моноцитов, культивировавшихся без внесения IL-4, GM-CSF и ЛПС. Зрелые ДК получали из моноцитов периферической крови с помощью стимуляции IL-4 и GM-CSF с последующей активацией ЛПС. Контроль – зрелые ДК; лептин (35 нг/мл) – зрелые ДК, культивировавшиеся в присутствии лептина (35 нг/мл); лептин (35 нг/мл) + грелин (1,25 нг/мл) – зрелые ДК, культивировавшиеся в присутствии комбинации лептина (35 нг/мл) и грелина (1,25 нг/мл); грелин (1,25 нг/мл) – зрелые ДК, культивировавшиеся в присутствии грелина (1,25 нг/мл).

* Различия статистически значимы по критерию Уилкоксона для парных зависимых выборок по отношению к контролю (*n* = 10).

Таблица 2. Влияние лептина и грелина на количество и ЛПС-индуцированную активность IDO, уровень внутриклеточного сАМР в ДК, генерированных в присутствии гормонов

Экспериментальное воздействие	Концентрация кинуренина, мкМ	IDO, пг/мл	сАМР, пМ/мл (10 ⁶ клеток)
Контроль	2,24 ± 0,17	1,60 ± 0,04	0,89 ± 0,12
Лептин (35 нг/мл)	6,06 ± 2,07, <i>p</i> = 0,02*	1,73 ± 0,07, <i>p</i> = 0,023*	1,06 ± 0,11
Лептин (35 нг/мл) + грелин (1,25 нг/мл)	6,13 ± 1,22, <i>p</i> = 0,005*	1,47 ± 0,13	1,10 ± 0,11
Грелин (1,25 нг/мл)	4,64 ± 1,47	1,03 ± 0,15, <i>p</i> = 0,002*	1,23 ± 0,09, <i>p</i> = 0,01*

Примечание. Результаты представлены в виде средних арифметических значений и их стандартных ошибок (*M* ± *m*). Пояснения по обозначениям см. в Примечании к табл. 1.

* Различия статистически значимы по парному *t*-критерию Стьюдента по отношению к контролю (*n* = 10).

модействия с CD28 на Т-лимфоцитах и усиления активирующего сигнала, можно полагать, что действие грелина при беременности будет способствовать снижению активации Т-лимфоцитов или их анергии.

Исследование действия гормона на активность и внутриклеточный уровень IDO в ДК показало, что присутствие грелина при созревании ДК, в отличие от лептина, не влияет на ЛПС-стимулированную активность IDO, но снижает количество молекул фермента в ДК (табл. 2). Данный эффект грелина связан с повышением концентрации внутриклеточного сАМР. Корреляционный анализ показал, что грелин препятствует увеличению количества IDO пропорционально повышению уровня внутриклеточного сАМР, поскольку была выявлена обратная связь между снижением количества IDO под действием грелина и повышением концентрации сАМР

(*r* = -0,95; *p* < 0,05). Известно, что взаимодействие грелина с GHS-R, который относится к GqPCR (рецептор, сопряженный с белком Gq), приводит к активации PLC (фосфолипаза C) и гидролизу PIP₂ (фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат) до IP₃ (инозитол-1,4,5-трифосфат), повышающего концентрацию ионов Ca²⁺ [36–38]. Другим продуктом гидролиза PIP₂ является DAG (диацилглицерол) [36–38], который индуцирует последовательный активационный каскад PKC (протеинкиназа C), MAPK (JNK/p38/ERK1/II) и фосфорилирование CREB (белок, связывающий сАМР-чувствительный элемент) [36–39]. CREB запускает транскрипцию и образование SOCS3 (супрессор трансдукции сигнала цитокинов 3), который, связываясь с ITIM2-доменом IDO (ITIM2 – ингибирующий фосфорилирование мотив тирозина 2), вызывает протеасомную деградацию молекул IDO [40, 41]. Уве-

личение уровня внутриклеточного сАМР под действием грелина, по-видимому, объясняется способностью $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (кальмодулин) активировать Ас [42]. Повышение уровня сАМР в клетке активирует РКА (протеинкиназа А) и ЕРАС (сАМР-связывающий белок), что также усиливает образование SOCS3 [42]. Помимо этого CaM стимулирует активность АМРК (АМР-активируемая протеинкиназа) [43], что также приводит к образованию активного CREB. Таким образом, снижение ЛПС-индуцированной экспрессии IDO под действием грелина в ДК можно объяснить сАМР-CREB-SOCS3-опосредованной протеасомной деградацией фермента [44]. По-видимому, SOCS3-зависимый механизм определяет и снижение экспрессии CD86 на CD1c⁺ДК, созревающих в присутствии грелина. По данным литературы, SOCS3 может как непосредственно индуцировать протеасомную деградацию самой молекулы CD86, так и усиливать деградацию активированных транскрипционных факторов, ответственных за ее экспрессию [45, 46].

Совместное влияние лептина и грелина на процессы созревания и функции ДК. Клетки крови одновременно испытывают действие большого количества сигнальных молекул, присутствующих в периферической крови, поэтому анализ совместных эффектов гормонов, особенно гормональной антагонистической пары, приближает нас к пониманию физиологической ситуации при беременности. Установлено, что одновременно присутствие лептина и грелина при созревании ДК в концентрациях, характерных для беременности, снижает экспрессию CD86 на CD1c⁺ДК, но не влияет на количество CD83⁺CD1c⁺ДК и HLA-DR⁺CD1c⁺ДК (рис. 2, табл. 1). По данным корреляционного анализа именно эффекты грелина ($r = 0,75$; $p < 0,05$) определяют уменьшение количества CD86⁺CD1c⁺ДК при совместном действии гормонов. Как отмечалось ранее, грелин способен снижать экспрессию CD86⁺ на CD1c⁺ДК путем сАМР-зависимой активации CREB/SOCS3, что реализуется и при совместном действии гормонов [39, 40].

Анализ действия комбинации лептина и грелина на активность и количество IDO в ДК показал, что присутствие гормонов при созревании ДК не оказывает модулирующих эффектов на количество IDO, но повышает ЛПС-стимулированную активность IDO в ДК, что сопровождается увеличением содержания кинуренина (табл. 2). По данным корреляционного анализа именно эффекты лептина ($r = 0,95$; $p < 0,05$) определяют увеличение ЛПС-стимулированной активности IDO при совместном внесении гормонов. Можно полагать, что в присутствии гре-

лина лептин сохраняет только эффект активации IDO, поскольку действие грелина будет препятствовать лептин-индуцированному синтезу новых молекул фермента за счет их грелин-SOCS3-индуцированной протеасомной деградации [39, 40]. Высказанное предположение согласуется с данными литературы о том, что грелин способен значительно ингибировать лептин-индуцированное фосфорилирование STAT3 путем Ерас-зависимой активации SOCS3 [39, 40]. При этом уровень внутриклеточного сАМР при совместном присутствии гормонов в процессе созревания ДК статистически значимо не меняется (табл. 2). Известно, что лептин способен снижать уровень сАМР за счет активации PI3K, продукт которой, PIP₃ (фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат), стимулирует Akt, фосфорилирующую PDE3B (мембраноассоциированную фосфодиэстеразу 3B) [47]. Данный эффект лептина объясняет отсутствие повышения уровня внутриклеточного сАМР при совместном действии гормонов. По-видимому, при совместном действии гормонов для грелина доминирующим становится РКС-МАРК-зависимый путь фосфорилирования CREB и активации SOCS3.

Несмотря на то что лептин и грелин разнонаправленно регулируют основные функции ДК, при совместном воздействии гормонов сохраняется стимулирующий эффект лептина на ЛПС-индуцированную активность IDO и угнетающий эффект грелина на экспрессию костимулирующей молекулы CD86 на CD1c⁺ДК. На рис. 3 представлены возможные механизмы гормонального контроля антагонистической пары за процессами созревания и функциональной активности IDO ДК.

Полученные результаты расширяют и дополняют наши представления о механизмах участия лептина и грелина в регуляции функциональной активности ДК при беременности и формировании иммунной толерантности в целом. При нормально протекающей беременности именно совместное действие физиологических концентраций лептина и грелина в периферической крови способствует активации IDO-зависимого механизма индукции периферической толерантности с участием ДК и преимущественным формированием iTreg. Расшифровка молекулярных механизмов взаимодействия лептина и грелина перспективна для фармакологической коррекции направленности дифференцировки ДК, а также может быть использована в качестве эффективного подхода для усиления индукции специфической толерантности к антигенам гистосовместимости донора, реципиента или к собственным антигенам.

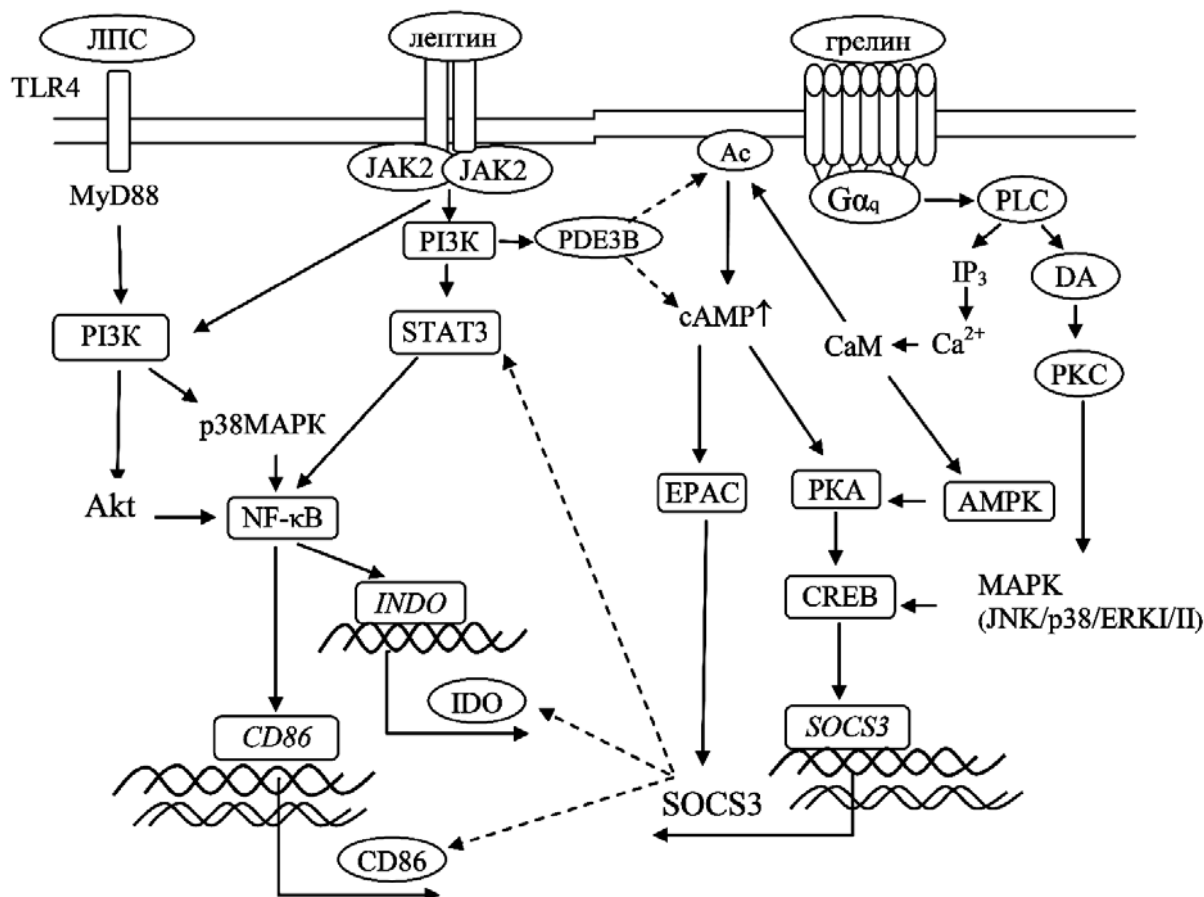


Рис. 3. Гипотетическая схема реализации эффектов комбинации лептина и грелина в регуляции экспрессии CD86, количества и ЛПС-стимулированной активности IDO в ДК. Сплошные стрелки – стимулирующий эффект, пунктирные стрелки – ингибирующий эффект

Финансирование

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 13-04-00571).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gregori, S. (2011) Dendritic cells in networks of immunological tolerance, *Tissue Antigens*, **77**, 89–99.
- Braun, D., Longman, R.S., and Albert, M.L. (2005) A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation, *Blood*, **106**, 2375–2381.
- Koldehoff, M., and Elmaagacli, A.H. (2013) Thoughts on feto-maternal tolerance: is there a lesson to be learned from allogeneic haematopoietic stem cell transplantation? *Cell. Biol. Int.*, **37**, 766–767.
- Miwa, N., Hayakawa, S., Miyazaki, S., Myojo, S., Sasaki, Y., Sakai, M., Takikawa, O., and Saito, S. (2005) IDO expression on decidual and peripheral blood dendritic cells and monocytes/macrophages after treatment with CTLA-4 or interferon- γ increase in normal pregnancy but decrease in spontaneous abortion, *Mol. Hum. Reprod.*, **11**, 865–870.
- Kamimura, S., Eguchi, K., Yonezawa, M., and Sekiba, K. (1991) Localization and developmental change of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in the human placenta, *Acta Med. Okayama*, **45**, 135–139.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Vacca, C., Bianchi, R., Orabona, C., Fioretti, M.C., and Puccetti, P. (2002) T cell apoptosis by tryptophan catabolism, *Cell. Death Differ.*, **9**, 1069–1077.
- Munn, D.H., Zhou, M., Attwood, J.T., Bondarev, I., Conway, S.J., Marshall, B., Brown, C., and Mellor, A.L. (1998) Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism, *Science*, **281**, 1191–1193.
- Baban B., Chandler, P.R., Sharma, M.D., Pihkala, J., Koni, P.A., Munn D.H., and Mellor, A.L. (2009) IDO activates regulatory T cells and blocks their conversion into Th17-like T cells, *J. Immunol.*, **183**, 2475–2483.
- Kudo, Y., Boyd, C.A., Sargent, I.L., and Redman, C.W. (2001) Tryptophan degradation by human placental indoleamine 2,3-dioxygenase regulates lymphocyte proliferation, *J. Physiol.*, **535**, 207–215.

10. Tena-Sempere, M. (2013) Interaction between energy homeostasis and reproduction: effects of leptin and ghrelin on the reproductive axis, *Horm. Metab. Res.*, **45**, 919–927.
11. Fantuzzi, G., and Faggioni, R. (2000) Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis, *J. Leukoc. Biol.*, **68**, 437–446;
12. Dixit, V.D., Schaffer, E.M., Pyle, R.S., Collins, G.D., Sakthivel, S.K., Palaniappan, R., Lillard, J.W., and Taub, D.D. (2004) Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human T cells, *J. Clin. Invest.*, **1**, 57–66.
13. Ширшев С.В. (2014) Молекулярные механизмы гормонального и гормонально-цитокинового контроля иммунной толерантности при беременности, *Биол. мембраны*, **31**, 303–322.
14. Орлова Е.Г., Ширшев С.В., Логинова О.А. (2015) Лептин и грелин регулируют созревание дендритных клеток, индуцирующих формирование регуляторных Т-лимфоцитов, *Доклады Академии наук*, **462**, 723–726.
15. Orlova, E.G., and Shirshov, S.V. (2017) Role of PKA and PI3K in leptin and ghrelin regulation of adaptive subpopulations of regulatory CD4⁺ T-lymphocyte formation, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1061–1072.
16. Орлова Е.Г., Ширшев С.В. (2013) Роль лептина и грелина в индукции дифференцировки ИЛ17-продуцирующих и Т-регуляторных лимфоцитов, *БЭБИМ*, **156**, 786–791.
17. Mattioli, B., Straface, E., Quaranta M.G., Giordani, L., and Viora, M. (2005) Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for Th1 priming, *Immunol.*, **174**, 6820–6828.
18. Mattioli, B., Giordani, L., Quaranta, M.G., and Viora, M. (2009) Leptin exerts an anti-apoptotic effect on human dendritic cells via the PI3K-Akt signaling pathway, *FEBS Lett.*, **583**, 1102–1106.
19. Faggioni, R. Fantuzzi, G., Fuller, J., Feingold, K.R., and Grunfeld, C. (1998) IL-1 β mediates leptin induction during inflammation, *Am. J. Physiol.*, **274**, 204–208.
20. Komori, T., Doi, A., Furuta, H., Wakao, H., Nakao, N., Nakazato, M., Senba, E., and Morikawa, Y. (2010) Regulation of ghrelin signaling by a leptin-induced gene, negative regulatory element-binding protein, in the neurons, *J. Biol. Chem.*, **285**, 37884–37894.
21. Lam, Q.L., Zheng, B.J., Jin, D.Y., and Lu, L. (2007) Leptin induces CD40 expression through the activation of Akt in murine dendritic cells, *J. Biol. Chem.*, **282**, 27587–27597.
22. Ширшев С.В., Орлова Е.Г. (2011) Регуляция лептином и грелином активности ИДО моноцитов, *Вестник Уральской мед. академии науки*, **38**, 161–162.
23. Ширшев С.В. (2010) цАМФ-зависимые механизмы эндокринного контроля иммунной системы при беременности, *Успехи соврем. биологии*, **130**, 26–30.
24. Amarillyo, G., Iikuni, N., Liu, A., Matarese, G., and La Cava, A. (2014) Leptin enhances availability of apoptotic cell-derived self-antigen in systemic lupus erythematosus, *PLoS One*, **9**, e112826.
25. Sahu, M., Ananthathmakula, P., and Sahu, A. (2015) Phosphodiesterase-3B-cAMP pathway of leptin signalling in the hypothalamus is impaired during the development of diet-induced obesity in FVB/N mice, *J. Neuroendocrinol.*, **27**, 293–302.
26. Talayev, V.Y., Matveichev, A.V., Lomunova, M.A., Talayeva, M.V., Tsaturov, M.E., Zaichenko, I.Y., and Babaykina, O.N. (2010) The effect of human placenta cytotrophoblast cells on the maturation and T cell stimulating ability of dendritic cells *in vitro*, *Clin. Exp. Immunol.*, **162**, 91–99.
27. Hardie, L., and Trayhurn, P. (1997) Circulating leptin in women: longitudinal study in menstrual cycle and during pregnancy, *Clin. Endocrinol.*, **47**, 101–106.
28. Fuglsang, J., Skjaerbaek, C., Espelund, U., Frystyk, J., Fisker, S., Flyvbjerg, A., and Ovesen, P. (2005) Ghrelin and its relationship to growth hormones during normal pregnancy, *Clin. Endocrinol.*, **62**, 554–559.
29. Dzionek, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D.W., and Schmitz, J.J. (2000) BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood, *J. Immunol.*, **165**, 6037–6046.
30. Jung, I.D., Lee, C.M., Jeong, Y.I., Lee, J.S., Han, J., and Park, Y.M. (2007) Differential regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide and interferon gamma in murine bone marrow derived dendritic cells, *FEBS Lett.*, **581**, 1449–1456.
31. Moraes-Vieira, P.M., Larocca, R.A., Bassi, E.J., Peron, J.P., Andrade-Oliveira, V., Wasinski, F., Araujo, R., Thornley, T., Quintana, F.J., Basso, A.S., Strom, T.B., and Camara, N.O. (2014) Leptin deficiency impairs maturation of dendritic cells and enhances induction of regulatory T and Th17 cells, *Eur. J. Immunol.*, **44**, 794–806.
32. Hwang, S.L., Chung, N.P., Chan, J.K., and Lin, C.L. (2005) Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is essential for dendritic cell activation and chemotactic responsiveness to chemokines, *Cell Res.*, **15**, 167–175.
33. Fujigaki, H., Saito, K., Fujigaki, S., Takemura, M., Sudo, K., Ishiguro, H., and Seishima, M. (2006) The signal transducer and activator of transcription 1 α and interferon regulatory factor 1 are not essential for the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- κ B pathways, and synergistic effect of several proinflammatory cytokines, *J. Biochem.*, **139**, 655–662.
34. Borges, B.C., Garcia-Galiano, D., Rorato, R., Elias, L.L., and Elias, C.F. (2016) PI3K p110 β subunit in leptin receptor expressing cells is required for the acute hypophagia induced by endotoxemia, *Mol. Metab.*, **5**, 379–391.
35. Niswender, K.D., Gallis, B., Blevins, J.E., Corson, M.A., Schwartz, M.W., and Baskin, D.G. (2003) Immunocytochemical detection of phosphatidylinositol 3-kinase activation by insulin and leptin, *J. Histochem. Cytochem.*, **3**, 275–283.
36. Mrak, E., Casati, L., Pagani, F., Rubinacci, A., Zarattini, G., and Sibilia, V. (2015) Ghrelin increases β -catenin level through protein kinase A activation and regulates OPG expression in rat primary osteoblasts, *Int. J. Endocrinol.*, 547473.
37. Kola, B., Hubina, E., Tucci, S.A., Kirkham, T.C., Garcia, E.A., Mitchell, S.E., Williams, L.M., Hawley, S.A., Hardie, D.G., Grossman, A.B., and Korbonits, M. (2005) Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase, *J. Biol. Chem.*, **280**, 25196–25201.
38. Schellekens, H., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2013) Taking two to tango: a role for ghrelin receptor heterodimerization in stress and reward, *Front. Neurosci.*, **7**, 148.
39. Fujitsuka, N., Asakawa, A., Morinaga, A., Amitani, M.S., Amitani, H., Katsuura, G., Sawada, Y., Sudo, Y., Uezono, Y., Mochiki, E., Sakata, I., Sakai, T., Hanazaki, K.H., Asaka, M., and Inui, A. (2016) Increased ghrelin signaling prolongs survival in mouse models of human aging through activation of sirtuin1, *Mol. Psychiatry*, **21**, 1613–1623.
40. Yu, J., Wang, Y., Yan F., Zhang, P., Li, H., Zhao, H., Yan, C., Yan, F., and Ren, X. (2014) Noncanonical NF- κ B activation mediates STAT3-stimulated IDO upregulation in myeloid-derived suppressor cells in breast cancer, *J. Immunol.*, **193**, 2574–2586.
41. Heldsinger, A., Grabauskas, G., Wu, X., Zhou, S., Song, I., and Owyang, C. (2014) Ghrelin induces leptin resistance

- by activation of suppressor of cytokine signaling 3 expression in male rats: implications in satiety regulation, *Endocrinology*, **155**, 3956–3969.
42. Ferguson, G.D., and Daniel, R.S. (2004) Why calcium-stimulated adenylyl cyclases? *Physiology*, **19**, 271–276.
 43. Bayliss, J.A., Lemus, M.B., Stark, R., Santos, V.V., Thompson, A., Rees, D.J., Galic, S., Elsworth, J.D., Kemp, B.E., Davies, J.S., and Andrews, Z.B. (2016) Ghrelin-AMPK signaling mediates the neuroprotective effects of calorie restriction in Parkinson's disease, *J. Neurosci.*, **36**, 3049–3063.
 44. Orabona, C., Pallotta, M.T., Volpi, C., Fallarino, F., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Grohmann, U., and Puccetti, P. (2008) SOCS3 drives proteasomal degradation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and antagonizes IDO-dependent tolerogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 20828–20833.
 45. Baravalle, G., Park, H., McSweeney, M., Ohmura-Hoshino, M., Matsuki, Y., Ishido, S., and Shin, J.S. (2011) Ubiquitination of CD86 is a key mechanism in regulating antigen presentation by dendritic cells, *J. Immunol.*, **187**, 2966–2973.
 46. Ardeshtna, K.M., Pizzey, A.R., Devereux, S., and Khwaja, A. (2000) The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF- κ B signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells, *Blood*, **96**, 1039–1046.
 47. Fruhbeck, G. (2006) Intracellular signalling pathways activated by leptin, *Biochem. J.*, **393**, 7–20.

MECHANISMS OF LEPTIN AND GHRELIN ACTION ON MATURATION AND FUNCTIONS OF DENDRITIC CELLS

E. G. Orlova*, S. V. Shirshev, and O. A. Loginova

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,
Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 614081 Perm,
Russia; E-mail: orlova_katy@mail.ru*

Received July 3, 2018

Revision received September 17, 2018

Accepted September 17, 2018

Molecular mechanisms of the immunomodulatory effects of leptin and ghrelin in concentrations typical for pregnancy on the maturation and functional activity of dendritic cells (DCs) generated from the peripheral blood monocytes of women are investigated. The presence of leptin during DC maturation did not affect the levels of CD83⁺CD1c⁺, CD86⁺CD1c⁺, and HLA-DR⁺CD1c⁺ DCs but increased the amount and the activity of the enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO). Cell culturing in the presence of ghrelin or combination of leptin and ghrelin reduced the percentage of CD86⁺CD1c⁺ DCs but did not affect the levels of CD83⁺CD1c⁺ and HLA-DR⁺CD1c⁺ DCs. In addition, ghrelin reduced the number of IDO molecules without affecting its activity. Simultaneous presence of leptin and ghrelin increased induced IDO activity without affecting the amount of the enzyme in DCs. The effects of leptin and ghrelin on the investigated functions of DCs in some cases correlated with high levels of cAMP. New mechanisms of leptin and ghrelin regulation of tolerogenic functions of DCs in pregnancy are proposed.

Keywords: leptin, ghrelin, pregnancy, dendritic cells, IDO, cAMP