

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КОНТРОЛЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ ЭКЗОГЕННЫМ МЕЛАТОНИНОМ

Н. С. Глебездина^{1,*}, А. А. Олина², И. В. Некрасова¹, Е. М. Куклина¹

Представлено академиком РАН В.А. Черешневым 04.07.2018 г.

Поступило 17.07.2018 г.

Исследовали роль эпифизарного гормона мелатонина в дифференцировке наивных Т-лимфоцитов CD4⁺ в регуляторные Т-клетки (Treg). Гормон в физиологической и в фармакологических концентрациях ингибировал дифференцировку Treg, снижая как долю клеток CD4⁺FOXP3⁺ в культуре, так и уровень ключевого для данной Т-клеточной субпопуляции цитокина — TGF-β. Ингибирующее влияние экзогенного мелатонина было обусловлено его взаимодействием с мембранными рецепторами MT1 и MT2. В то же время сигналы, реализуемые через ядерный рецептор для мелатонина, RORα, стимулировали формирование Treg, но они были значительно слабее сигнала от мембранных рецепторов и перекрывались последним. Поскольку субпопуляция Treg играет важную роль в физиологических и патологических процессах в организме, выявленные нами эффекты мелатонина должны учитываться при его терапевтическом использовании.

Ключевые слова: дифференцировка, Т-лимфоциты, Treg, мелатонин, мелатониновые рецепторы, MT1, MT2, RORα.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524842224-227>

Гормон шишковидной железы мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамиин) является важнейшим компонентом нейроэндокринной системы. Обладая плеiotропными эффектами, такими как контроль биологических ритмов, сна, артериального давления, а также антиоксидантной и антистрессовой активностью [1, 2], мелатонин имеет существенную потенциальную клиническую значимость. В то же время гормон способен эффективно регулировать иммунную систему: практически все основные типы иммунных клеток экспрессируют рецепторы для мелатонина [2] и чувствительны к его действию [3]. Как следствие, существенные и устойчивые изменения уровня гормона в крови, наблюдаемые в случае применения мелатонина в качестве фармакологического препарата, должны вносить существенный вклад в регуляцию иммунного ответа организма.

Важнейшей потенциальной мишенью действия гормона в иммунной системе является субпопуляция регуляторных Т-лимфоцитов (Treg), контролирующая интенсивность и продолжительность

иммунного ответа и играющих ключевую роль в предупреждении развития аутоиммунных, аллергических процессов, реакций отторжения трансплантата [4, 5]. Treg экспрессируют два типа специфических мембранных рецепторов для мелатонина, MT1 и MT2 [6], а ключевой дифференцировочный фактор и маркер данной субпопуляции, FOXP3, находится под контролем транскрипционного фактора RORα [7], который также связывает мелатонин и рассматривается как ещё один ядерный рецептор для гормона [7, 8]. Поскольку все мелатониновые рецепторы имеют разную аффинность связывания гормона [2], регуляция Treg должна напрямую зависеть от концентрации мелатонина.

Целями настоящей работы был анализ роли экзогенного мелатонина в контроле дифференцировки Treg и оценка вклада конкретных мелатониновых рецепторов в реализацию эффектов этого гормона.

Объектами исследования служили лейкоциты здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста ($32,18 \pm 2,74$ года, $n = 11$). От всех доноров было получено информированное согласие на участие в работе. Дифференцировку фракционированных наивных Т-лимфоцитов CD4⁺ в Treg оценивали в 48-часовой культуре в спонтанном и стимулированном (анти-CD3/CD28, “Invitrogen”, США) вариантах по экспрессии клетками транскрипционного фактора FOXP3 проточной

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской Академии наук, Пермь

²Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург

*E-mail: glebezдина_n@mail.ru

цитометрией с помощью моноклональных анти-тел анти-CD4*FITC, анти-FOXP3*PE (“R&D Systems”, “BioLegend”, США), а также по продукции ключевого цитокина Treg, трансформирующего ростового фактора β (TGF- β), с помощью иммуноферментного анализа (“R&D Systems”). Мелатонин (“Sigma-Aldrich”, США) использовали в высокой физиологической концентрации 100 пг/мл [9], в фармакологических концентрациях 0,5 и 5 нг/мл (максимальные уровни мелатонина в периферической крови при использовании соответственно низкой и высокой терапевтических доз гормона в лечении бессонницы, депрессивных состояний [10]) и 200 нг/мл (максимальная концентрация мелатонина в периферической крови при использовании препаратов на основе гормона в противоопухолевой терапии [11]). Вклад конкретных мелатониновых рецепторов в реализацию эффектов экзогенного гормона определяли ингибиторным анализом с использованием для мембранных рецепторов соответствующих антагонистов — неселективного (luzindole — для MT1/MT2) и селективного (4-P-PDOT — для MT2). Оба антагониста производства “Tocris Bioscience”, Великобритания. А для ядерного мелатонинового рецептора ROR α — три типа малых интерферирующих РНК (siРНК, “OriGene”, США), специфичных для ROR α , и скремблированную siРНК в качестве отрицательного контроля. Трансфекцию siРНК проводили с помощью липофектамина (“Invitrogen”). Эффективность трансфекции подтверждали оценкой экспрессии ROR α в клетках, определяя содержание мРНК полимеразной цепной реакцией (RT-qPCR) с помощью набора SingleShot™ SYBR® Green One-Step Kit (“Bio-Rad”, США), и белка — проточной цитометрией с использованием моноклональных антител анти-ROR α *PE (“R&D Systems”). При статистическом анализе полученных данных использовали парный критерий *t* Стьюдента.

Мелатонин в высокой физиологической концентрации подавлял дифференцировку Treg: число FOXP3-позитивных клеток достоверно снизилось через 48 ч культивирования стимулированных Т-лимфоцитов CD4⁺ (рис. 1). В условиях поликлональной активации Т-лимфоцитов данный показатель также статистически значимо снизился под действием гормона в фармакологической концентрации, равной 0,5 нг/мл (рис. 1). Выявленные эффекты подтвердились и снижением уровня TGF- β в культуральных супернатантах под действием мелатонина в концентрациях 100 пг/мл, 0,5 и 5 нг/мл (рис. 2).

Оценка вклада мембранных мелатониновых рецепторов в реализацию выявленных эффектов гормона показала, что подавление

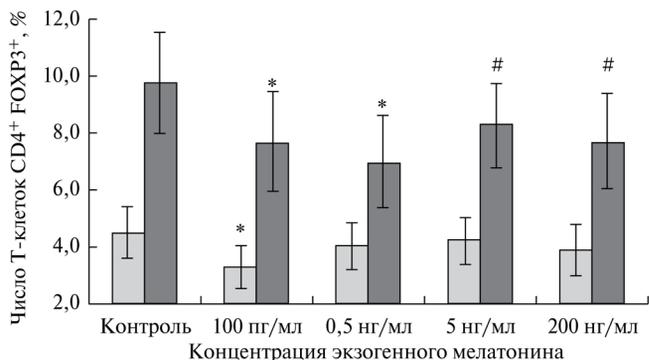


Рис. 1. Регуляция экзогенным мелатонином *in vitro* экспрессии FOXP3 интактными и активированными Т-лимфоцитами CD4⁺. Заштрихованные столбцы — доля Т-клеток CD4⁺FOXP3⁺ в процентах от общего числа клеток, тёмные столбцы — доля активированных Т-клеток CD4⁺FOXP3⁺ в процентах. Здесь и на рис. 2 $M \pm m$, $n = 11$, * $p < 0,05$ по сравнению с контролем; # $p < 0,05$ при сравнении с соответствующим показателем для интактных Т-лимфоцитов CD4⁺.

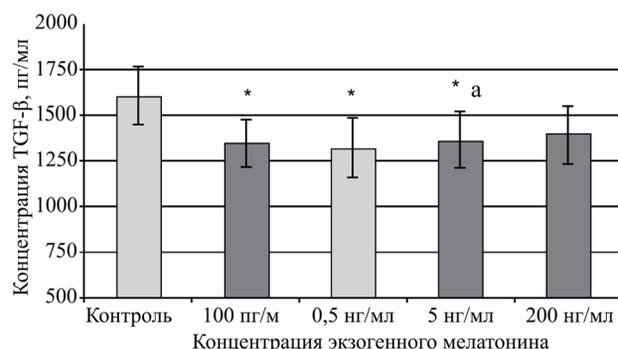


Рис. 2. Изменение концентрации TGF- β в культуральных супернатантах активированных Т-лимфоцитов CD4⁺ при действии экзогенного мелатонина. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем, ^a $p < 0,05$ при сравнении с соответствующим показателем для дозы 0,5 нг/мл.

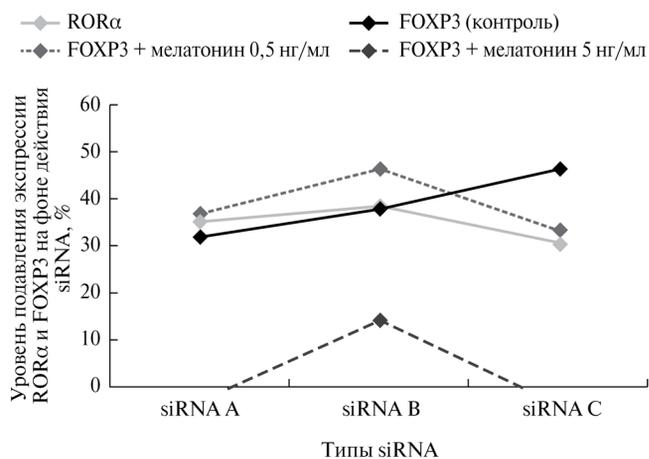


Рис. 3. Снижение уровня Т-клеток CD4⁺FOXP3⁺ в культуре на фоне подавления экспрессии ROR α с помощью специфичных siРНК.

Таблица 1. Роль мембранных рецепторов MT1 и MT2 в реализации эффектов мелатонина в отношении дифференцировки Т-клеток CD4⁺ в Treg in vitro

Экспериментальные условия		Концентрация мелатонина в культуре		
		Контроль/ ингибитор	0,5 нг/мл	5 нг/мл
Процент клеток CD4 ⁺ FOXP3 ⁺ в культуре активированных Т-лимфоцитов	Без блокады MT1/MT2	9,77 ± 1,78	7,00 ± 1,46*	8,30 ± 1,68
	С блокадой MT1/MT2 (Luzindole)	6,82 ± 2,17	6,98 ± 1,98	7,55 ± 1,99
	С блокадой MT2 (4-P-PDOT)	7,11 ± 2,03	7,79 ± 2,14	6,99 ± 1,78
Концентрация TGF-β в супернатантах культуры активированных Т-клеток CD4 ⁺ , пг/мл	Без блокады MT1/MT2	1606,24 ± 157,74	1319,20 ± 159,26*	1363,24 ± 159,58*
	С блокадой MT1/MT2 (Luzindole)	1451,05 ± 151,41	1427,88 ± 151,76	1341,80 ± 145,78
	С блокадой MT2 (4-P-PDOT)	1428,29 ± 169,36	1263,43 ± 153,40	1295,89 ± 144,24

$M \pm m, n = 11, *p < 0,05$ при сравнении с контролем.

дифференцировки Treg фармакологическими концентрациями гормона 0,5 и 5 нг/мл отменялось на фоне неселективной блокады MT1/MT2 и селективного ингибирования MT2. Эти данные указывают на ключевую роль MT2 в реализации ингибиторных эффектов мелатонина в отношении дифференцировки Treg, хотя не исключено участие в этом процессе и MT1 (табл. 1).

При подавлении экспрессии внутриклеточного рецептора RORα все три варианта использованных siРНК, специфичных к мРНК RORα, показали свою эффективность: контроль — $1,10 \pm 0,27$ (процент Т-клеток CD4⁺RORα⁺, здесь и далее $M \pm m, n = 5$), siРНК А — $0,77 \pm 0,16$; siРНК В — $0,87 \pm 0,25$; siРНК С — $0,82 \pm 0,18$. Учитывая высокую вариабельность показателей между донорами, полученные результаты выражали в процентах подавления экспрессии RORα и маркера дифференцировки Treg, FOXP3. Как видно из рис. 3, снижение уровня клеток CD4⁺FOXP3⁺ в культуре при действии мелатонина в концентрации 0,5 нг/мл усиливалось на фоне siРНК, причём имела место та же закономерность, что и для RORα: максимальное подавление экспрессии обоих факторов мы зарегистрировали на фоне siРНК В, минимальное — на фоне siРНК С. Эти данные указывают на то, что RORα-зависимые эффекты мелатонина, используемого в этой концентрации, являются стимулирующими для Treg. В отличие от этого в реализации действия мелатонина в концентрации 5 нг/мл RORα практически не участвует: его инактивация не сопровождалась заметным изменением уровня клеток CD4⁺FOXP3⁺ в культуре, хотя для обоих факторов изменения носили однотипный характер (рис. 3). Следует отметить, что ряд исследователей

[12] ставит под сомнение способность RORα непосредственно связывать мелатонин и, соответственно, выступать в качестве рецептора для гормона, основываясь на данных кристаллографического анализа. Однако эти данные противоречат более ранним работам, в которых с помощью классического скетчардовского анализа была определена аффинность связывания RORα с мелатонином [8]. Что касается настоящей работы, вопрос о том, регулирует ли мелатонин RORα напрямую или такая регуляция опосредуется другими факторами, не принципиален: способность гормона регулировать активность RORα показана в различных системах [13], и мы исследовали такую регуляцию в Т-лимфоцитах.

В целом полученные результаты указывают на способность мелатонина в высокой физиологической и в фармакологических концентрациях ингибировать дифференцировку Treg, снижая как долю клеток CD4⁺FOXP3⁺, так и уровень ключевого для данной клеточной субпопуляции цитокина — TGF-β. При этом ингибирующие эффекты фармакологических концентраций мелатонина реализуются через мембранные рецепторы, в первую очередь через MT2. В то же время сигналы, реализуемые через ядерный рецептор RORα, стимулируют формирование Treg, но они значительно слабее сигналов с мембранных рецепторов и перекрываются последними. Это показано для концентрации мелатонина 0,5 нг/мл, тогда как в реализации ингибирующего эффекта посредством ядерного рецептора гормон в концентрации 5 нг/мл, по-видимому, не участвует. Обнаруженные нами эффекты мелатонина должны учитываться при решении вопроса о применении мелатонинзависимой терапии.

Данные литературы о связи мелатонина с активностью Treg немногочисленны и касаются в основном патологических состояний. Так, показано, что мелатонин вызывает значительное снижение численности Treg при его использовании в противоопухолевой терапии [14]. В то же время выявлено стимулирующее действие гормона в отношении Treg при аутоиммунных патологиях [15]. Данные противоречия, возможно, связаны с показанной в настоящей работе разнонаправленной регуляцией Treg мелатонином через мембранные и ядерный рецепторы, а также с зависимостью действия гормона от его концентрации.

Работа поддержана грантом РФФИ 16–34–60094 мол_а_дк.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hardeland R.* // *Sci. World J.* 2012. V. 8. P. 1–18.
2. *Ren W., Liu G., Chen S., et al.* // *J. Pineal Res.* 2017. V. 62. e12394.
3. *Carrillo-Vico A., Calvo J.R., Abreu P., et al.* // *FASEB J.* 2004. V. 18. № 3. P. 537–539.
4. *Kanamori M., Nakatsukasa H., Okada M., et al.* // *Trends Immunol.* 2016. V. 37. № 11. P. 803–811.
5. *Jeffery H.C., Braitch M.K., Brown S., Oo Y.H.* // *Front Immunol.* 2016. V. 7. P. 334.
6. *Slominski R.M., Reiter R.J., Schlabritz-Loutsevitch N., et al.* // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2012. V. 351. № 2. P. 152–166.
7. *Lardone P.J., Guerrero J.M., Fernandez-Santos J.M., et al.* // *J. Pineal Res.* 2011. V. 51. № 4. P. 454–462.
8. *Wiesenberg I., Missbach M., Kahlen J.P., et al.* // *Nucl. Acids Res.* 1995. V. 23. № 3. P. 327–333.
9. *Brzezinski A.* // *N. Engl. J. Med.* 1997. V. 336. № 3. P. 186–195.
10. *Gooneratne N.S., Edwards A.Y., Zhou C., et al.* // *J. Pineal Res.* 2012. V. 52. № 4. P. 437–445.
11. *Hill S.M., Blask D.E.* // *Cancer Res.* 1988. V. 48. № 21. P. 6121–6126.
12. *Slominski A.T., Michal A., Zmijewski M.A., Jetten A.M.* // *Bioessays.* 2016. V. 38. № 12. P. 1193–1194.
13. *Carrillo-Vico A., Lardone P.J., Alvarez-Sanchez N., et al.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. P. 8638–8683.
14. *Vinther A.G., Claesson H.C.* // *Int. J. Cancer Clin. Res.* 2015. V. 2. P. 1–4.
15. *Medrano-Campillo P., Sarmiento-Soto H., Alvarez-Sanchez N., et al.* // *J. Pineal Res.* 2015. V. 58. P. 219–226.

MOLECULAR MECHANISMS OF CONTROL OF DIFFERENTIATION OF REGULATORY T-LYMPHOCYTES BY EXOGENOUS MELATONIN

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

Presented by Academician of the RAS V.A. Chereshev July 4, 2018

Received July 17, 2018

We investigated the role of epiphyseal hormone melatonin in the differentiation of naive CD4⁺T cells into regulatory T cells (Treg). The hormone at physiological and pharmacological concentrations inhibited Treg differentiation, decreasing both the proportion of CD4⁺FOXP3⁺ cells in the culture and the level of TGF-β, the key cytokine for this T cell subpopulation. The inhibitory effect of exogenous melatonin was due to its interaction with the membrane receptors MT1 and MT2. At the same time, the signals realized through RORα — the nuclear receptor for melatonin — stimulated Treg formation; however, they were considerably weaker than the signals from the membrane receptors and were overlapped by the latter. Since the Treg subpopulation plays an important role in physiological and pathological processes in the body, the revealed effects of melatonin should be taken into account in its therapeutic use.

Keywords: differentiation, T-lymphocytes, Treg, melatonin, melatonin receptors, MT1, MT2, RORα.