

ЭФФЕКТЫ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ НА ПРОДУКЦИЮ Th1-/Th2-ЦИТОКИНОВ CD45RO⁺Т-КЛЕТКАМИ

Гуцол А.А., Литвинова Л.С.

*Лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий Инновационного парка БФУ им. И. Канта,
г. Калининград, Россия*

Резюме. Целью нашего исследования была оценка влияния стероидных гормонов на баланс продукции Th1-/Th2-цитокинов (IL-2, IFN γ , IL-4, IL-10) активированными CD45RO⁺ лимфоцитами. В наших экспериментах четко проявилась тенденция разнонаправленного влияния стероидных гормонов на секреторную активность Т-лимфоцитов. Было показано, что развитие клеточных иммунных реакций, опосредуемых Т-хелперами 1 типа, регулируется преимущественно женскими половыми гормонами. Глюкокортикоиды, в свою очередь, оказывают выраженное влияние на формирование гуморального Th2-иммунного ответа. В отношении андрогенов были получены неоднозначные результаты.

Ключевые слова: Т-клетки памяти, стероидные гормоны, цитокины

Адрес для переписки:

Гуцол Алевтина Александровна
аспирант, младший научный сотрудник
лаборатории иммунологии и клеточных
биотехнологий Инновационного парка
БФУ им. И. Канта
236016, Россия, г. Калининград, ул. А. Невского,
14, каб. 201.
Тел.: 8 (921) 617-23-14.
E-mail: gutsal.alevtina@yandex.ru

Авторы:

Гуцол А.А. — аспирант, младший научный
сотрудник лаборатории иммунологии и клеточных
биотехнологий Инновационного парка БФУ
им. И. Канта, г. Калининград
Литвинова Л.С. — д.м.н., профессор, заведующая
лабораторией иммунологии и клеточных
биотехнологий Инновационного парка БФУ
им. И. Канта, г. Калининград

Поступила 29.01.2013

Отправлена на доработку 12.02.2013

Принята к печати 18.02.2013

EFFECTS OF STEROID HORMONES UPON Th1/Th2 CYTOKINE PRODUCTION BY CD45RO⁺ T CELLS

Gutsol A.A., Litvinova L.S.

I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Abstract. The aim of our study was to evaluate effects of steroid hormones upon the imbalance of Th1/Th2 cytokine production (IL-2, IFN γ , IL-4, IL-10) by CD45RO⁺ activated lymphocytes. In our experiments, we have shown a clear trend of multidirectional influence of steroid hormones upon secretory activity of T-lymphocytes. We have revealed that development of cellular immune responses mediated by type 1 T helper cells is regulated primarily by female sex hormones. Glucocorticoid hormones seem to exert a marked effect upon development of humoral Th2 immune response. For androgens, some controversial results have been obtained. (*Med. Immunol.*, 2013, vol. 15, N 3, pp 263-268)

Keywords: memory T cells, steroid hormones, cytokines

Address for correspondence:

Gutsol Alevtina A.
PhD Candidate, Research Associate, Laboratory of
Immunology and Cell Biotechnologies, Innovation
Park, I. Kant Baltic Federal University
236016, Russian Federation, Kaliningrad,
A. Nevskogo str., 14, room 201.
Phone: 7 (921) 617-23-14.
E-mail: gutsol.alevtina@yandex.ru

Authors:

Gutsol A.A., PhD Candidate, Research Associate,
Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies,
Innovation Park, I. Kant Baltic Federal University,
Kaliningrad
Litvinova L.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief,
Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies,
Kaliningrad

Received 29.01.2013

Revision received 12.02.2013

Accepted 18.02.2013

Введение

В настоящее время интерес к оценке состояния цитокиновой сети продиктован тем фактом, что цитокины являются наиболее многочисленной группой биологически активных веществ, участвующих в регуляции иммунного ответа. Именно сбалансированностью этих медиаторных молекул определяется форма последующего специфического ответа – преимущественно клеточного или гуморального [2, 4, 12].

Согласно современным представлениям, хронический дисбаланс активации Th1-/Th2-лимфоцитов может играть ключевую роль в иммунопатогенезе многих заболеваний [5, 9, 11, 13]. В частности, основной механизм формирования аутоиммунной патологии связывают с преимущественной активацией Th2-клонов клеток [1, 3]. В связи с этим, изучение факторов, влияющих на запуск регуляторных механизмов, опосредующих Т-хелперную направленность (в условиях антигенной стимуляции), может иметь важное значение для разработки новых терапевтических подходов к лечению иммунных расстройств, опосредованных нарушением Т-клеточного баланса (Th1/Th2). Известно, что стероидные гормоны являются одними из ключевых регуляторов иммунных процессов. Общеизвестной точкой зрения является то, что андрогены и кортикостероиды обладают выраженным иммунодепрессивным действием, тогда как эстрогены являются стимуляторами иммунных реакций [8, 14]. В связи с этим, **целью нашего исследования** явилась оценка влияния стероидных гормонов на баланс продукции Th1-/Th2-цитокинов (IL-2, IFN γ , IL-4, IL-10) активированными CD45RO⁺ лимфоцитами.

Материалы и методы

Материалом исследования служила венозная кровь 22 условно здоровых доноров: 16 мужчин и 6 женщин в возрасте от 19 до 39 лет. Выделение мононуклеарной фракции крови осуществляли методом центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Urografin («Schering» Испания; «Pharmacia» Швеция) ($\rho = 1,077$ г/см³). Популяцию Т-клеток иммунной памяти получали методом иммуномагнитной сепарации (MidiMACS Separator, LS Columns, «Miltenyi Biotec» Germany) с использованием моноклональных антител к CD45RO⁺ с парамагнитными частицами (MicroBeads human, «Miltenyi Biotec» Germany). Содержание целевой фракции CD45RO⁺ лимфоцитов в исследуемых образцах составляло не менее 95%. Далее CD45RO⁺ клетки (1×10^6 кл/мл) культивировали в 48-луночном планшете в бесывороточной среде Искова («Sigma», США),

содержащей 0,5% человеческого сывороточного альбумина («Микроген», Россия), 5×10^{-5} М меркаптоэтанол («Acros Organics», США) и 30 мкг/мл гентамицина, в присутствии разных концентраций дексаметазона (Dex) («KRKA», Словения), тестостерона (Test) (Sigma, USA) и эстрадиола (Estr) (Sigma, USA), или без них в контроле, в течение 48 часов при 37 °С, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали реагент T-Cell Activation/Expansion Kit human (Ac/Exp) («Miltenyi Biotec», Германия), который представляет собой анти-биотиновые MACSiBeadTM частицы с биотинилированными антителами против человеческих CD2⁺, CD3⁺, CD28⁺. Были использованы следующие варианты культивирования: 1) интактная проба; 2) проба с добавлением Ac/Exp; 3) пробы с добавлением Ac/Exp и Dex (10^{-7} М; 10^{-6} М; 10^{-5} М); 4) пробы с добавлением Ac/Exp и Test (10^{-7} М; 10^{-6} М; 10^{-5} М); 5) пробы с добавлением Ac/Exp и Est (10^{-7} М; 10^{-6} М; 10^{-5} М). Содержание в культуральных супернатантах ключевых цитокинов, определяющих секреторную активность Т-лимфоцитов (IL-2, IL-4, IL-10, IFN γ), определяли иммуноферментным методом с использованием тест-систем, согласно протоколу фирмы-производителя («Вектор-Бест», г. Новосибирск). Статистический анализ данных проводили с использованием программного пакета Statistika 7.0. Рассчитывали среднее (М) и стандартное отклонение (σ). Достоверность различий оценивали с использованием U-критерия Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

По результатам исследования было установлено, что добавление Т-клеточного активатора в среду культивирования способствовало значительному увеличению уровней продукции Т-клетками памяти ключевого провоспалительного цитокина – IL-2 (в 7,7 раза по сравнению с интактной пробой [$p < 0,05$]). В свою очередь, Dex и Test в концентрации 10^{-5} М снижали исследуемый показатель в активируемых культурах CD45RO⁺ клеток на 32 и 66% соответственно ($p < 0,05$). Культивирование клеток в присутствии эстрадиола также приводило к снижению уровней исследуемого цитокина. При этом супрессивный эффект наблюдался во всем исследуемом спектре концентраций ($p < 0,05$).

Было показано, что содержание IFN γ в культурах с Т-клеточным активатором увеличивалось в 30 раз по сравнению со спонтанной продукцией цитокина ($p < 0,05$). Dex в максимальной концентрации снижал секрецию IFN γ в среднем на 32%, по сравнению с пробой с добавлением Ac/Exp ($p < 0,05$). При добавлении Est в кон-

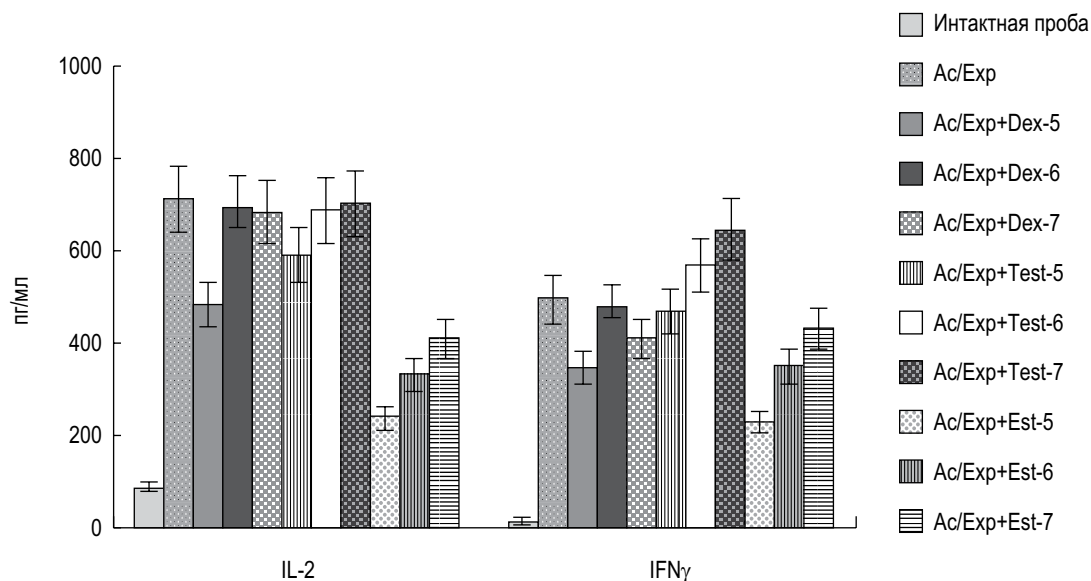


Рисунок 1. Продукция IL-2 и IFN γ в культурах CD45RO⁺ лимфоцитов с разными условиями инкубации

центрациях 10⁻⁵ и 10⁻⁶ М, продукция IFN γ также снижалась в 3 и 2 раза соответственно ($p < 0,05$). В свою очередь, Test не оказывал значимого влияния на исследуемый параметр ($p > 0,05$) (рис. 1).

Таким образом, интерпретируя полученные данные, можно предположить, что снижение содержания IFN γ в супернатантах клеточных культур под действием гормонов может быть обусловлено ранее установленным супрессивным эффектом стероидов на продукцию IL-2. Последний обладает способностью усиливать выработку IFN γ , в частности через активацию CD4⁺ лимфоцитов [7, 10].

Далее мы оценивали влияние стероидных гормонов на продукцию CD45RO⁺ клетками ме-

диаторов, обладающих противовоспалительным действием — IL-4 и IL-10.

Нами было установлено, что концентрация IL-4 значительно возросла (в 15,5 раз) при инкубации CD45RO⁺ лимфоцитов с активатором Ac/Exp ($p < 0,05$). Dex во всех концентрациях подавлял продукцию исследуемого цитокина ($p < 0,05$). Полученные нами результаты противоречат данным литературы [6]. Снижение уровней продукции IL-4 Т-клетками памяти в нашем эксперименте может быть обусловлено использованием более высоких, нежели физиологические, концентраций гормона. Культивирование лимфоцитов с фенотипом CD45RO⁺ в присутствии половых гормонов также приводило к снижению продукции IL-4, однако данный эффект наблю-

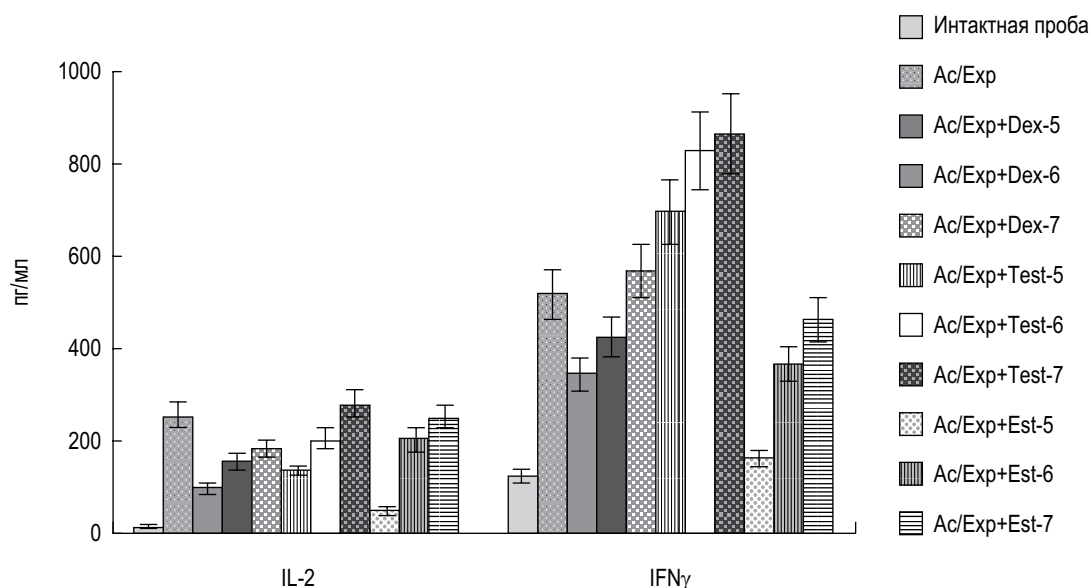


Рисунок 2. Продукция IL-4 и IL-10 в культурах CD45RO⁺ лимфоцитов с разными условиями инкубации

дался только при максимальных концентрациях (10^{-5}) как мужских, так и женских гормонов.

Продукция IL-10 в процессе активации клеток увеличивалась (на 76%) по сравнению с базальным уровнем ($p < 0,05$). При культивировании CD45RO⁺ лимфоцитов в присутствии Dex и Est (в концентрациях 10^{-5} и 10^{-6} М) наблюдалось уменьшение количества IL-10 в супернатантах клеточных культур ($p < 0,05$). Добавление Test, напротив, способствовало увеличению данного показателя, при этом стимулирующий эффект наблюдался во всем исследуемом спектре концентраций ($p < 0,05$) (рис. 2).

Таким образом, в наших экспериментах четко проявилась тенденция разнонаправленного влияния стероидных гормонов на баланс продукции Th1/Th2 цитокинов. Так, на фоне активации эстрогены в большей степени обладают способностью угнетать продукцию примированными T-клетками памяти молекул Th1-ответа, в то время как глюкокортикоиды преимущественно дей-

ствуют на секрецию Th2-цитокинов. В отношении мужских половых гормонов однозначная интерпретация полученных данных на данном этапе исследования представляется весьма затруднительной.

Таким образом, стероид-опосредованная регуляция продукции T-клетками памяти ключевых лимфокинов может быть основополагающим компонентом в формировании того или иного типа иммунных реакций на фоне антигенной стимуляции клеток.

Исследование выполнено в рамках реализации Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (ГК № П1203 от 14.06.2011 и Соглашение 14.132.21.1341 от 02.10.12 г.), а также при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации для поддержки для государственной поддержки молодых российских ученых — докторов наук № МД-4999.2012.7.

Список литературы

1. Диел Ф. Цитокины у больных с атопией и без атопии — влияние факторов внешней среды // Медицинская иммунология. — 2001. — Т. 3, № 1. — С. 15-25.
2. Мешкова Р.Я. Руководство по иммунопрофилактике для врачей. — Смоленск, 1998. — 137 с.
3. Садыгов А.С., Сесь Т.П., Мурыгина Г.Л., Малышев М.Е., Бакланова О.Э. Активность T-лимфоцитов хелперов 2 типа у больных бронхиальной астмой и туберкулезом легких // Медицинская иммунология. — 2001. — Т. 3, № 4. — С. 547-550.
4. Швыдченко И.Н., Нестерова И.В., Синельникова Е.Ю. Цитокинсекретирующая функция нейтрофильных гранулоцитов // Иммунология. — 2005. — № 1. — С. 31-34.

Ссылки 5-14 см. в References (стр. 267-268). See References for numbers 5-14 at pp. 267-268.

References

1. Diel F. Tsitokiny u bol'nykh s atopiey i bez atopii — vliyanie faktorov vneshney sredy [Cytokines in atopics and non-atopics — influence of environmental chemicals]. *Meditsinskaya immunologiya — Medical Immunology*, 2001, no. 3, pp. 15-25.
2. Meshkova R.Ya. Rukovodstvo po immunoprofilaktike dlya vrachey [Immunoprophylaxis guideline for clinicians]. *Smolensk*, 1998. 137 p.
3. Sadygov A.S., Ses` T.P., Murygina G.L., Malyshev M.E., Baklanova O.E. Aktivnost` T-limfotsitov khelperov 2 tipa u bol'nykh bronkhial'noy astmoy i tuberkuliozom liogkikh [Activity of Th2 Lymphocytes in Patients with Bronchial Asthma and Pulmonary Tuberculosis]. *Meditsinskaya immunologiya — Medical Immunology*, 2001, vol. 4, no. 3, pp. 547-550.
4. Shvydchenko I.N., Nesterova I.V., Sinel'nikova E.Yu. Tsitokinsekretiruyushchaya funktsiya neytrofil'nykh granulotsitov [The cytokine-secreting function of neutrophil granulocytes]. *Immunologiya — Immunology*, 2005, no. 1, pp. 31-34.
5. Arakawa S., Hatano Y., Katagiri K. Differential expression of mRNA for Th1 and Th2 cytokine-associated transcription factors and suppressors of cytokine signalling in peripheral blood mononuclear cells of patients with atopic dermatitis. *Clin. Exp. Immunol.*, 2004, vol. 135, no. 3, pp. 505-510.
6. Daynes R., Araneo A. Contrasting effects of glucocorticoids on the capacity of T cells to produce the growth factors interleukin 2 and interleukin 4. *Eur. J. Immunol.*, 1989, vol. 19, no. 12, p. 2319.
7. Ehlers S., Smith K.A. Differentiation of T cell lymphokine gene expression: the in vitro acquisition of T cell memor. *J. Exp. Med.*, 1991, vol. 173, no. 1, pp. 25-36.
8. Fedor M.E., Rubinstein A. Effects of long-term low-dose corticosteroid therapy on humoral immunity. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2006, vol. 97, no. 1, pp. 113-116.

9. Hui Y., Xie J.J., Li L., Xiang H.X., Mu H.J., Yin Y., Zhang X.J. Association between suppressors of cytokine signaling mRNA expression and Th1/Th2 balance in children with asthma. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 2012, vol. 14, no. 10, pp. 755-758.
10. Letourneau S., Krieg C., Pantaleo G., Boyman O. IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2009, vol. 123, no. 4, pp. 758-762.
11. Lu K., Feng X., Deng Q., Sheng L., Liu P., Xu S., Su D. Prognostic role of serum cytokines in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Onkologie*, 2012, vol. 35, no. 9, pp. 494-498.
12. Ohta A., Sato N., Yahata T., Ohmi Y., Santa K., Sato T., Tashiro H., Habu S., Nishimura T. Manipulation of Th1/Th2 balance *in vivo* by adoptive transfer of antigen-specific Th1 or Th2 cells. *J. Immunol. Methods*, 1997, vol. 209, no. 1, pp. 85-92.
13. Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2000, vol. 85, no. 1, pp. 9-18.
14. Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev. Immunol.*, 2004, vol. 22, pp. 745-763.