

## ВЛИЯНИЕ ТЕСТОСТЕРОНА И $\beta$ -ЭСТРАДИОЛА НА АКТИВАЦИЮ Т-ЛИМФОЦИТОВ, АССОЦИИРОВАННУЮ С ПРОДУКЦИЕЙ IL-2 И ЭКСПРЕССИЕЙ CD25 (IL-2R $\alpha$ )

© А. А. Гуцол, Н. А. Сохоневич, К. А. Кофанова, Л. С. Литвинова<sup>1</sup>

Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта, Калининград;

<sup>1</sup>электронный адрес: larisalitvinova@yandex.ru

В исследовании *in vitro* получены данные, характеризующие эффекты тестостерона и  $\beta$ -эстрадиола на активацию наивных (CD45RA<sup>+</sup>) и примированных (CD45RO<sup>+</sup>) Т-лимфоцитов, ассоциированную с продукцией IL-2 и экспрессией молекулы CD25 (IL-2R $\alpha$ ). В целом влияние тестостерона на функциональную активность наивных и примированных Т-клеток носит угнетающий (тормозящий) характер. Наивные лимфоциты оказались более чувствительными к его действию, чем примированные. Обнаружено супрессорное дозозависимое влияние  $\beta$ -эстрадиола на продукцию IL-2 активированными CD45RA<sup>+</sup>- и CD45RO<sup>+</sup>-лимфоцитами при равномерном уменьшении числа CD25-позитивных Т-клеток.

**Ключевые слова:** тестостерон,  $\beta$ -эстрадиол, наивные Т-лимфоциты, примированные Т-лимфоциты памяти, активация клеток.

**Принятые сокращения:** МКАТ — моноклональные антитела, Ас/Exp — реагент T-Cell Activation/Expansion Kit human (активатор Т-лимфоцитов), CD — кластер дифференцировки, Est — эстрадиол, IL — интерлейкин, Test — тестостерон.

Оценка экспрессии поверхностных маркеров и анализ структурно-функциональных свойств клеток позволяют выделять наивные и примированные Т-лимфоциты (клетки иммунной памяти) (Laurie et al., 2008). Селективная экспансия и дифференцировка клонов антиген-специфических Т-клеток иммунной памяти определяют эффективность иммунного ответа на антигены различной природы (Kaech et al., 2002; Elyaman et al., 2008; Гуцол и др., 2013). Однозначным фенотипическим признаком дифференцировки наивных Т-лимфоцитов человека в Т-клетки памяти принято считать появление на поверхности клеток молекул CD45RO<sup>+</sup> взамен изоформы CD45RA<sup>+</sup> (Michie et al., 1992).

Нарушения формирования иммунной памяти, опосредованные гипер- или гипоактивацией Т-клеток, лежат в основе развития ряда заболеваний (Mizutani et al., 1995; Crotty, Ahmed, 2004; Learn et al., 2006; Гуцол и др., 2013; Литвинова и др., 2013). В связи с этим принципиально важно исследовать физиологические механизмы, лежащие в основе регуляции первичного и вторичного иммунных ответов. Половые гормоны являются одними из ключевых регуляторов иммунных реакций. Существуют доказательства того, что именно они влияют на способность зрелых эффекторных клеток к реализации иммунного ответа (Grossman et al., 1994; Селедцов и др., 2010; Литвинова и др., 2013). Активация Т-лимфоцитов (наивных и примированных) неразрывно связана с продукцией ими IL-2 и экспрессией раннего маркера активации лимфоцитов молекулы CD25 (IL-2R $\alpha$ ) (Johannisson, Festin, 1995). В настоящее время молекулярные механизмы дисрегуляции системы IL-2—IL-2R изучены недостаточно, а имеющиеся в литературе данные в рамках об-

суждаемой проблемы носят весьма неоднозначный характер.

Целью настоящего исследования явилась оценка дозозависимого влияния половых гормонов (тестостерона и  $\beta$ -эстрадиола) на экспрессию CD25 (IL-2R $\alpha$ ) и продукцию IL-2 в популяциях наивных (CD45RA<sup>+</sup>) и примированных (CD45RO<sup>+</sup>) Т-лимфоцитов *in vitro*.

### Материал и методика

Материалом исследования служила венозная кровь 22 условно здоровых доноров (13 мужчин и 9 женщин от 19 до 39 лет).

Выделение мононуклеарной фракции крови осуществляли методом центрифугирования в градиенте плотности (1.077 г/см<sup>3</sup>) Ficoll-Urografin (Schering, Испания; Pharmacia, Швеция).

Популяции наивных (CD45RA<sup>+</sup>) и примированных (CD45RO<sup>+</sup>) Т-лимфоцитов получали из выделенных мононуклеарных фракций крови методом иммуномагнитной сепарации (MidiMACS Separator, LS Columns, Miltenyi Biotec, Германия) с использованием моноклональных антител (МКАТ) к CD45RA<sup>+</sup> и CD45RO<sup>+</sup> с парамагнитными частицами (MicroBeads human, Miltenyi Biotec, Германия) согласно протоколу фирмы-изготовителя. Содержание целевых фракций CD45RA<sup>+</sup>- и CD45RO<sup>+</sup>-лимфоцитов в исследуемых образцах составляло не менее 95 %.

Далее клетки (1 млн кл./мл) культивировали в течение 48 ч в среде Искова (Sigma, США), содержащей 5·10<sup>-5</sup> М меркаптоэтанол (Acros Organics, США) и 30 мкг/мл гентамицина в присутствии тестостерона (Test)

**Влияние тестостерона (Test) и  $\beta$ -эстрадиола (Est) на количество IL-2 в супернатантах CD45RA<sup>+</sup>- и CD45RO<sup>+</sup>-лимфоцитов**

Вариант культивирования	Количество IL-2 в супернатантах лимфоцитов, пг/мл	
	CD45RA <sup>+</sup>	CD45RO <sup>+</sup>
Контроль	12.72 ± 3.12	82.87 ± 10.13
+ Ac/Exp	684.9 ± 121.43 ( $P_0 < 0.05$ )	715.19 ± 98.34 ( $P_0 < 0.05$ )
Ac/Exp + Est (10 <sup>-5</sup> M)	41.13 ± 12.61 ( $P_1 < 0.05$ )	234.45 ± 42.15 ( $P_1 < 0.05$ )
Ac/Exp + Est (10 <sup>-6</sup> M)	338.12 ± 89.01 ( $P_1 < 0.05$ ; $P_2 < 0.05$ )	353.12 ± 62.71 ( $P_1 < 0.05$ ; $P_2 < 0.05$ )
Ac/Exp + Est (10 <sup>-7</sup> M)	480.67 ± 56.83 ( $P_1 < 0.05$ ; $P_2 < 0.001$ ; $P_3 < 0.05$ )	415.34 ± 45.03 ( $P_1 < 0.05$ ; $P_2 < 0.05$ )
Ac/Exp + Test (10 <sup>-5</sup> M)	464.3 ± 106.1 ( $P_1 < 0.05$ )	565.21 ± 87.48 $P_1 < 0.05$
Ac/Exp + Test (10 <sup>-6</sup> M)	472.0 ± 98.5 ( $P_1 < 0.05$ )	679.83 ± 89.11 ( $P_1 < 0.05$ )
Ac/Exp + Test (10 <sup>-7</sup> M)	456.0 ± 112.8 ( $P_1 > 0.05$ )	681.64 ± 68.61 ( $P_1 > 0.05$ )

Примечание. Ac/Exp — реагент T-Cell Activation/Expansion Kit human (активатор Т-лимфоцитов). Достоверность различий:  $P_0$  — по сравнению с контролем,  $P_1$  — по сравнению с вариантом 1,  $P_2$  — по сравнению с вариантом 2 или 5,  $P_3$  — по сравнению с вариантом 3 или 6.

в разной концентрации и  $\beta$ -эстрадиола (Est) (Sigma, США). В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали реагент T-Cell Activation/Expansion Kit human (Ac/Exp) (Miltenyi Biotec, Германия), который представляет собой антибиотинные частицы MACSiBead™ с биотинилированными антителами против CD2<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> и CD28<sup>+</sup>. Реагент Ac/Exp добавляли в пробы в количестве 5 мкл, которые содержали  $0.5 \cdot 10^6$  антибиотинных частиц MACSiBead™. Соотношение клеток и активирующих частиц составляло 1 : 2. Варианты культивирования были следующими: 1) контрольное, 2) в присутствии Ac/Exp, 3) в присутствии Ac/Exp и Test (10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> и 10<sup>-7</sup> M); 4) в присутствии Ac/Exp и Est (10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> и 10<sup>-7</sup> M).

Количество CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов в обеих популяциях определяли методом проточной цитофлуориметрии на приборе GuavaEasyCyte(tm)Plus (Millipore, США) с использованием МКАТ, меченных флуоресцентными красителями (Сорбент, Россия). Содержание в культуральных супернатантах IL-2 определяли иммуноферментным методом с использованием тест-систем согласно протоколу фирмы-производителя (Вектор-Бест, Россия).

Статистический анализ данных проводили с использованием программного пакета Statistika 7.0. Рассчитывали среднее и его стандартное отклонение. Достоверность различий оценивали с использованием U-критерия Манна—Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости  $P < 0.05$ .

## Результаты и обсуждение

Добавление к культивируемым наивным и примированным лимфоцитам Т-клеточного активатора, имитирующего действие антигенпрезентирующих клеток, способствовало значительному увеличению концентрации IL-2 в среде культивирования: в популяции CD45RA<sup>+</sup>-лимфоцитов — в 53 раза ( $P_0 < 0.05$ ), а в культуре Т-клеток памяти (CD45RO<sup>+</sup>) — в 8.6 раза ( $P_0 < 0.001$ ) (см. таблицу). За-

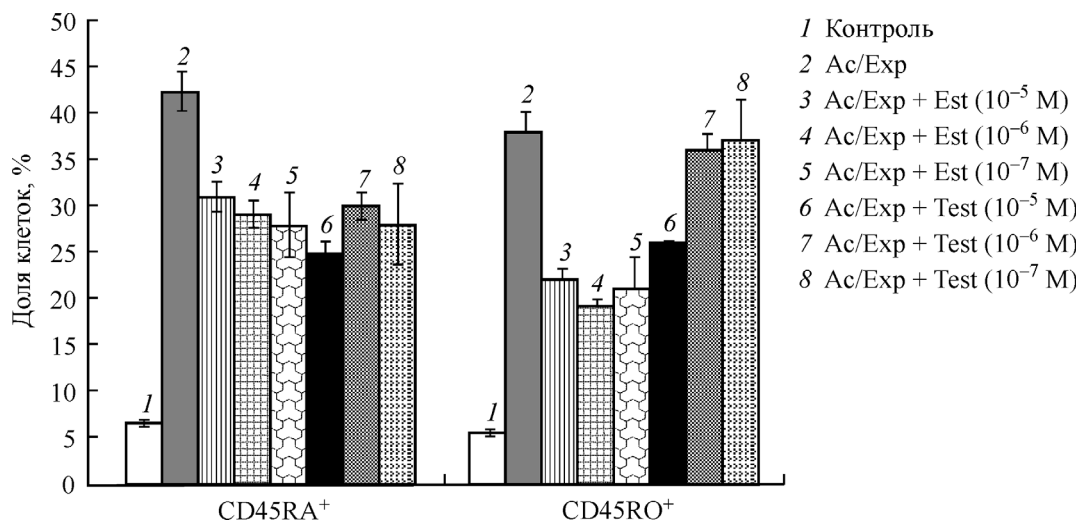
кономерным оказался рост числа CD25<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов среди CD45RA<sup>+</sup> и CD45RO<sup>+</sup> в присутствии активатора, поскольку известно, что экспрессия молекулы активации CD25 на лимфоцитах ассоциируется с IL-2-зависимой стадией иммунного ответа (Létourneau et al., 2009).

Ключевая функция IL-2 заключается в обеспечении перехода антиген-активированных CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов из фазы G<sub>1</sub> в фазу S клеточного цикла, что в конечном итоге, приводит к их пролиферации (Ke et al., 1998; Saparov et al., 1999). Известно, что молекула CD25 представляет собой  $\alpha$ -цепь рецептора IL-2. Появление  $\alpha$ -цепи в составе  $\beta\gamma\epsilon$ -рецептора к IL-2 на мембранах покоящихся лимфоцитов приводит к повышению его аффинности к IL-2 на несколько порядков, что опосредует запуск сигнальных событий, непосредственно регулирующих вступление покоящихся Т-лимфоцитов в клеточный цикл (Ellery, Nicholls, 2002; Benczik, Gaffen, 2004).

Через 48 ч культивирования в контрольных лимфоцитах CD45RA<sup>+</sup> и CD45RO<sup>+</sup> содержание IL-2 в супернатантах клеточных культур составляло  $12.72 \pm 3.12$  и  $82.87 \pm 10.13$  пг/мл соответственно. Количество CD45RA<sup>+</sup>- и CD45RO<sup>+</sup>-лимфоцитов, экспрессирующих CD25, было примерно равным (в среднем  $6.21 \pm 3.37$  %) (см. рисунок).

При проведении сравнительного анализа влияния половых гормонов на активацию наивных и примированных Т-лимфоцитов, ассоциированную с продукцией IL-2 и экспрессией CD25, у условно здоровых лиц в зависимости от гендерных критериев не выявили значимых различий тестируемых параметров.

Согласно данной литературы, андрогены обладают способностью к умеренному подавлению функций иммунной системы. Их рецепторы в больших количествах представлены на тимоцитах и лимфоцитах (Литвинова и др., 2011, 2013). Нами обнаружено, что тестостерон независимо от концентрации равномерно (в среднем в 1.4 раза) подавлял продукцию IL-2 ( $P_1 < 0.05$ ) CD45RA<sup>+</sup>-Т-лимфоцитами. Одновременно с этим тестос-



Доля Т-клеток CD25<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> и CD25<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> при их культивировании в присутствии β-эстрадиола (Est) или тестостерона (Test) в разных концентрациях.

Ac/Exp — реагент T-Cell Activation/Expansion Kit human (активатор Т-лимфоцитов).

стерон в концентрации 10<sup>-5</sup>—10<sup>-7</sup> М способствовал снижению относительного числа CD25-позитивных CD45RA<sup>+</sup>-лимфоцитов (см. рисунок). При добавлении тестостерона к лимфоцитам CD45RO<sup>+</sup> снижение концентрации IL-2 в супернатантах клеток и числа CD25<sup>+</sup>-клеток регистрировалось лишь при действии максимальной концентрации мужского гормона (10<sup>-5</sup> М) ( $P_1 < 0.05$ ) (см. таблицу и рисунок). Угнетающее влияние тестостерона на содержание CD45RO<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-клеток и продукцию ими IL-2 может быть связано с его антипролиферативным действием (Литвинова и др., 2011, 2013).

Обобщая данные о воздействии эстрогенов на иммунный ответ, следует отметить дозозависимость влияния эстрогенов на Т-, В-лимфоциты и на иммунную систему в целом. Считается, что эстрогены могут усиливать иммунные реакции (Grossman et al., 1994). В нашем исследовании β-эстрадиол в концентрации 10<sup>-5</sup>—10<sup>-7</sup> М оказывал выраженное супрессивное влияние на уровень продукции IL-2 в обеих популяциях Т-лимфоцитов (см. таблицу), что может быть связано с выявленным нами ранее проапоптогенным действием β-эстрадиола на Т-лимфоциты (Литвинова и др., 2013). Влияние β-эстрадиола на продукцию IL-2 наивными и примированными Т-лимфоцитами носило дозозависимый характер (см. таблицу). Интересным оказался тот факт, что β-эстрадиол равномерно (независимо от концентрации) подавлял экспрессию маркера активации CD25 в популяции как CD45RA<sup>+</sup>, так и CD45RO<sup>+</sup>-лимфоцитов (см. рисунок). Более выраженным эффектом был в случае примированных (CD45RO<sup>+</sup>) лимфоцитов, что может быть обусловлено более высокой плотностью высокоаффинных рецепторов к эстрогенам на мембранах «зрелых» лимфоцитов (Anderson, 2000; Chernyshov et al., 2001).

Итак, нами получены данные, характеризующие влияние тестостерона и β-эстрадиола на активацию Т-лимфоцитов разной степени дифференцировки, ассоциированную с экспрессией CD25 и продукцией IL-2. В целом влияние тестостерона на функциональную активность наивных и примированных Т-клеток носит угнетающий характер. CD45RA<sup>+</sup>-лимфоциты оказались более чувствительными к его действию, чем CD45RO<sup>+</sup>. Влияние тестостерона на продукцию IL-2 и экспрессию маркера активации

CD25 Т-клетками не зависело от концентрации гормона. Показано дозозависимое супрессивное влияние β-эстрадиола на продукцию IL-2 активированными CD45RA<sup>+</sup>- и CD45RO<sup>+</sup>-Т-лимфоцитами. Снижение числа CD25-позитивных Т-лимфоцитов (наивных и примированных) при действии β-эстрадиола не зависит от дозы гормона и носит равномерный характер, более выраженный в отношении CD45RO<sup>+</sup>-Т-клеток.

Работа выполнена в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг. (ГК № П1203, П13062 и П1252; соглашения № 14.А18.21.1121, 14.132.21.1778 и 14.132.21.1341), а также при финансовой поддержке совета по грантам президента РФ № МД-4999.2012.7.

### Список литературы

- Гуцол А. А., Сохоневич Н. А., Селедцов В. И., Литвинова Л. С. 2013. Влияние дексаметазона на активацию и пролиферацию Т-клеток иммунной памяти. Бюл. эксперим. биол. мед. 155 (4) : 468—470. (Gutsol A. A., Sokhonevich N. A., Seledtsov V. I., Litvinova L. S. 2013. Dexamethasone effects on activation and proliferation of immune memory T cells. Bull. Exp. Biol. Med. 155 (4) : 468—470.)
- Литвинова Л. С., Мазунин И. О., Гуцол А. А., Сохоневич Н. А., Хазиахматова О. Г. 2013. Дозозависимые эффекты стероидных гормонов на экспрессию генов Gfi1 и U2af114 в Т-лимфоцитах разной степени дифференцировки. Молекуляр. биол. 47(4) : 656—667. (Litvinova L. S., Mazunin I. O., Gutsol A. A., Sokhonevich N. A., Khaziakhmatova O. G. 2013. Dose response effect of steroid hormones on Gfi1 and U2af114 gene expression in T lymphocytes at different stages of differentiation. Mol. Biol. 47 (4) : 572—580.)
- Литвинова Л. С., Селедцов В. И., Шуплецова В. В., Гуцол А. А., Анищенко Е. С. 2011. Стероидная регуляция иммунной памяти. Вестн. РГУ им. И. Канта. 1 : 77—87. (Litvinova L. S., Seledtsov V. I., Shupletsova V. V., Gutsol A. A., Anischenko E. S. 2011. Steroid regulation of immune memory. Herald RSU them. I. Kant. 1 : 77—87.)
- Селедцов В. И., Литвинова Л. С., Гончаров А. Г., Шуплецова В. В., Селедцов Д. В., Гуцол А. А., Селедцова И. А. 2010. Клеточные механизмы генерации иммунологической памяти. Ци-

токины и воспаление. 9 (4) : 9—15. (Seledtsov V. I., Litvinova L. S., Goncharov A. G., Shupletsova V. V., Seledtsov D. V., Gutsol A. A., Seledtsova I. A. 2010. Cellular mechanisms of generation of immunological memory. Cytokines and Inflammation. 9 (4) : 9—15.)

Anderson D. J. 2000. Immunologic aspects of menopause. In: Menopause: biology and pathology. New York: Acad. Press. 353—356.

Benczik M., Gaffen S. L. 2004. The interleukin (IL)-2 family cytokines: survival and proliferation signaling pathways in T lymphocytes. Immunol. Invest. 33 : 109—142.

Chernyshov V. P., Radysh T. V., Gura I. V., Tatarchuk T. P., Khominskaya Z. B. 2001. Immune disorders in Women with premature ovarian failure in initial period. Amer. J. Reprod. Immunol. 46 : 220—225.

Crotty S., Ahmed R. 2004. Immunological memory in humans. Semin. Immunol. 16 : 197—203.

Ellery J. M., Nicholls P. J. 2002. Possible mechanism for the alpha subunit of the interleukin-2 receptor (CD25) to influence interleukin-2 receptor signal transduction. Immunol. Cell Biol. 80 : 351—359.

Elyaman W., Kivisakk P., Reddy J., Chitnis T., Raddassi K., Imitola J., Bradshaw E., Kuchroo V. K., Yagita H., Sayegh M. H., Khoury S. J. 2008. Distinct functions of autoreactive memory and effector CD4<sup>+</sup> T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. Amer. J. Pathol. 173 : 411—422.

Grossman J., Halverson P. C., Meltzer E. O., Shoenwetter W. F., van Bavel J. H., Woehler T. R., Freitag J. J., Hems-worth G. R. 1994. Double-blind assessment of azelastine in the treatment of perennial allergic rhinitis. Ann. Allergy. 73 : 141—146.

Harrington L. E., Janowski K. M., Oliver J. R., Zajac A. J., Weaver C. T. 2008. Memory CD4 T cells emerge from effector T-cell progenitors. Nature. 452 : 356—360.

Johannisson A., Festin R. 1995. Phenotype transition of CD4<sup>+</sup> T cells from CD45RA to CD45RO is accompanied by cell activation and proliferation. Cytometry. 19 : 343—352.

Kaech S. M., Wherry E. J., Ahmed R. 2002. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. Nat. Rev. Immunol. 2 : 251.

Ke Y., Ma H., Kapp J. A. 1998. Antigen is required for the activation of effector activities, whereas interleukin 2 is required for the maintenance of memory in ovalbumin-specific, CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes. J. Exp. Med. 187 : 49.

Learn C. A., Fecci P. E., Schmittling R. J., Xie W., Karikari I., Mitchell D. A., Archer G. E., Wei Z., Dressman H., Sampson J. H. 2006. Profiling of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>+FoxP3<sup>+</sup> T cells in patients with malignant glioma reveals differential expression of the immunologic transcriptome compared with T cells from healthy volunteers. Clin. Cancer Res. 12 : 7306—7315.

Létourneau S., Krieg C., Pantaleo G., Boyman O. 2009. IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. J. Allergy Clin. Immunol. 123 : 758—762.

Michie C. A., McLean A., Alcock C., Beverley P. C. 1992. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. Nature. 360 : 264—265.

Mizutani K., Ito M., Nakano T., Kamiya H., Sakurai M. 1995. Impaired expression of interleukin 2 receptor and CD45RO antigen on lymphocytes from children with acute lymphoblastic leukemia in response to cytomegalovirus and varicella-zoster virus. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2 : 381—384.

Saparov A., Wagner F. H., Zheng R., Oliver J. R., Maeda H., Hockett R. D., Weaver C. T. 1999. Interleukin-2 expression by a subpopulation of primary T cells is linked to enhanced memory/effector function. Immunity. 11 : 271.

Поступила 22 XI 2013

THE INFLUENCE OF TESTOSTERONE AND  $\beta$ -ESTRADIOL ON T-LYMPHOCYTES  
ACTIVATION ASSOCIATED WITH IL-2 PRODUCTION AND EXPRESSION OF CD25  
(IL-2R $\alpha$ ) MOLECULES

A. A. Gutsol, N. A. Sokhnevich, K. A. Kofanova, L. S. Litvinova<sup>1</sup>

Baltic Federal University of Immanuel Kant, Kaliningrad;

<sup>1</sup> e-mail: larisalitinova@yandex.ru

We have shown that testosterone and  $\beta$ -estradiol *in vitro* have effects on naïve (CD45RA<sup>+</sup>) and priming (CD45RO<sup>+</sup>) T-lymphocytes, which associated with the production of IL-2 and CD25/IL-2R $\alpha$  expression. Testosterone can inhibit naïve and priming T-cell function activity in our study. Moreover it was shown that naïve lymphocytes are more sensitive to testosterone than primed. We have found dose dependent suppressive  $\beta$ -estradiol effect on IL-2 production by activated CD45RA<sup>+</sup> and CD45RO<sup>+</sup> lymphocytes which leads to uniform decreasing CD25-positive T-cells number.

Key words: testosterone,  $\beta$ -estradiol, naïve T-cells, primed memory T-lymphocytes, cells activation.