

DOI: 10.31116/tsitol.2018.08.04

ВЛИЯНИЕ TCR-AКТИВАЦИИ И β -ЭСТРАДИОЛА НА ПРОЦЕССЫ СОЗРЕВАНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ Т-КЛЕТОК CD45RA⁺ В СИСТЕМЕ IN VITRO

© О. Г. Хазиахматова, К. А. Юрова, Н. М. Тодосенко, Л. С. Литвинова*

Базовая лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий
Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта, Калининград, 236029;

* электронный адрес: larisalitvinova@yandex.ru

Оценивали влияние женского полового гормона β -эстрадиола в разных концентрациях на реакции, определяющие созревание и дифференцировку TCR-активированных наивных (CD3⁺CD45RA⁺CD62L⁺)-Т-клеток, в системе in vitro. Т-клетки CD3⁺CD45RA⁺CD62L⁺ получали из фракции мононуклеаров крови условно здоровых доноров методом иммуномагнитной сепарации. Методом проточной цитофлуориметрии проанализировано изменение иммунофенотипа Т-лимфоцитов; методом полимеразной цепной реакции определен уровень экспрессии генов *U2af114* и *Gfi1* в (CD3⁺CD45RA⁺CD62L⁺)-Т-клетках. В целом индуцированное β -эстрадиолом на фоне TCR-активации изменение экспрессии генов *U2af114* и *Gfi1* в Т-клетках оказывает влияние на процессы созревания и дифференцировки Т-лимфоцитов CD45RA⁺CD62L⁺, что приводит к конверсии фенотипа наивных клеток и характеризуется повышением числа CD45RO⁺-Т-лимфоцитов и, напротив, сокращением содержания Т-клеток, несущих на поверхности мембраны молекулы активации и костимуляции (CD127 и CD28).

Ключевые слова: β -эстрадиол, наивные Т-лимфоциты, альтернативный сплайсинг, активация, дифференцировка

Принятые сокращения: МНК — мононуклеарные клетки, Ас — TCR-активатор, Est — β -эстрадиол.

Половые гормоны проявляют разнонаправленные дозозависимые эффекты в отношении иммунной системы (Литвинова и др., 2011; Van Mens et al., 2012), реализуемые через негеномные и геномные механизмы (Gruber-Yates, Cidlowski, 2013; Ayroldi et al., 2014; Cheng et al., 2014; Тодосенко и др., 2017). Благодаря наличию внутриклеточных и мембранных рецепторов в (на) иммунокомпетентных клетках стероидные гормоны, в частности эстрогены, способны регулировать многочисленные процессы клеточного гомеостаза Т-лимфоцитов — синтез белков, репликацию нуклеиновых кислот, экспрессию генов и др. (Гуцол и др., 2012; Cheng et al., 2014; Finlay-Schultz, Sartorius, 2015; Furman, 2015; Giefing-Kroll et al., 2015). Установлена четкая взаимосвязь между функциональной активностью иммунной системы и менструальным циклом у женщин: реакции иммунокомпетентных клеток различаются в лютеиновой и фолликулярной фазах менструального цикла, в пост- и предменопаузе, что говорит о зависимости функциональной активности Т-лимфоцитов от концентрации эстрогенов (Priyanka et al., 2013). Установлено, что действие эстрогенов на иммунокомпетентные клетки определяется стадией их развития и дифференцировки, а также активационным статусом (Finlay-Schultz, Sartorius, 2015; Giefing-Kröll et al., 2015; Хазиахматова, 2016).

Известно, что в основе формирования первичного иммунного ответа лежит дифференцировка зрелых активированных наивных клеток-предшественниц в эффекторные лимфоциты и Т-клетки памяти; последние характеризуются быстрым и усиленным ответом на специфический антиген (Altemus et al., 2006; Bel, Hooper, 2015; Harris, 2015). Процесс Т-клеточной активации напрямую связан с изменением экспрессии поверхностных гликопротеидных маркеров. Основным регулятором TCR-сигнализации является трансмембранная тирозиновая протеинфосфатаза — молекула CD45, нарушение экспрессии которой приводит к развитию тяжелых иммунопатологических состояний как у людей, так и у экспериментальных животных (McNeill et al., 2007; Wu et al., 2010). В ответ на активацию Т-клеток мРНК гена *PTPRC*, кодирующего CD45, подвергается альтернативному сплайсингу (Motta-Mena et al., 2010; Butte et al., 2012), что в свою очередь приводит к генерации изоформ (до 8) молекулы CD45 (Butte et al., 2012), 5 из которых экспрессируются на различных популяциях лимфоцитов и участвуют в дифференцировке Т-клеток (Heyd et al., 2006; Heyd, Lynch, 2010; Butte et al., 2012). Биологический смысл альтернативного сплайсинга молекулы CD45 заключается в реализации механизма обратной связи для поддержания Т-клеточного гомеостаза в условиях многофакторной си-

стемы (макроорганизма), которая постоянно подвергается антигенной нагрузке, что по сути является нормой.

Мы предполагаем, что эстрогены оказывают влияние на созревание и дифференцировку наивных Т-клеток опосредованно, через регуляцию альтернативного сплайсинга гена *PTPRC*, кодирующего общелейкоцитарный рецептор CD45, что в итоге может предопределить исход как первичных, так и вторичных иммунных реакций.

Целью исследования явилась оценка реакций, определяющих созревание и дифференцировку наивных Т-клеток, на действие эстрогена β -эстрадиола в условиях CD2/CD3/CD28-активации.

Материал и методика

Материалом для исследования служили Т-лимфоциты CD3⁺CD45RA⁺CD62L⁺, полученные из взвеси мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови 120 условно здоровых доноров (60 мужчин и 60 женщин в возрасте от 22 до 35 лет). МНК из периферической крови выделяли стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности (1.077 г/см³) фиколл-урографина (Pharmacia, Швеция). Определение количества клеток и жизнеспособности в исследуемых культурах проводили на проточном цитометре Guava EasyCite Plus с программным обеспечением Guava ViaCount (Millipore, США) с использованием реактивов ViaCount Reagent. Жизнеспособность культур была не менее 95—98 % от общего количества клеток.

Популяции наивных Т-лимфоцитов CD3⁺CD45RA⁺CD62L⁺ выделяли методом иммуномагнитной селекции с использованием автоматического магнитного сепаратора AutoMACS Pro Separator Instrument (Miltenyi Biotec, Германия). Из фракции мононуклеаров крови выделяли популяцию моноцитов, используя суперпарамагнитные частицы (MicroBeads human; Miltenyi Biotec, Германия), конъюгированные с высокоспецифичными моноклональными антителами к CD14⁺. Популяцию наивных Т-лимфоцитов (CD45RA⁺) выделяли из негативной фракции методом позитивной селекции, используя магнитные частицы, меченные CD45RO⁺ (MicroBeads human; Miltenyi Biotec, Германия). Из негативной фракции CD14⁻CD45RO⁻ выделяли популяцию CD62L⁺ Т-лимфоцитов с помощью магнитных частиц к CD62L⁺.

Изолированные лимфоциты CD3⁺CD45RA⁺CD62L⁺ ($1 \cdot 10^6$ кл./мл) культивировали в полной питательной среде, приготовленной на основе бессывороточной среды Искова (Sigma-Aldrich, США) и содержащей $5 \cdot 10^{-5}$ М β -меркаптоэтанола (Acros Organics, США), 0.5 % сывороточного альбумина человека (Микроген, Россия) и 30 мкг/мл гентамицина, в присутствии или в отсутствие β -эстрадиола (Sigma, США) и TCR-активатора в 48-луночных планшетах при 37 °С во влажной среде, содержащей 5 % CO₂. Культивирование всех проб проводили в течение 48 ч.

Выбор концентраций эстрогена β -эстрадиола, используемого в эксперименте *in vitro*, обусловлен средним уровнем эстрогенов в плазме крови с учетом суточных (циркадных), возрастных, половых, циклических, физиологических стрессовых и ментальных стрессовых колебаний, которые могут отличаться от усредненной физиологической нормы на порядок (Зильбернагель, Деспулос, 2013).

В роли активатора Т-лимфоцитов использовали реагент T-Cell Activation/Expansion Kit human (далее — Ac)

(Miltenyi Biotec, Германия), представляющий собой антибиотинные частицы MACSiBead™ с биотинилированными антителами к рецепторам CD2⁺, CD3⁺ и CD28⁺ человека. Реагент Ac в количестве 5 мкл добавляли в пробы, которые содержали $0.5 \cdot 10^6$ антибиотинных частиц MACSiBead™. Соотношение клеток и активирующих частиц составляло 1 : 2.

Использовали следующие варианты культивирования: 1) интактное, 2) присутствие комплекса анти-CD2/CD3/CD28 (Ac); 3—5) совместное присутствие Ac и β -эстрадиола в концентрации 10^{-7} , 10^{-6} или 10^{-5} М.

Т-клеточные субпопуляции идентифицировали с помощью проточной цитометрии с использованием антител анти-CD45RA, меченных флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), анти-CD45RO, меченных фикоэритрином (PE), анти-CD127, меченных перидинин хлорофиллом (PerCP), анти-CD28, меченных аллофикоцианином (APC), и анти-CD3, меченных VioBlue, согласно протоколам фирм-производителей. Для настройки компенсаций был сделан одноцветный контроль для каждого красителя. Регистрацию поверхностных маркеров проводили на проточном цитометре MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия). Результаты проточной цитометрии анализировали с использованием программ KALUZA Analysis Software (Beckman Coulter, США) (см. рисунок).

При выделении тотальной РНК из клеточных культур использовали монофазный водный раствор фенола и гуанидинизотиоцианата (реагент ExtractRNA Kit (Евроген, Россия) для выделения суммарной РНК); уровень чистоты РНК определяли по соотношению поглощения на длинах волн 260 и 280 нм; качественный анализ проводили с использованием электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле с бромистым этидием. Для очищения выделенного образца РНК от двухцепочечных фрагментов ДНК проводили реакцию рестрикции с использованием DNКазы-1 (NEB, США) согласно протоколу фирмы-производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили на образцах суммарной РНК с использованием набора реагентов MMLV Kit (Евроген, Россия) и праймера Oligo(dT)23-primer (20 мкМ) (Бигль, Россия). С помощью ПЦР, реагентов qPCRmixHS (Евроген, Россия) и праймеров в концентрации 10 пМ (Бигль, Россия) оценивали динамику изменений экспрессии генов *Gfi1* и *U2af114*. Использовали следующие олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентные зонды TaqMan:

праймеры для *GFI1*:

прямой 5'-TGGAGCAGCACAAAGCC-3'

и обратный 5'-GACAGTGTGGATGACCTCTTG-3',

зонд FAM-5'-CGCAGGAACGGAGCTTTGACTGTA-3'~
BHQ-1;

праймеры для *U2af114*:

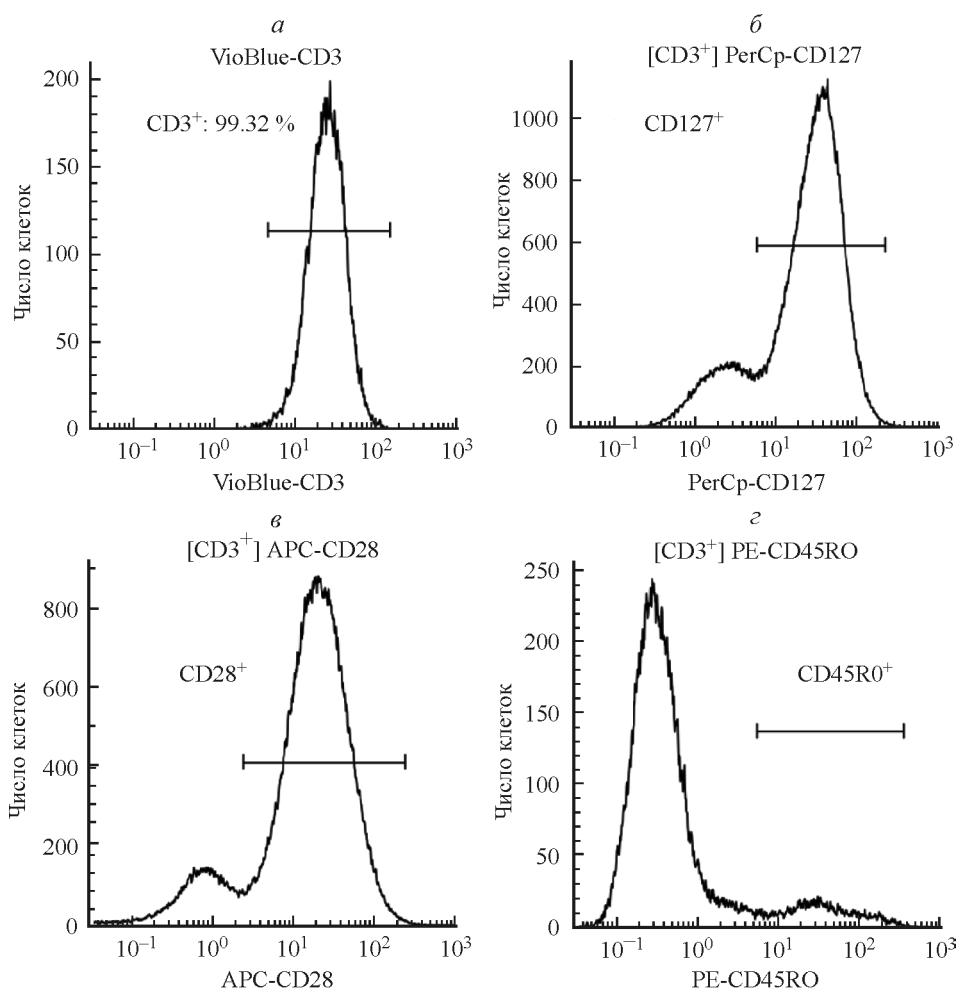
прямой 5'-CTTCACAACAGCCGACATTC-3'

и обратный 5'-CAAGGTTGTCGCACACATTC-3',

зонд FAM-5'-CCAGGAGGTGTTACAGAACTGCA-3'~
BHQ-1.

В качестве референсного гена использовали ген *GAPDH* (праймер прямой 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3', обратный 5'-GAAGATGGTGGATGGGATTTTC-3, зонд HEX-5'-CAAGCTCCCGTTCTCAGCC-3'-BHQ-1).

Процесс RT-PCR проходил в трех повторах с использованием прибора LightCycler 480 Real-Time PCR (Roche, Швейцария) в температурном режиме: 95 °С, 5 мин; 95 °С, 20 с; 60 °С, 30 с; 72 °С, 1 мин; 45 циклов; 72 °С, 5 мин. Специфичность продуктов реакции определяли с



Алгоритм выявления популяций Т-лимфоцитов CD3⁺CD45RA⁺CD62L⁺.

По горизонтали — интенсивность флуоресценции (ИФ) соответствующих антител, меченных VioBlue, перидинин хлорофиллом (PerCp), аллофикоцианином (APC) и фикоэритрином (PE). а — гистограмма распределения Т-лимфоцитов; б—г — анализ проведен с использованием гейтирования по области CD3⁺. Одномерные гистограммы представлены в интактных пробах (без добавок в среду культивирования).

использованием кривых плавления. Результаты ПЦР анализировали с помощью метода максимума второй производной (second derivative maximum method). Уровни относительной экспрессии исследуемых генов определяли с помощью модифицированной формулы Пфаффа для разных эффективностей амплификации (Pfaffl, 2001):

$$\text{Относительный уровень экспрессии} = \frac{E_{\text{иссл}}^{\Delta C_{\text{Риссл}}(\text{контр} - \text{иссл})}}{E_{\text{реф}}^{\Delta C_{\text{Р}}(\text{контр} - \text{иссл})}},$$

где «иссл», «реф» и «контр» — соответственно исследуемый, референсный и контрольный.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical package for the social sciences). Средневыборочные характеристики вычисляли для каждой выборки: медиану (Me), первый и третий квартили (Q1 и Q3). Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали критерий для зависимых выборок Вилкоксона. С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили следующие анализы: корреляционный, вычис-

ля коэффициент ранговой корреляции Спирмена r , и регрессионный, вычисляя коэффициент регрессии r^2 . Различия считали достоверными при уровне значимости $P < 0.05$.

Статистическую обработку данных ПЦР с детекцией продуктов в режиме реального времени осуществляли с помощью специализированной программы REST 2009 v. 2.0.12. В качестве контроля для расчета уровня относительной экспрессии генов *GF11* и *U2af114* в пробах с TCR-активатором (Ac) использовали значения интактных проб; для расчета уровня относительной экспрессии генов *GF11* и *U2af114* в пробах с β -эстрадиолом и активатором Ac использовали показатели проб только с TCR-активатором. Значения в табл. 1 приведены относительно контрольных, принятых за 1 усл. ед., согласно модифицированной формуле Пфаффа (Pfaffl, 2001).

Результаты

Согласно полученным экспериментальным данным, активация CD3⁺CD45RA⁺CD62L⁺-Т-лимфоцитов комплексом анти-CD2/CD3/CD28 снижала уровень экспрессии мРНК генов *Gfi1* и *U2af114* в Т-клетках относитель-

Таблица 1

Уровень относительной экспрессии мРНК генов *Gfi1* и *U2af114* в Т-лимфоцитах CD3⁺CD45RA⁺CD62L⁺ при активации TCR-активатором (Ac) в сочетании с β-эстрадиолом (β-est)

Ген	Показатель экспрессии относительно контроля, усл. ед.			
	Ac	Ac + 10 ⁻⁷ М β-est	Ac + 10 ⁻⁶ М β-est	Ac + 10 ⁻⁵ М β-est
<i>Gfi1</i>	0.31 (0.15—0.36) ^a	0.35 (0.21—0.45) ^b	0.42 (0.35—0.46) ^b	0.38 (0.29—0.42) ^b
<i>U2af114</i>	0.05 (0.03—0.07) ^a	6.91 (5.3—8.6) ^b	13.32 (10.37—15.43) ^b	21.33 (18.32—23.34) ^b

Примечание. Приведены значения (медиана, первый и третий квартили) относительно контрольных, принятых за 1 усл. ед., согласно модифицированной формуле (Pfaffl, 2001). Контролем служили значения интактных проб для проб с активатором (Ac) и значения проб только с Ac для проб с сочетанным действием (Ac + β-est). Различия достоверны при ^a $P < 0.05$ в сравнении с Т-клетками без Ac и при ^b $P < 0.05$ в сравнении с Т-клетками, активированными Ac; $n = 120$.

Таблица 2

Доля Т-клеток CD127, CD28 и CD45RO в популяции Т-лимфоцитов CD3⁺CD45RA⁺CD62L⁺, культивируемых совместно с TCR-активатором (Ac) и β-эстрадиолом (β-est) в разной концентрации

Номер	Добавки в среду культивирования	Доля клеток, %		
		CD127	CD28	CD45RO
1	Нет (интактное)	92.50 (88.40—97.90)	96.00 (89.30—98.00)	8.90 (5.67—9.80)
2	Ac	75.41 (72.20—81.40) $P < 0.05$	74.20 (69.23—77.20) $P < 0.05$	21.45 (19.90—25.74) $P < 0.05$
3	Ac + 10 ⁻⁷ М β-est	64.22 (60.35—67.30) $P_1 < 0.05$	66.23 (59.20—68.32) $P_1 < 0.05$	42.30 (34.30—44.23) $P_1 < 0.05$
4	Ac + 10 ⁻⁶ М β-est	55.78 (43.78—59.21) $P_1 < 0.05, P_2 < 0.05$	51.45 (45.38—52.34) $P_1 < 0.05, P_2 < 0.05$	49.30 (48.30—52.45) $P_1 < 0.05, P_2 < 0.05$
5	Ac + 10 ⁻⁵ М β-est	55.69 (45.19—61.66) $P_1 < 0.05, P_2 < 0.05$	44.32 (42.34—48.22) $P_1 < 0.05, P_2 < 0.05, P_3 < 0.05$	48.30 (45.20—66.00) $P_1 < 0.05, P_2 < 0.05$

Примечание. P, P_1, P_2 и P_3 — уровни значимости по сравнению с пробами 1—4 соответственно; $n = 120$.

но контрольных цифр (табл. 1). На фоне этой активации добавление β-эстрадиола (10⁻⁷—10⁻⁵ М) приводило к дозозависимому ($r^2 = 0.81, P < 0.05$) повышению уровня экспрессии мРНК гена *U2af114* в наивных (CD3⁺CD45RA⁺CD62L⁺) Т-лимфоцитах по сравнению с результатами, регистрируемыми в пробах только с TCR-активатором (табл. 1). Влияние гормона на экспрессию гена *Gfi1* носило равномерный супрессивный характер вне зависимости от действующей концентрации β-эстрадиола ($P < 0.05$) (табл. 1).

Культивирование CD3⁺CD45RA⁺CD62L⁺-Т-лимфоцитов с комплексом анти-CD2/CD3/CD28 способствовало достоверному повышению числа CD45RO⁺-лимфоцитов (в среднем в 2 раза) относительно интактной пробы (табл. 2). Напротив, активатор способствовал снижению количества лимфоцитов, экспрессирующих молекулы ко-стимуляции (CD28) и активации (CD127) в культурах CD3⁺CD45RA⁺CD62L⁺-Т-клеток (табл. 2). Нами были обнаружены следующие взаимосвязи в активированных пробах: положительная, между значениями экспрессии гена *U2af114* в Т-клетках и содержанием CD45RO⁺-Т-лимфоцитов ($r = 0.67, P < 0.05$), и отрицательная, между числом CD45RO⁺ и содержанием CD28⁺-Т-клеток ($r = -0.76, P < 0.05$).

Добавление комбинации TCR-активатора и β-эстрадиола (10⁻⁷—10⁻⁵ М) в культуру Т-лимфоцитов приводило к увеличению числа CD45RO⁺-Т-клеток ($P \leq 0.05$) по

отношению к пробам с действием только TCR-активатора. Добавление β-эстрадиола (10⁻⁷—10⁻⁵ М) на фоне TCR-активации снижало ($P < 0.05$) число наивных Т-лимфоцитов, несущих мембранные молекулы ко-стимуляции (CD28) и активации (CD127) ($P < 0.05$) (табл. 2).

Корреляционный анализ позволил выявить положительные связи между уровнями транскрипции мРНК гена *U2af114* и количеством CD45RO⁺-Т-лимфоцитов ($r = 0.605, 0.620$ и $0.760, P < 0.05$ во всех случаях при действии β-эстрадиола в концентрациях 10⁻⁷, 10⁻⁶ и 10⁻⁵ М соответственно) и отрицательные между экспрессией гена *U2af114* и числом CD28⁺-Т-лимфоцитов ($r = -0.650$ и $-0.870, P < 0.05$ во всех случаях при действии 10⁻⁶ и 10⁻⁵ М β-эстрадиола соответственно). Кроме этого, нами обнаружена отрицательная корреляция между уровнем транскрипции мРНК гена *Gfi1* и содержанием Т-лимфоцитов, экспрессирующих молекулу CD45RO⁺ ($r = -0.56$ и $-0.70, P < 0.05$ во всех случаях при действии 10⁻⁶ и 10⁻⁵ М β-эстрадиола соответственно).

Обсуждение

Важная роль в процессе альтернативного сплайсинга молекулы CD45 принадлежит сбалансированному действию фактора транскрипции Gfi1 и вспомогательного фактора сплайсинга U2AF26. Антагонистическое взаимодей-

ствии *Gfi1* и *U2AF26* определяет соотношение различных изоформ молекулы CD45 : *U2AF26* участвует в исключении 4-го экзона, формируя тем самым короткую изоформу CD45R0, в то время как *Gfi1* приводит к образованию более длинной, высокомолекулярной формы рецептора CD45RB (или CD45RA) (Heyd et al., 2006; Heyd, Lynch, 2010; Butte et al., 2012; Литвинова и др., 2013). Установлено, что при продолжительной активации Т-лимфоцитов сплайсинг транскриптов, связанных с молекулой CD45, изменяется в значительной степени (Motta-Mena et al., 2010; Butte et al., 2012). Так, наивные Т-клетки на более высоком уровне экспрессируют длинные изоформы молекулы CD45 (CD45RA), в то время как антигенактивированные Т-лимфоциты несут главным образом короткий вариант рецептора CD45 (CD45RO) (Литвинова и др., 2014).

Выявленное нами снижение экспрессии генов *Gfi1* и *U2af114*, индуцированное TCR-активацией в наивных Т-клетках (по сравнению с экспрессией в интактной пробе) (табл. 1), может быть следствием дисбаланса, развивающегося на фоне разнообразия иницированных сигналов, результатом чего является продукция клеткой рецепторов, цитокинов, хемокинов и т. п., что, по всей вероятности, приводит к истощению резервного потенциала клетки.

Кроме того, один из механизмов угнетения экспрессии гена *Gfi1* в наивных Т-клетках на фоне их активации может быть связан с временным фактором. Так, показано, что максимальная индукция синтеза белка *Gfi1* (с образованием различных изоформ) наблюдается через 6—12 ч и полностью отсутствует через 3 сут (Heyd et al., 2006). Интерес представляют результаты, полученные нами ранее: мононуклеарные клетки в культуре через 48 ч TCR-активации демонстрировали подавление фактора *Gfi1* и активацию его антагониста *U2af114* (Литвинова и др., 2013а). Напротив, в эксперименте с использованием праймированных (антиген-специфических) CD45RO⁺-Т-клеток памяти TCR-активация сопровождалась резким угнетением экспрессии гена *U2af114*, тогда как уровень транскрипции гена *Gfi1* в этих клетках не изменялся. Мы предполагаем, что разнонаправленное действие активирующих частиц обусловлено разобщенностью процессов активации Т-лимфоцитов разной степени дифференцировки в зависимости от временного фактора. Так, для реализации вторичного иммунного ответа Т-клеток костимуляция не обязательна, в связи с чем требуется меньше времени на активацию (Юрова, 2015).

Кроме того, важно учитывать следующий факт: поскольку трансмембранная тирозинфосфатаза (молекула CD45) после выполнения ее основной функции по дефосфорилированию киназ выводится из зоны иммунного синапса, регуляция гена *Ptpnc* после антигенной активации Т-клеток не является первостепенной.

Логичным событием после антиген-специфической *in vivo* активации наивных Т-клеток наряду с экспансией специфических клонов являются их дифференцировка и созревание в эффекторные клетки, которые сопровождаются изменением экспрессии мембранных молекул, отражающих последовательные процессы клеточного гомеостаза — костимуляцию, активацию, дифференцировку и клеточную гибель (Литвинова и др., 2013б). Известно, что CD28 является корецептором, присутствующим на поверхности мембраны всех наивных Т-лимфоцитов и принимает участие в позитивной костимуляции во время формирования рецепторного синапса (Butte et al., 2012;

Кудрявцев, 2014), в то время как молекула CD127, α -цепь рецептора к IL-7 (IL-7R), участвует в процессах активации и поддержания Т-клеточного гомеостаза, повышая доступность IL-7 для наивных лимфоцитов (Park et al., 2004; Surh, Sprent, 2008). В процессе TCR-активации наивных Т-лимфоцитов регистрируется снижение экспрессии и продукции мембранных молекул CD28 и CD127, что свидетельствует об их созревании и дифференцировке, сопровождающейся частичным или полным прекращением пролиферативной активности Т-клеток (Кудрявцев, 2014). Кроме того, появление на Т-клетках короткого варианта рецептора CD45 (CD45RO), как уже упоминалось выше, свидетельствует о более эффективной и быстрой их активации в ответ на повторное воздействие антигена (Heyd et al., 2006; Heyd, Lynch, 2010; Butte et al., 2012).

Выявленное нами снижение уровня транскрипции мРНК генов *Gfi1* и *U2af114* в CD3⁺CD45RA⁺CD62L⁺-Т-лимфоцитах на фоне TCR-активации ассоциировано с изменением их фенотипа, что выражалось повышением числа CD45RO-клеток и, напротив, снижением числа лимфоцитов, экспрессирующих молекулы активации CD127 и костимуляции CD28. Полученные нами данные и выявленные взаимосвязи — положительные (между уровнем экспрессии гена *U2af114* в Т-клетках и содержанием CD45RO⁺-Т-лимфоцитов) и отрицательные (между числом Т-клеток CD45RO⁺ и CD28⁺) — свидетельствуют в целом об антигеннезависимой TCR-индуцированной дифференцировке и созревании Т-клеток. В научной периодике факт неспецифической (антигеннезависимой) активации и дифференцировки клонов Т-лимфоцитов активно обсуждается (Wieckowski et al., 2009) с позиций физиологической и иммунопатологической модуляции активности иммунного ответа (Wieckowski et al., 2009).

Как упоминалось выше, половые гормоны являются одними из ключевых дирижеров иммунных реакций, влияя на способность зрелых эффекторных клеток осуществлять иммунный ответ (Литвинова и др., 2011; Van Mens et al., 2012; Gruver-Yates, Cidlowski, 2013; Ayroldi et al., 2014; Cheng et al., 2014; Giefing-Kroll et al., 2015; Тодосенко и др., 2017). Иммунологический диморфизм по половому признаку у человека и животных объясняется тесным взаимодействием нейроэндокринной и иммунной систем (Lai et al., 2012; Furman et al., 2014). Так, сильный клеточно-опосредованный иммунный ответ с более значительной продукцией антител при антигенной стимуляции характерен преимущественно для самок по сравнению с особями мужского пола, что подтверждается высокой склонностью женщин к развитию аутоиммунных заболеваний (Lai et al., 2012; Zhao et al., 2014; Giefing-Kroll et al., 2015). Мужчины по сравнению с женщинами имеют более высокий риск развития острых респираторных заболеваний, сепсиса и нарушений функций внутренних органов в результате травм мягких тканей, термического и геморрагического шока (Peterson et al., 2013; Furman et al., 2014; Zhao et al., 2014).

Однако сравнительный анализ влияния β -эстрадиола на реакции, определяющие созревание и дифференцировку наивных Т-клеток в условиях CD2/CD3/CD28-активации, проведенный нами с учетом гендерных различий условно здоровых доноров, позволил выявить отсутствие достоверных различий тестируемых параметров. На наш взгляд, отсутствие различий по половому признаку в модели исследования *in vitro* обусловлено тем фактом, что

иммунокомпетентные клетки, в частности Т-лимфоциты женщин и мужчин, по сути не отличаются по функциям и фенотипу, а их рецепторный репертуар определяется гормональным фоном организма (Laffont et al., 2014; Хазиахматова, 2016).

Интересно отметить, что действие β -эстрадиола на TCR-активированные наивные ($CD3^+CD45RA^+CD62L^+$) Т-лимфоциты сопровождалось дозозависимым повышением в них уровня экспрессии гена *U2af114* и, напротив, подавлением уровня транскрипции его антагониста *Gfi1* по сравнению с действием одного TCR-активатора (табл. 1). Кроме того, обнаруженные нами изменения фенотипического профиля наивных Т-лимфоцитов, индуцированные β -эстрадиолом на фоне TCR-активации, такие как рост числа Т-клеток $CD45RO^+$ ($P \leq 0.05$) на фоне резкого уменьшения числа Т-лимфоцитов $CD3^+CD45RA^+CD62L^+$, несущих молекулы костимуляции и активации ($CD28/CD127$), относительно влияния только TCR-активатора (табл. 2) могут указывать на созревание и дифференцировку наивных Т-лимфоцитов под воздействием изучаемого эстрогена на фоне TCR-активации.

В пользу этот факта также свидетельствуют обнаруженные нами взаимосвязи: позитивная между уровнями транскрипции мРНК гена *U2af114* и количеством $CD45RO^+$ -Т-лимфоцитов и отрицательная между экспрессией гена *U2af114* и числом $CD28^+$ -Т-лимфоцитов (при действии 10^{-7} — 10^{-5} М β -эстрадиола) и между уровнем транскрипции мРНК гена *Gfi1* и содержанием Т-лимфоцитов, несущих укороченный вариант молекулы $CD45$ ($CD45RO$).

Таким образом, наше исследование позволило выявить, что индуцированные TCR-активацией и β -эстрадиолом реакции наивных ($CD3^+CD45RA^+CD62L^+$) Т-клеток, определяющие процессы их дифференцировки и созревания, осуществляются за счет изменения активности генов *U2af114* и *Gfi1*, которая приводит к конверсии фенотипических характеристик: в частности, регистрируется рост содержания Т-клеток $CD45RO^+$ на фоне снижения числа Т-лимфоцитов, экспрессирующих молекулы костимуляции и активации ($CD28$ и $CD127$). На наш взгляд, изучение закономерностей молекулярно-генетической регуляции процессов самоподдержания Т-лимфоцитов при воздействии различных факторов может стать актуальным при формировании общей модели гомеостаза иммунокомпетентных клеток. Кроме того, определение частных молекулярно-клеточных механизмов созревания и дифференцировки Т-лимфоцитов, опосредованных половыми гормонами, расширит представления о механизмах регуляции адаптивного иммунитета на разных этапах его реализации.

Список литературы

- Гуцол А. А., Сохоневич Н. А., Литвинова Л. С. 2012. Влияние дексаметазона на активацию Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов. Вестн. Урал. мед. акад. науки. 4 (41) : 29. (Gutsol A. A., Sohonevich N. A., Litvinova L. S. 2012. Effect of dexamethasone on the activation of memory T cells and naive T lymphocytes. Bull. Ural Med. Acad. Sci. 4 (41) : 29.)
- Зильбернагель С., Деспопулос А. 2013. Наглядная физиология. М.: Бином. Лаборатория знаний. 408 с. (Zilbernagel S., Despopoulos A. 2013. Visual physiology. Moscow: Bean. Lab. Knowledge. 408 p.)
- Кудрявцев И. В. 2014. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки. Рос. иммунол. журн. 8 (4—17) : 947—964. (Kudryavtsev I. V. 2014. T-cell memory: the

main population and the stages of differentiation. Russ. Immunol. J. 8 (4—17) : 947—964.)

Литвинова Л. С., Гуцол А. А., Сохоневич Н. А., Шуплецова В. В., Кофанова К. А., Кайгородова Е. В., Гончаров А. Г. 2014. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов. Мед. иммунол. 6 (1) : 7—26. (Litvinova L. S., Gutsol A. A., Sohonevich N. A., Shupletsova V. V., Kofanova K. A., Kaygorodova E. V., Goncharov A. G. 2014. The main surface markers of the functional activity of T-lymphocytes. Med. Immunol. 6 (1) : 7—26.)

Литвинова Л. С., Мазунин И. О., Гуцол А. А., Сохоневич Н. А., Хазиахматова О. Г., Кофанова К. А. 2013а. Дозозависимые эффекты стероидных гормонов на экспрессию генов *Gfi1* и *U2af114* в Т-лимфоцитах разной степени дифференцировки. Молекуляр. биол. 47 (4) : 656—666. (Litvinova L. S., Mazunin I. O., Gutsol A. A., Sokhonevich N. A., Khaziakhmatova O. G., Kofanova K. A. 2013a. Doses-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. Балт. фед. ун-та им. И. Канта. 1 : 77—87. (Litvinova L. S., Seledtsov V. I., Shupletsova V. V., Gutsol A. A., Anishchenko Ye. S. 2011. Steroid regulation of immune memory. Bull. Baltic Federal Univ. I. Kant. 1 : 77—87.)

Литвинова Л. С., Сохоневич Н. А., Гуцол А. А., Кофанова К. А. 2013б. Эффекты иммунорегуляторных цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на процессы активации, пролиферации и апоптотической гибели Т-клеток иммунной памяти *in vitro*. Цитология. 55 (8) : 566—571. (Litvinova L. S., Sokhonevich N. A., Gutsol A. A., Kofanova K. A. 2013b. The influence of immunoregulatory cytokines IL-2, IL-7, and IL-15 upon activation, proliferation, and apoptosis of immune memory T-cells *in vitro*. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 7 (6) : 539—544.)

Тодосенко Н. М., Королева Ю. А., Хазиахматова О. Г., Юрова К. А., Литвинова Л. С. 2017. Геномные и негеномные эффекты глюкокортикоидов. Гены и клетки. 12 (1) : 27—33. (Todesenko N. M., Koroleva Yu. A., Khaziakhmatova O. G., Yurova K. A., Litvinova L. S. 2017. Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids. Genes and Cells. 12 (1) : 27—33.)

Хазиахматова О. Г. 2016. Роль стероидных гормонов в дифференцировке Т-лимфоцитов: молекулярно-генетический и иммуно-морфологический аспекты: Автореф. канд. дис. Томск. 20 с. (Khaziakhmatova O. G. 2016. The role of steroid hormones in the differentiation of T-lymphocytes: molecular genetic and immuno-morphological aspects: PhD Thesis. Tomsk. 20 p.)

Юрова К. А. 2015. Роль цитокинов, имеющих общую γ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15), в регуляции механизмов молекулярно-генетического контроля дифференцировки Т-клеток: Автореф. канд. дис. Томск. 23 с. (Yurova K. A. 2015. The role of cytokines with common receptor γ chain (IL-2, IL-7, IL-15) in regulating the mechanisms of molecular genetic control of T cell differentiation: PhD Thesis. Tomsk. 23 p.)

Altemus M., Dhabhar F. S., Yang R. 2006. Immune function in PTSD. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1071 : 167—183.

Ayrolldi E., Macchiarulo A., Riccardi C. 2014. Targeting glucocorticoid side effects: selective glucocorticoid receptor modulator or glucocorticoid-induced leucine zipper? A perspective. FASEB J. 28 : 5055—5070.

Bel S., Hooper L. V. 2015. Immunology: a bacterial nudge to T-cell function. Nature. 526 : 328—330.

Butte J. M., Lee J. S., Jesneck J., Keir M. E., Haining W. N., Sharpe A. H. 2012. CD28 costimulation regulates genome-wide effects on alternative splicing. PLoS ONE. 7 (6) : e40032.

Cheng Q., Morand E., Yang Y. H. 2014. Development of novel treatment strategies for inflammatory diseases-similarities and divergence between glucocorticoids and GILZ. Front. Pharmacol. 5 : 169. Doi: 10.3389/fphar.2014.00169.

Finlay-Schultz J., Sartorius C. A. 2015. Steroid hormones, steroid receptors, and breast cancer stem cells. J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia. 20 : 39—50.

- Furman D. 2015. Sexual dimorphism in immunity: improving our understanding of vaccine immune responses in men. *Expert Rev. Vaccines*. 14 : 461—471.
- Furman D., Hejblum B. P., Simon N., Jovic V., Dekker C. L., Thiébaud R., Tibshirani R. J., Davis M. M. 2014. Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for testosterone in the response to influenza vaccination. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 111 : 869—874.
- Giefing-Kröll C., Berger P., Lepperdinger G., Grubeck-Loebenstein B. 2015. How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination. *Aging Cell*. 14 : 309—321.
- Gruver-Yates A. L., Cidlowski J. A. 2013. Tissue-specific actions of glucocorticoids on apoptosis: a double-edged sword. *Cells*. 2 : 202—223.
- Harris N. 2015. Immunology: chronic effects of acute infections. *Nature*. 526 : 509—510.
- Heyd F., Lynch W. K. 2010. Phosphorylation-dependent regulation of PSF by GSK3 controls CD45 alternative splicing. *Mol. Cell*. 40 : 126—137.
- Heyd F., ten Dam G., Möröy T. 2006. Auxiliary splice factor U2AF26 and transcription factor Gfi1 cooperate directly in regulating CD45 alternative splicing. *Nat. Immunol.* 7 : 859—867.
- Laffont S., Rouquie N., Azar P., Seillet C., Plumas J., Aspord C., Guéry J. C. 2014. X-chromosome complement and estrogen receptor signaling independently contribute to the enhanced TLR7-mediated IFN- α production of plasmacytoid dendritic cells from women. *J. Immunol.* 193 : 5444—5452.
- Lai J. J., Lai K. P., Zeng W., Chuang K. H., Altuwajri S., Chang C. 2012. Androgen receptor influences on body defense system via modulation of innate and adaptive immune systems: lessons from conditional AR knockout mice. *Amer. J. Pathol.* 181 : 1504—1512.
- McNeill L., Salmond R. J., Cooper J. C., Carret C. K., Cassidy-Cain R. L., Roche-Molina M., Tandon P., Holmes N., Alexander D. R. 2007. The differential regulation of Lck kinase phosphorylation sites by CD45 is critical for T cell receptor signaling responses. *Immunity*. 27 : 425—437.
- Motta-Mena B. L., Heyd F., Lynch W. K. 2010. Context-dependent regulatory mechanism of the splicing factor hnRNP L. *Mol. Cell*. 37 : 223—234.
- Park J. H., Yu Q., Erman B., Appelbaum J. S., Montoya-Durango D., Grimes H. L., Singer A. 2004. Suppression of IL7R α transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival. *Immunity*. 21 : 289—302.
- Peterson M. P., Rosvall K. A., Choi J. H., Ziegenfuss C., Tang H., Colbourne J. K., Ketterson E. D. 2013. Testosterone affects neural gene expression differently in male and female juncos: a role for hormones in mediating sexual dimorphism and conflict. *PLoS ONE*. 8 (4) : e61784.
- Pfaffl M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29 : e45.
- Priyanka H. P., Krishnan H. C., Singh R. V., Hima L., Thyagarajan S. 2013. Estrogen modulates *in vitro* T cell responses in a concentration- and receptor-dependent manner: effects on intracellular molecular targets and antioxidant enzymes. *Mol. Immunol.* 56 : 328—339.
- Surh C. D., Sprent J. 2008. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity*. 29 : 848—862.
- Van Mens S. P., Meijvis S. C., Grutters J. C., Vlaeminckx B. J. M., Bos W. J. W., Rijkersa G. T. 2012. Dexamethasone treatment has no effect on the formation of pneumococcal antibodies during community-acquired pneumonia. *Clin. Vaccine Immunol.* 19 : 811—813.
- Wieckowski E. U., Visus C., Szajnik M., Szczepanski M. J., Storkus W. J., Whiteside T. L. 2009. Tumor-derived microvesicles promote regulatory T cell expansion and induce apoptosis in tumor-reactive activated CD8 $^+$ T lymphocytes. *J. Immunol.* 183 : 3720—3730.
- Wu Z., Yates A. L., Hoyne G. F., Goodnow C. C. 2010. Consequences of increased CD45RA and RC isoforms for TCR signaling and peripheral T cell deficiency resulting from heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like mutation. *J. Immunol.* 185 : 231—238.
- Zhao S., Zhu W., Xue S., Han D. 2014. Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity. *Cell Mol. Immunol.* 11 : 428—437.

Поступила 6 III 2018

EFFECT OF TCR-ACTIVATION AND β -ESTRADIOL ON THE MATURATION AND DIFFERENTIATION OF CD45RA $^+$ T-CELLS *IN VITRO*

O. G. Khaziakhmatova, K. A. Yurova, N. M. Todosenko, L. S. Litvinova*

Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies,
Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, 236029;
* e-mail: larisalitvinova@yandex.ru

Evaluated the effect of the different concentrations of female sex hormone β -estradiol at the cellular-molecular reactions that determine the maturation and differentiation of TCR-activated naive (CD3 $^+$ CD45RA $^+$ CD62L $^+$) T-cells *in vitro*. CD3 $^+$ CD45RA $^+$ CD62L $^+$ T-cells were obtained from the fraction blood mononuclear cells of healthy donors by the method immunomagnetic separation. The change in the immunophenotype of T-lymphocytes was analyzed by flow cytometry; by polymerase chain reaction defined level of mRNA gene expression *U2af114* and *Gfi1* in CD3 $^+$ CD45RA $^+$ CD62L $^+$ T-cells. In general, β -estradiol-induced changes in the expression of *U2af114* and *Gfi1* genes in T-cells affect the maturation and differentiation of CD45RA $^+$ CD62L $^+$ T-lymphocytes, which leads to the conversion of the phenotype of naive lymphocytes and is characterized by increased numbers of CD45RO $^+$ -T-lymphocytes and by reduction in the content of T-cells that have molecules of activation and costimulation (CD127 and CD28) on their membrane surface.

Key words: β -estradiol, naive T-lymphocytes, alternative splicing, activation, differentiation