

Хазиахматова Ольга Геннадьевна

**РОЛЬ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ В
ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ Т-ЛИМФОЦИТОВ:
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И ИММУНО-
МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АСПЕКТЫ**

03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего профессионального образования "Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта"

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Литвинова Лариса Сергеевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
лаборатории экологической
иммунологии ФГБОУ Институт
экологии и генетики
микроорганизмов УрО РАН

Заморина Светлана Анатольевна

доктор медицинских наук,
профессор кафедры
патологической физиологии ГБОУ
ВПО «Сибирский
государственный медицинский
университет» Министерства
здравоохранения РФ

Воронкова Ольга Владимировна

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Институт экспериментальной медицины" (г. Санкт-Петербург)

Защита состоится ____ _____ в __ч на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, г. Томск, Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России и на сайте <http://www.ssmu.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Петрова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Иммунная система организма характеризуется сложной ауторегуляцией (Ярилин А.А., 2010; Черешнев В.А., 2011; Thomas J.A., Vadini M., 2011; Harris N., 2015; Bel S., Hooper L.V., 2015). Перестройка антигенного гомеостаза может происходить при изменении метаболизма (пластического и энергетического баланса) или гормонального фона (стресс, половой цикл у женщин, пубертатный период, возрастные изменения) (Liu X., Shi H., 2015; Spoerri M. et al., 2015). Нейроэндокринная система (через стероидные гормоны, нейропептиды, адреналовые и тиреоидные гормоны, простагландины и т.п.), способна оказывать воздействие на все звенья иммунитета, о чем свидетельствует изменение уровней экспрессии гормонов и их концентраций в периферическом кровотоке (Kim M.S., 2003; Beigneux A.P., 2003; Briere S., 2004; Hammes S.R., Davis P.J., 2015; Alkemade A., 2015). Реакции системного характера на глюкокортикоиды при развитии иммунитета в онтогенезе, гормональные перестройки при стресс-реакции, развитие патологических процессов (иммунодефициты, аутоиммунные заболевания) прямо или опосредованно связаны с лимфоэндокринными взаимодействиями (Полевщиков А.В., 2006; Finlay-Schultz J. et al., 2015; Giefing-Kröll C. et al., 2015). В регуляции адаптивных иммунных реакций важнейшая роль принадлежит стероидным гормонам, уровни которых в макроорганизме подвержены значительным колебаниям; действие стероидов на иммунитет носит дозозависимый характер (Karagiannidis Y. et al., 2003; Fedor M.E. et al., 2006; Zen M. et al., 2011; van Mens S.P. et al., 2012; Cao Y. et al., 2013; Gruver-Yates A.L. et al., 2013; Ayroldi E. et al., 2014; Cheng Q. et al., 2014; Furman D., 2015). Несмотря на огромное число работ, посвященных модулирующему влиянию стероидных гормонов на клетки системы крови, известное внутриклеточное расположение их рецепторов, общие механизмы и молекулярно-генетическая составляющая их действия малоизвестны.

Степень проработанности темы. Молекулярно-генетические механизмы дифференцировки наивных Т-клеток-предшественниц в Т-клетки памяти заслуживают особого внимания в изучении процессов формирования иммунного ответа (Heyd F. et al., 2006; De Arras L., Alper S., 2013; Litvinova L.S. et al., 2013; Martinez N.M., Lynch K.W., 2013). Альтернативный сплайсинг является одним из важнейших механизмов регуляции генной активности клеток врожденного и адаптивного иммунитета (Mustelin T., Tasken K., 2003; De Arras L., Alper S., 2013; Rosenberg A.B. et al., 2015; Mockenhaupt S., Makeyev E.V., 2015). Важность регуляции альтернативного сплайсинга у человека иллюстрируется геном *Ptpnc1*, кодирующим лейкоцитарный рецептор CD45, сопряженный с функциональной активностью Т-клеток человека, пре-мРНК которого состоит из 33 экзонов (Mustelin T. et al., 2003; McNeill L. et al., 2007; Wu Z. et al., 2010). С помощью механизма альтернативного сплайсинга, в результате дифференциального использования трех экзонов (4, 5 и 6) внеклеточного домена гена *Ptpnc1*, возможна генерация восьми различных изоформ молекулы CD45 (Dornan S. et al., 2002; Zheng X. et al., 2015), пять из которых присутствуют на лимфоцитах (R0, RA, RB, RBC и RABC изоформы) и определяют этапы их дифференцировки (Heyd F. et al., 2006; Melton A.A. et al., 2007; Heyd F., Lynch W. K., 2010; Butte J.M. et al., 2012). Области белка CD45, кодируемые переменными экзонами, сильно гликозилированы и тем самым предотвращают гомодимеризацию CD45. После активации Т-клеток, пропуск вариабельных экзонов CD45 приводит к гомодимеризации рецептора на клеточной поверхности и образованию неактивной формы фосфатазы со снижением сигнализации через Т-клеточный рецептор (TCR) (Martinez M.N. et al., 2013; Юрова К.А. и соавт., 2015). По сути, альтернативный сплайсинг молекулы CD45 является механизмом обратной связи для поддержания Т-клеточного гомеостаза.

Несмотря на то, что многочисленные данные свидетельствуют о значимости изменений альтернативного сплайсинга многих генов во время иммунного ответа, до

сих пор не представлены систематические исследования, которые позволяют определить многообразие факторов экзо- и эндогенной природы, регулирующих экспрессию генов на уровне альтернативного сплайсинга в ответ на влияние стимулов антигенной и неантигенной природы. Мы предполагаем, что стероидные гормоны принимают непосредственное участие в дифференцировке и созревании наивных Т-клеток посредством регуляции альтернативного сплайсинга гена *Ptprc*, что, в конечном итоге, может определить исход как первичных, так и вторичных иммунных реакций. В связи с вышесказанным, **целью исследования** явилось определение роли стероидных гормонов в регуляции молекулярно-генетических и иммуноморфологических процессов, определяющих *дифференцировку и созревание* наивных Т-клеток, в условиях CD2/CD3/CD28 – стимуляции.

Задачи исследования:

1. Оценить влияние стероидных гормонов на уровни относительной экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1* *hTERT*, регулирующих альтернативный сплайсинг гена *Ptprc* (кодирующего молекулу CD45) в наивных Т-клетках на фоне CD2/CD3/CD28 – стимуляции.
2. Исследовать эффекты стероидных гормонов на мембранную экспрессию молекул костимуляции/активации и изоформ общелейкоцитарного рецептора CD45 наивными (CD45RA⁺CD62L⁺) Т-клетками в условиях CD2/CD3/CD28 – стимуляции.
3. Оценить взаимосвязь между изменением уровней экспрессии генов *U2af114*, *Gfi1* и *hTERT* и фенотипическими проявлениями, характеризующими процессы дифференцировки и созревания наивных Т-клеток, индуцированные стероидными гормонами, на фоне CD2/CD3/CD28 – стимуляции.
4. Установить общие закономерности и особенности влияния стероидных гормонов на молекулярно-генетические и иммуноморфологические механизмы дифференцировки наивных Т-клеток, ассоциированные с процессом альтернативного сплайсинга рецептора CD45, в условиях CD2/CD3/CD28 – стимуляции.

Научная новизна

Впервые показано, что процессы дифференцировки наивных (CD45RA⁺CD62L⁺) Т-клеток, опосредованные действием стероидных гормонов (дексаметазона, β-эстрадиола и тестостерона), осуществляются за счет изменения экспрессии генов *U2af114*, *Gfi1* и *hTERT*, регулирующих альтернативный сплайсинг гена *Ptprc* (кодирующего молекулу CD45). Фенотипическими критериями индуцированной стероидами дифференцировки и созревания наивных Т-клеток является рост числа дубль-позитивных (CD45RA/RO) и CD45RO⁺ Т-клеток на фоне снижения количества Т-лимфоцитов, экспрессирующих мембранные молекулы костимуляции и активации (CD28 и CD127). *Впервые* установлено, что на фоне CD2/CD3/CD28-активации стероидные гормоны (глюкокортикоид дексаметазон, во всем спектре физиологических концентраций $10^{-7} - 10^{-5}$ М; женский половой гормон β-эстрадиол в концентрациях $10^{-7} - 10^{-6}$ М, соответствующих III триместру беременности) увеличивают уровень экспрессии мРНК гена *U2af114* и, напротив, снижают экспрессию генов *Gfi1* и *hTERT*. Это способствует росту числа дубль-позитивных форм (CD45RA/RO) и CD45RO⁺ Т-лимфоцитов на фоне уменьшения содержания CD45RA⁺CD62L⁺CD28⁺ и CD45RA⁺CD62L⁺CD127⁺ (в случае воздействия β-эстрадиола) Т-клеток. Выявленные изменения свидетельствуют о глюкокортикоид- и эстроген-опосредованной модуляции процессов дифференцировки и созревания наивных (CD45RA⁺CD62L⁺) Т-лимфоцитов в эффекторные клетки и Т-клетки памяти, индуцированных CD2/CD3/CD28 (TCR)-активацией. *Приоритетными* являются данные, свидетельствующие, что тестостерон, во всем спектре физиологических концентраций ($10^{-8} - 10^{-6}$ М) и β-эстрадиол в концентрациях $10^{-9} - 10^{-8}$ М, соответствующих фолликулярной и лютеиновой фазам менструального цикла, угнетают процессы дифференцировки и созревания наивных Т-клеток периферической крови в эффекторные лимфоциты и Т-клетки памяти, индуцированные CD2/CD3/CD28-активацией, что приводит к сохранению на наивных клетках экспрессии изоформы рецептора CD45 - CD45RA с высокой фосфатазной

активностью, а также экспрессии молекул костимуляции и активации Т-клеток (CD28; CD127). Эффекты тестостерона (10^{-8} - 10^{-6} М) и β -эстрадиола (10^{-9} – 10^{-8} М) на дифференцировку и созревание CD2/CD3/CD28-активированных наивных Т-клеток ассоциированы с их супрессивным влиянием на уровень относительной экспрессии мРНК гена *U2af114* и стимулирующим - на транскрипцию мРНК генов *hTERT* и *Gfi1*.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные знания фундаментального характера раскрывают новые *молекулярно-генетические и иммуно-морфологические аспекты* стероидной регуляции процессов дифференцировки и созревания наивных Т-клеток, ассоциированных с механизмом альтернативного сплайсинга гена *Ptprc* (кодирующего молекулу CD45). Представленные данные *имеют важное фундаментально-прикладное значение* для понимания ключевых (интегральных) условий сохранения гомеостаза и могут быть востребованы для моделирования и прогнозирования процессов дифференцировки и созревания иммунокомпетентных клеток с участием альтернативного сплайсинга. **Практическая значимость** полученных данных о роли стероидных гормонов в регуляции альтернативного сплайсинга гена *Ptprc* (кодирующего общий лейкоцитарный антиген CD45), может представлять интерес для расшифровки механизмов перестройки иммунной системы (иммунный ответ на раздражители инфекционной и неинфекционной природы, возрастные перестройки и т.д.), а также для разработки научно обоснованных технологий коррекции дисбаланса иммунитета.

Результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе на кафедре фундаментальной медицины медицинского института БФУ им. И.Канта и молекулярной физиологии и биофизики химико-биологического института БФУ им. И. Канта г. Калининграда.

Методология и методы исследования

Согласно поставленным задачам, выбраны высокоинформативные методы исследования, которые выполнялись на базе современной научно-исследовательской лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта. В качестве материала исследования использовали первичные культуры наивных ($CD45RA^+CD62L^+$) Т-лимфоцитов, полученные методом иммуномагнитной сепарации из взвеси мононуклеарных клеток периферической венозной крови условно здоровых доноров.

Основные методы исследования

1. Иммуномагнитная сепарация (получение монокультур $CD45RA^+CD62L^+$ Т-клеток из взвеси мононуклеарных клеток условно здоровых доноров);
2. Культуральные методы исследования;
3. Оценка жизнеспособности наивных ($CD45RA^+CD62L^+$) Т-клеточных культур; определение поверхностных маркеров (CD45, CD3, CD45RA, CD45RO, CD28, CD127) на Т-клетках методом проточной цитометрии;
4. Определение уровней относительной экспрессии генов *U2af114*, *Gfi1* и *hTERT* методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени;
5. Статистический анализ результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. На фоне CD2/CD3/CD28-стимуляции, регуляция механизма альтернативного сплайсинга гена *Ptprc* (кодирующего молекулу CD45), индуцированная стероидами, осуществляется за счет изменения активности генов *U2af114*, *Gfi1* и *hTERT*. Это выражается в конверсии клеточного фенотипа наивных Т-клеток (рост числа дубль-позитивных ($CD45RA/RO$) и $CD45RO^+$ Т-клеток и снижение содержания CD28 – и CD127 - позитивных Т-лимфоцитов) и свидетельствует об опосредованных стероидами процессах дифференцировки и созревания Т-клеток.

2. На фоне CD2/CD3/CD28-стимуляции, эффекты стероидных гормонов реализуются через однонаправленное изменение активности генов *Gfi1* и *hTERT*, и

напротив, разнонаправленную динамику экспрессии генов *U2af114* и *hTERT* в наивных (CD45RA⁺CD62L⁺) Т-клетках.

3. Стероидные гормоны оказывают разнонаправленное действие на процессы дифференцировки и созревания наивных Т-клеток, ассоциированные с механизмом альтернативного сплайсинга гена *Ptprc*. Дексаметазон (в спектре физиологических концентраций $10^{-7} - 10^{-5}$ М) и β-эстрадиол в дозах $10^{-7} - 10^{-5}$ М, соответствующих III триместру беременности, способствуют дифференцировке и созреванию CD2/CD3/CD28-активированных наивных Т-клеток в эффекторные клетки и Т-лимфоциты памяти. Тестостерон (в спектре физиологических концентраций $10^{-8} - 10^{-6}$ М) и β-эстрадиол в дозах $10^{-9} - 10^{-8}$ М, соответствующих фолликулярной и лютеиновой фазам менструального цикла, предотвращают дифференцировку и созревание зрелых наивных Т-клеток периферической крови, индуцированные CD2/CD3/CD28-стимуляцией.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала, использованием современных методов (*иммуномагнитная сепарация, культуральные методы исследования, проточная цитофлуориметрия, полимеразная цепная реакция*) и методических подходов, высокотехнологичного оборудования, а также адекватных критериев для статистической обработки результатов.

Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на межгородской научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (г. Санкт-Петербург, 2011, 2012, 2013 гг.); международной заочной научно-практической конференции «Научная дискуссия: вопросы медицины» (г. Москва, 2013, 2015 гг.); III-ей Международной конференции «Фундаментальные и прикладные исследования в биологии» (Fundamental and applied research in biology 3rd international scientific conference) (Украина, г. Донецк, 2014 г.); Международной научно-практической конференции «Перспективы развития науки и образования» (г. Москва, 2013, 2015 гг.); объединенном иммунологическом форуме (г. Нижний Новгород, 2013 г.); международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (г. Москва, 2015 г.); XII конференции иммунологов Урала (г. Пермь, 2015 г.); XV всероссийском научном форуме с международным участием им. акад. В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (г. Санкт-Петербург, 2015 г.), а также на научно-образовательных семинарах на базе Лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского Федерального Университета им. И. Канта (г. Калининград, 2012-2015). В работе приводятся результаты научно-исследовательских работ «Исследование молекулярно-биологических механизмов модуляции иммунологической памяти в норме и при аутоиммунной патологии» (ГК №П1252 от 27 августа 2009 г.); «Стероидная регуляция иммунной памяти» (Грант Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых - докторов наук (МД-4999.2012.7); «Разработка технологии дозозависимого управления процессами клеточного гомеостаза и функциональным состоянием Т-клеток памяти с применением биомолекул (цитокинов)» (Соглашение 14.132.21.1778 от 01.10.12 г.); «Роль стероидных гормонов в дифференцировке Т-клеток памяти: молекулярно-генетический и иммуно-морфологический аспекты» (Соглашение № 14.А18.21.1121 от 14.09.2012 г.). «Исследование влияния иммунорегуляторных цитокинов на регуляцию процессов активации, дифференцировки и самоподдержания Т-клеток иммунной памяти» (СП СП-454.2013.4 2013-2015гг. от 28.02.2013).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 22 печатные работы, из них 9 статей в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, определенных ВАК РФ, 13 статей и тезисов в материалах конференций и симпозиумов.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 142 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка использованной литературы. Работа

иллюстрирована 25 рисунками и 7 таблицами. Библиографический указатель включает 396 источников (42 - отечественных и 354 - иностранных).

Автор принимал непосредственное участие в разработке дизайна и планировании исследования. Результаты получены, проанализированы и обобщены в выводах и положениях автором лично.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

В основу работы положены результаты комплексного исследования 120 здоровых доноров (60 мужчин и 60 женщин в возрасте от 22 до 35 лет). *Критериями исключения* из исследования являлись: возраст моложе 18 и старше 35 лет; период обострения хронических воспалительных заболеваний; инфекционные, онкологические, аутоиммунные, наследственные и психические болезни; алкогольная и наркотическая зависимости. Материалом для исследования служила венозная кровь (20 мл), взятая из локтевой вены с помощью стандартных вакуумных систем "BD VACUTAINER TM" («Greiner-bio-one», Австрия), стабилизированная К₃ЭДТА. Разрешение на проведение исследования получено в локальном этическом комитете (№ 5 от 5 ноября 2013 г.). Все экспериментальные исследования проводились на базе лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий Инновационного парка БФУ им. И.Канта (зав. лабораторией – д-р мед. наук, Л.С. Литвинова). Дизайн исследования схематично представлен на **рисунке 1**.

Выделение мононуклеарных лейкоцитов из периферической крови (МНК) осуществляли стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографин («Pharmacia», Швеция) ($\rho=1,077$ г/см³). Полученную взвесь мононуклеарных клеток довели фосфатно-солевым буфером (с 0,5% BSA «Miltenyi Biotec», Германия) до 1 мл и в дальнейшем использовали для выделения фракций CD45RA⁺CD62L⁺ Т-лимфоцитов. Для получения монокультур наивных Т-клеток (CD45RA⁺CD62L⁺) из МНК был использован метод иммуномагнитной сепарации (ИМС), в основе которого лежит технология MACS® («Miltenyi Biotec» Германия).

В эксперименте использовали клеточные культуры, в которых содержание CD3⁺CD45RA⁺CD62L⁺CD14⁻CD19⁻ клеток (далее CD45RA⁺CD62L⁺- клетки) составляло в среднем $97,5 \pm 2,12\%$. Полученные первичные культуры CD45RA⁺CD62L⁺ клеток (1×10^6 кл/мл) термостатировали в 48-луночных планшетах в бессывороточной среде Искова («Sigma-Aldrich», США), содержащей 0.5% сывороточного альбумина человека («Микроген», Россия), 5×10^{-5} М β-меркаптоэтанола («Acros Organics», США) и 30 мкг/мл гентамицина в течение 48 ч при 37⁰С, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂.

Для определения эффектов стероидных гормонов на процессы дифференцировки и созревания наивных (CD45RA⁺CD62L⁺) Т-клеток была использована *активационная модель*, отражающая процесс антиген-независимой активации Т-лимфоцитов. В эксперименте были использованы физиологические концентрации стероидных гормонов: дексаметазон («KRKA», Словения), тестостерон (Sigma, США) и β-эстрадиол (Sigma, США). Выбор концентраций стероидов обусловлен их средним уровнем в плазме крови, с учетом их суточных (циркадных), возрастных, половых, циклических, физиологических и ментальных стрессовых колебаний, которые могут отличаться от усредненной физиологической нормы на порядок (Кэттайл В.М., Арки Р.А., 2001; Камкин А.Г., Каменский А.А., 2004; Кишкун, А.А., 2007; Зильбернагель С., Деспопулос А., 2013). В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали реагент Т-Cell Activation/Expansion Kit human (Exp) («Miltenyi Biotec», Германия), который представляет собой анти-биотиновые MACSiBeadTM частицы с биотинилированными антителами против CD2⁺, CD3⁺, CD28⁺. Реагент Ac/Exp добавляли в пробы в количестве 5 мкл, которые содержали $0,5 \times 10^6$ анти-биотиновых MACSiBeadTM частиц. Соотношение клеток и активирующих

частиц было равным 1:2. **Варианты культивирования:** 1) интактная проба; 2) проба с добавлением CD2/CD3/CD28 -комплекса (*Exp*); 3) пробы с добавлением *Exp* и дексаметазона (10^{-7} - 10^{-5} М); 4) пробы с добавлением *Exp* и тестостерона (10^{-8} - 10^{-6} М); 5) пробы с добавлением *Exp* и β -эстрадиола (10^{-9} - 10^{-6} М). Регистрацию жизнеспособности и подсчёт числа клеток в исследуемых клеточных культурах проводили с использованием реагента «GuavaViaCount» (Millipore, США) и одноименной программы, методом проточной лазерной цитометрии на проточном цитометре «GuavaEasyCite Plus» (Millipore, США), согласно протоколу производителя. Определение поверхностных маркеров CD3, CD127, CD28, CD45RA, CD45RO на Т-клетках осуществляли методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител. Регистрацию результатов проводили на проточном цитофлуориметре MACS Quant (“Miltenyi Biotec”, Германия). Данные цитометрического анализа были проанализированы с помощью программы «KALUZA Analysis Software» (Beckman Coulter, США).

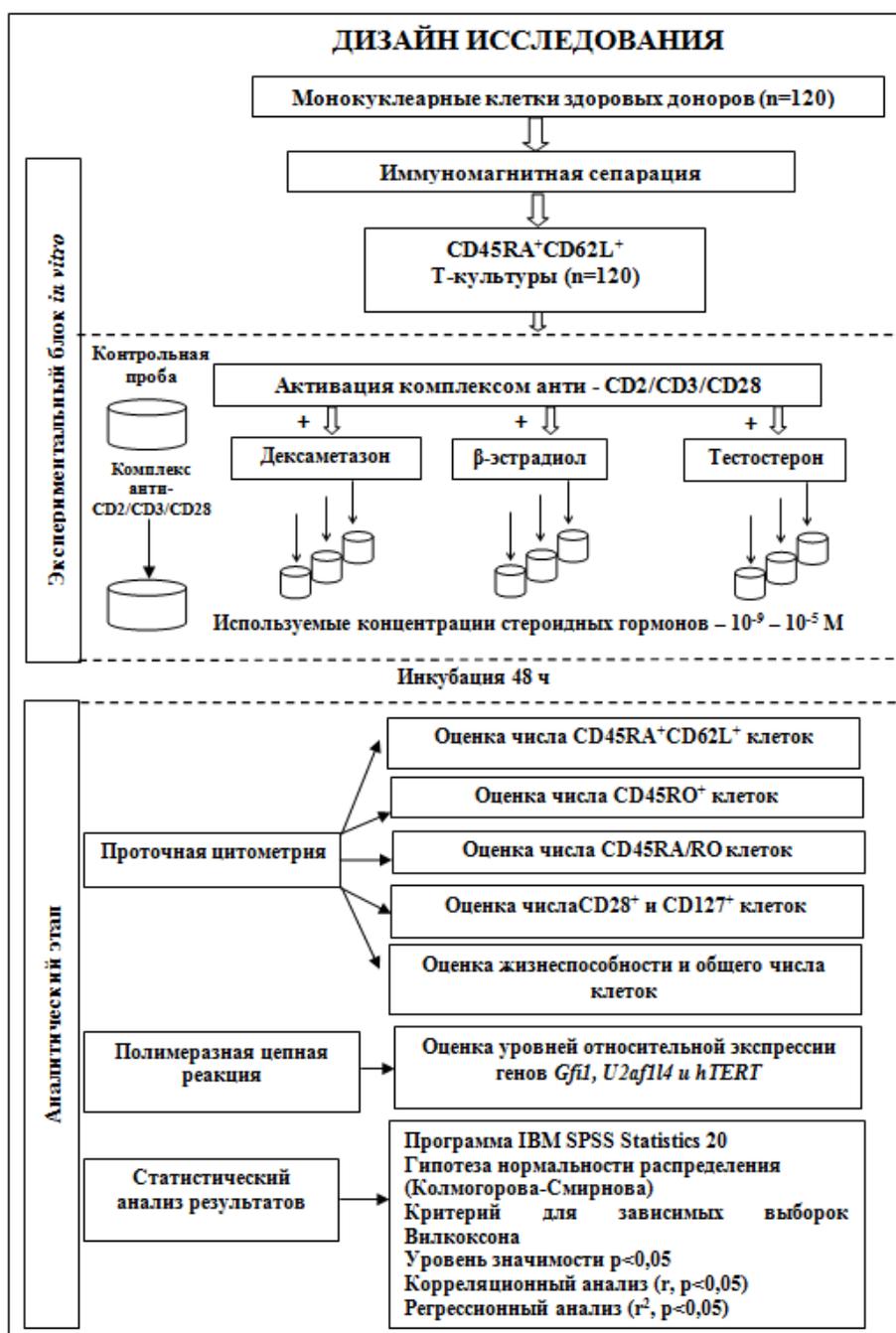


Рисунок 1 - Дизайн исследования

После инкубации клеточные культуры центрифугировали 5 мин при 2000 об/мин, удаляли надосадочную жидкость, оставляя 100 мкл, тщательно ресуспендировали клеточный осадок и выделяли тотальную РНК с использованием ExtractRNA (водный раствор фенола и гуанидин-изотиоцианата) (ExtractRNA kit «Евроген», Россия). Полученную РНК растворяли в 100 мкл воды, свободной от РНКаз и ДНКаз. Чистоту препаратов выделенной РНК определяли с помощью спектрофотометра (Nanovue Plus, GE Healthcare Bio-Sciences, Швеция). Анализировали результат отношения значений поглощения на длинах волн 260 нм и 280 нм (A260 нм/280 нм). Качество (целостность) выделенных образцов тотальной РНК определяли по индексу RIN (RNA Integrity Number). Концентрацию полученной РНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoVue Plus («GE Healthcare», США). Выделенная РНК была использована в реакции обратной транскрипции с применением реагентов MMLV Kit («Евроген», Россия). Для затравки использовали oligo(dT)23-primer в концентрации 20 мкМ. Для определения уровня относительной экспрессии гена была проведена мультиплексная RT-PCR с применением реагентов qPCRmixHS («Евроген», Россия), специфических зондов TaqMan и праймеров в концентрации 10пМ («Beagle», Россия). В качестве матрицы использовались 5 мкл кДНК, в качестве референсных генов – *GAPDH* и *B2M*. Последовательности праймеров были подобраны и предварительно проверены с помощью он-лайн программы BLAST (таблица 1).

Таблица 1 - Нуклеотидная последовательность праймеров и проб

GF11_for 5'-TGGAGCAGCACAAAGCC-3'
GF11_rev 5'-GACAGTGTGGATGACCTCTTG-3'
U2af114_for 5'-CTTCACAACAAGCCGACATTC-3'
U2af114_rev 5'-CAAGGTTGTCGCACACATTC-3'
GAPDH_for 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'
GAPDH_rev 5'-GAAGATGGTGATGGGATTC-3'
GF11_probe FAM-5'-CGCAGGAACGGAGCTTTGACTGTA-3'~BHQ-1
U2af114_probe FAM-5'-CCAGGAGGTGTTACAGAACTGCA-3'~BHQ-1
GAPDH_probe HEX-5'-CAAGCTTCCCCTTCTCAGCC-3'-BHQ-1
hTERT_for 5'-TGACACCTCACCTACCCAC-3'
hTERT_rev 5'-CACTGTCTTCCGCAAGTTCAC-3'
B2M_for 5'-AGCAAGGACTGGTCTTTCTATCT-3'
B2M_rev 5'-AAACCTCCATGATGCTGCTTAC-3'
hTERT_probe FAM-5'-ACCCTGGTCCGAGGTGTCCTGAG-3'-BHQ-1
B2M_probe 5'-FAM-ACTTTGTACAGCCCAAGATAGTTA-BHQ1 - 3'

Для каждой пары праймеров была подобрана оптимальная температура отжига с использованием градиентной ПЦР (Bio-Rad T-100, Bio-Rad C-1000, США). ПЦР-реакция была проведена в трех повторах с использованием амплификатора LightCycler 480 Real-Time PCR («Roche», Швейцария) в следующем режиме: 95°C, 5 мин; 95°C, 20 с; 60°C, 30 с; 72°C, 60 с – 45 циклов, 72°C, 5 мин.

Расчеты уровней относительной экспрессии исследуемых генов производили с помощью модифицированной формулы Пфаффа:

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

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences). Оценку полученных результатов проводили методами статистического описания и проверки статистических

гипотез (Кремер Н.Ш., 2004). При анализе имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (Колмогорова-Смирнова). Для каждой выборки вычисляли средневывборочные характеристики: для нормально распределенных выборок вычисляли среднее арифметическое (\bar{X}), ошибку среднего (m); для выборок, распределение которых отличалось от нормального: медиану (M), первый и третий квартили (Q_1, Q_3). Для оценки достоверности различий выборок, использовали параметрический (t-критерий Стьюдента) или непараметрический (Вилкоксона) для зависимых выборок. С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный и регрессионный анализы. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ (Кремер Н.Ш., 2004).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Процессы активации, пролиферации, дифференцировки и созревания участников иммунного ответа – лимфоцитов, определяют сущность ответной иммунной реакции организма на различные раздражители (Shipkova M, Wieland E., 2012; Литвинова Л.С. и соавт., 2014). Молекула CD45 структурно близка к T-клеточному рецептору и признана критическим регулятором TCR-сигнализации (Mustelin T., Tasken K., 2003; Lynch K.W., 2004; McNeill L. et al., 2007). Изоформы CD45, генерированные путем альтернативного сплайсинга экзонов отражают процесс дифференцировки T-лимфоцитов во время антигензависимой активации иммунокомпетентных клеток и обладают разными свойствами при взаимодействии с лигандом (Lynch W.K., Weiss A., 2000, Alexander D.R., 2000). В процессе регуляции альтернативного сплайсинга молекулы CD45, важная роль отведена совместным действиям вспомогательного фактора сплайсинга U2AF26 (U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1 like 4, U2af114) и фактора транскрипции Gfi1 (growth factor independent 1). Предполагают, что антагонистические взаимодействия U2AF26 и Gfi1 определяют соотношение изоформ CD45: U2AF26 способствует исключению 4 экзона, что приводит к формированию коротких изоформ - CD45RO, тогда как Gfi1 способствует образованию более активной, высокомолекулярной формы рецептора - CD45RB или RA (Heyd F. et al., 2006; Melton A.A. et al., 2007; Heyd F., Lynch W. K., 2010; Butte J.M. et al., 2012; Юрова К.А., 2015).

Активация CD45RA⁺CD62L⁺ T-лимфоцитов комплексом анти-CD2/CD3/CD28, наряду с противоположными по направленности протекающими процессами: пролиферацией и апоптозом, сопровождалась выраженным снижением экспрессии мРНК генов U2af114 (более чем в 20 раз) и Gfi1 (более чем в 6,5 раз) в сравнении с контрольными цифрами (рисунок 2). Выявленные нами изменения экспрессии мРНК генов U2af114 и Gfi1, индуцированные действием активирующих частиц, сопровождалась увеличением содержания дубль-позитивных (CD45RA/RO) и CD45RO⁺ T-лимфоцитов (в среднем, в 2 раза) T-клеток, и напротив, снижением количества CD28- и CD127-экспрессирующих клеток в первичных культурах наивных лимфоцитов (по сравнению с интактной пробой) (таблица 2). Полагают, что переход к низко-молекулярным изоформам CD45 при активации T-клеток снижает фосфатазную активность рецептора CD45 и способствует ослаблению T-клеточной сигнализации (Martinez M.N. et al., 2013): с T-лимфоцитами, несущими укороченный вариант молекулы CD45 - CD45RO, связывают более быструю и эффективную антигензависимую активацию, тогда как лимфоциты с наивным фенотипом с большей вероятностью подвергаются апоптозу при воздействии активирующих стимулов (Heyd F. et al., 2006; Melton A.A. et al., 2007; Heyd F., Lynch W.K., 2010; Butte J.M. et al., 2012).

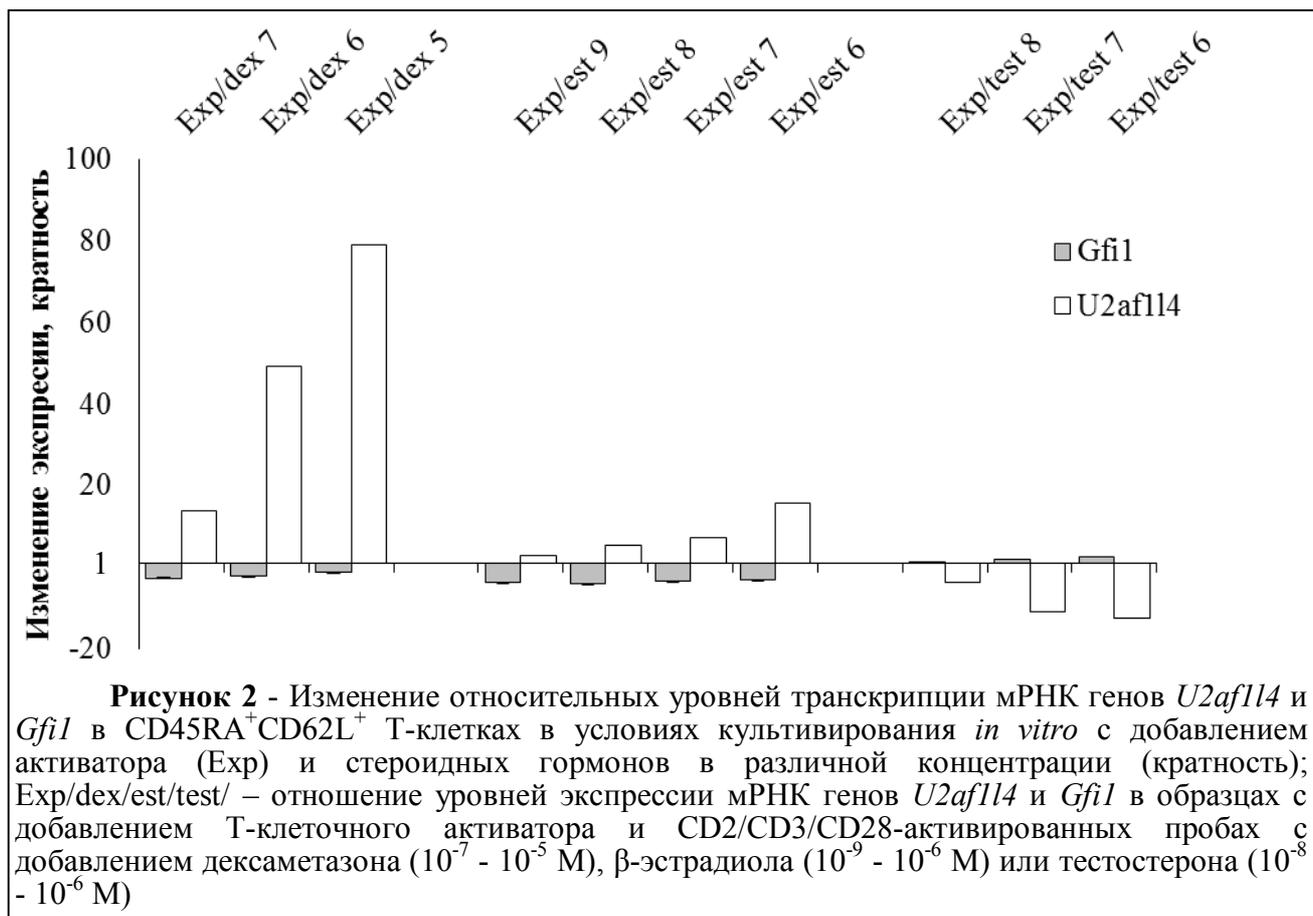
T-лимфоциты, являясь высоко-пролиферирующей популяцией, представляют особый интерес в отношении исследования теломеразной активности (Elyaman W. et al., 2008; Weng N.P., 2008; Gharagozloo M. et al., 2009; Molgora B. et al., 2013). Установлено, что активность фермента теломеразы эквивалентна уровню относительной экспрессии мРНК гена каталитической единицы фермента теломеразы

- *hTERT* (Poole J.C. et al., 2001; Matsumura-Arioka Y. et al., 2005; Королькова О.Ю. и соавт., 2007; Benko A.L. et al., 2012). Выявленное нами значительное (в 78,6 раза) возрастание уровня относительной экспрессии мРНК гена *hTERT* (относительно интактной пробы) при активации $CD45RA^+CD62L^+$ Т-клеток анти- $CD2/CD3/CD28$ -комплексом (**рисунок 3**), наряду с усилением пролиферативной реакции, явилось вполне предсказуемым и описано в современной литературе (Weng et al., 1996; Benko A.L. et al., 2012). Интересно отметить тот факт, что эффективная конверсия фенотипа наивных ($CD45RA^+CD62L^+$) Т-клеток, сопряженная с увеличением дубль-позитивных ($CD45RA/RO$) и $CD45RO$ Т-клеток и потерей поверхностных маркеров костимуляции/активации ($CD28$ и $CD127$), происходила на фоне угнетения экспрессии генов - *U2af114* и *Gfi1*, и напротив, увеличения уровней относительной экспрессии гена *hTERT*. Выявленные нами изменения экспрессии и фенотипа наивных Т-клеток, индуцированные TCR-активацией, могут свидетельствовать о дифференцировке наивных Т-лимфоцитов в клетки эффекторной ($CD45RA^+CD28^-CD62^-$; $CD45RA^-CD28^-CD62^-$) и/или центральной памяти ($CD45RA^-CD28^+CD62^+$). Данный тезис подтверждается фактами позитивной корреляции между уровнями относительной экспрессии мРНК гена *U2af114* и числом дубль-позитивных ($CD45RA/RO$) Т-клеток ($r=0,67$, $p<0,05$) и негативной - между содержанием дубль-позитивных ($CD45RA/RO$) и числом $CD28^+$ Т-лимфоцитов ($r=-0,76$, $p<0,05$). Интересно отметить, что, несмотря на разнонаправленные изменения экспрессии мРНК генов *Gfi1* и *hTERT*, нами была выявлена позитивная корреляция между ними ($r=0,62$, $p<0,05$), а также отрицательная - между уровнем относительной экспрессии мРНК гена *hTERT* и содержанием $CD28$ -негативных Т-лимфоцитов ($r=-0,58$, $p<0,05$), что может свидетельствовать об однонаправленном действии этих факторов в процессах созревания и дифференцировки наивных Т-лимфоцитов. В научной литературе факт неспецифической (антиген-независимой) активации и дифференцировки клонов Т-лимфоцитов активно обсуждается (Samargo J.F. et al., 2009; Duraisingham S.S. et al., 2009; Wieckowski E.U. et al., 2009) с позиций физиологической и иммунопатологической модуляции активности иммунного ответа.

При проведении сравнительного анализа действия стероидных гормонов (дексаметазона, тестостерона и β -эстрадиола) на функциональную активность наивных Т-клеток, полученных у условно здоровых лиц, в зависимости от гендерных критериев, достоверных различий тестируемых параметров выявлено не было. Этот факт может быть обусловлен тем, что лимфоциты женщин и мужчин, по сути, не имеют фенотипических и функциональных отличий, а репертуар их рецепторных структур определяется гормональным фоном (Phiel K.L. et al., 2005; Laffont S. et al., 2014).

Глюкокортикоиды (ГК) относят к классу стероидных гормонов и оказывают плейотропное действие на рост, дифференцировку и функциональную активность иммунокомпетентных клеток (Ashwell J.D. et al., 2000; Gruver-Yates A.L., Cidlowski J.A., 2013; Ayroldi E. et al., 2014; Cheng Q. et al., 2014). Инкубация TCR-активированных наивных Т-клеток с физиологическими концентрациями дексаметазона приводила к снижению уровня относительной экспрессии мРНК гена *Gfi1*, по сравнению с пробой только с добавлением активирующих частиц (**рисунок 3**). Супрессивный эффект глюкокортикоида прослеживался во всем диапазоне его физиологических концентраций (10^{-7} - 10^{-5} М). Противоположный эффект дексаметазон оказывал на уровень относительной экспрессии мРНК гена *U2af114* (**рисунок 2**). При этом действие гормона носило дозозависимый характер ($r^2=0,89$, $p<0,05$). Добавление дексаметазона (10^{-6} и 10^{-5} М) в первичную культуру в сочетании с активатором, приводила к достоверному росту числа дубль-позитивных ($CD45RA/RO$) и $CD45RO^+$ Т-клеток (**таблица 2**). Увеличение числа дубль-позитивных ($CD45RA/RO$) Т-клеток в пробах активированных наивных Т-клеток с дексаметазоном (10^{-6} - 10^{-5} М) имело положительную корреляцию с экспрессией гена *U2af114* ($r=0,87$ и $r=0,72$, $p<0,05$, соответственно). Инкубация TCR-активированных $CD45RA^+CD62L^+$ клеток с дексаметазоном (10^{-7} - 10^{-5} М), в целом, приводила к

снижению относительного уровня экспрессии мРНК гена *hTERT* (рисунок 3), что может быть связано со способностью дексаметазона подавлять продукцию IL-2 активированными Т-клетками (Arzt E. et al., 2000; Tang Q. et al., 2008; Creed T.J. et al., 2009; Гуцол А.А. и соавт., 2013), воздействуя на транскрипцию гена IL-2 (ингибируя транскрипционные факторы AP-1 и NF-κB, активирующие промотор гена IL-2) и на раннюю стадию каскада сигнальной трансдукции, инициированной TCR-активацией (Simon A.K. et al., 2001; Шуплецова В.В., 2015). Инкубация TCR-сенситивизированных Т-лимфоцитов с дексаметазоном (10^{-7} - 10^{-5} М) не оказывала влияния на пролиферацию наивных Т-клеток. В то же время дексаметазон (10^{-6} и 10^{-5} М) значительно снижал негативный эффект активатора, способствуя росту содержания живых Т-лимфоцитов в первичных культурах, по сравнению с пробами только с добавлением активирующих частиц (рисунок 4). Полученные нами результаты могут указывать на способность дексаметазона подавлять развитие активационного апоптоза (в нашей экспериментальной системе опосредованного действием TCR-активатора), что находит своё подтверждение в опубликованных данных (Ashwell J.D. et al., 2000; Baschant U., Tuckermann J., 2010). В частности, в экспериментах *in vivo* и *in vitro* (на мышинных моделях) показана способность дексаметазона ингибировать активационно-индуцированную гибель клеток с помощью прямой ДНК-зависимой репрессии гена CD95L (Ayroldi E. et al., 2002; Zhan Y. et al., 2004; Baumann S. et al., 2005). С другой стороны, снижение дексаметазоном негативного эффекта активатора на жизнеспособность клеток, может быть обусловлен тем, что дексаметазон обладает способностью усиливать экспрессию рецептора IL-7 (ген α-цепи этого рецептора индуцируется глюкокортикоидами), в большом количестве представленного на мембранах наивных Т-лимфоцитов (Schluns K.S., Lefrançois L., 2003; Talayev V. et al., 2005; Селедцов В.И. и соавт., 2011).



Установлено, что угнетение экспрессии IL-7Rα во время антигензависимой активации и клональной экспансии Т-лимфоцитов является важным гомеостатическим механизмом, максимизирующим доступность IL-7 для наивных

клеток (Park J.H. et al., 2004). Подтверждением вышесказанному явилось обнаружение положительной взаимосвязи между числом живых клеток и содержанием CD127-позитивных лимфоцитов при действии глюкокортикоида ($r=0,67$; $r=0,72$, $p<0,05$ для концентрации гормона 10^{-6} и 10^{-5} М, соответственно). Дексаметазон (10^{-6} - 10^{-5} М) в комбинации с активатором приводил к достоверному снижению количества $CD45RA^+CD62L^+CD28^+$ клеток по сравнению с пробами только с добавлением активирующих частиц, тогда как экспрессия молекулы активации CD127 – значимо не изменялась (таблица 2, рисунок 4).

Нами были обнаружены отрицательные связи между уровнем экспрессии мРНК генов *hTERT* и *Gfi1* и количеством CD28-негативных клеток ($r=-0,71$; $r=-0,61$, $p<0,05$, соответственно), и напротив, позитивная, между уровнем экспрессии мРНК *hTERT* и содержанием CD127-позитивных клеток при действии 10^{-5} М дексаметазона. Так же, как и в случае действия только активатора, в культурах наивных TCR-активированных клеток с добавлением дексаметазона, нами была обнаружена позитивная взаимосвязь между экспрессией гена *hTERT* и *Gfi1* ($r=0,70$, $p<0,05$), а также отрицательная, между экспрессией гена *hTERT* и числом $CD45RO^+$ Т-клеток ($r=-0,72$, $p<0,05$), что может свидетельствовать об однонаправленном действии генов *hTERT* и *Gfi1* в процессах дифференцировки и созревания наивных Т-клеток.

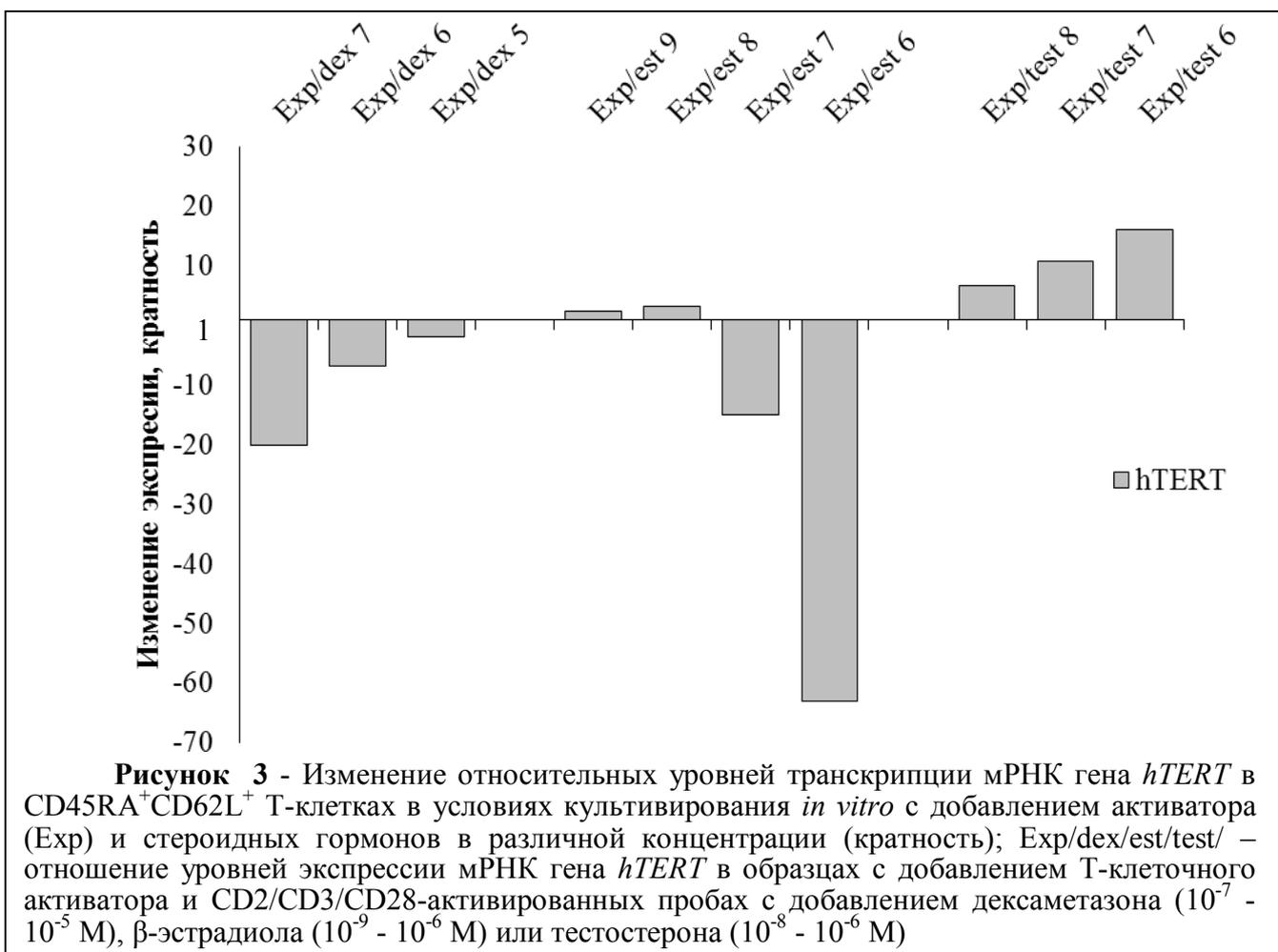


Рисунок 3 - Изменение относительных уровней транскрипции мРНК гена *hTERT* в $CD45RA^+CD62L^+$ Т-клетках в условиях культивирования *in vitro* с добавлением активатора (Exp) и стероидных гормонов в различной концентрации (кратность); Exp/dex/est/test/ – отношение уровней экспрессии мРНК гена *hTERT* в образцах с добавлением Т-клеточного активатора и CD2/CD3/CD28-активированных пробах с добавлением дексаметазона (10^{-7} - 10^{-5} М), β -эстрадиола (10^{-9} - 10^{-6} М) или тестостерона (10^{-8} - 10^{-6} М)

Таким образом, на фоне TCR-активации, дексаметазон, увеличивая уровень экспрессии мРНК гена *U2af114*, и, напротив, снижая экспрессию генов *Gfi1* и *hTERT*, способствует росту числа переходных форм Т-лимфоцитов ($CD45RA/RO$) и $CD45RO$ Т-клеток и, напротив, снижению содержания $CD45RA^+CD62L^+CD28^+$ Т-клеток, поддерживая при этом численное постоянство Т-клеток, экспрессирующих *IL-7Ra* ($CD127^+$). Выявленные нами изменения могут свидетельствовать о глюкокортикоид-

опосредованной дифференцировке и созревании наивных ($CD45RA^+CD62L^+$) T-лимфоцитов, на фоне TCR-активации (рисунок 4).

Таблица 2 - Содержание $CD127^+$, $CD28^+$, дубль-позитивных ($CD45RA/RO$) и $CD45RO^+$ T-клеток (%), характеризующих конверсию фенотипа, в культурах $CD45RA^+CD62L^+$ T-лимфоцитов, инкубируемых с T-клеточным активатором (Exp) и разными концентрациями гормонов: дексаметазоном (Dex), тестостероном (Test) и β -эстрадиолом (Est), Me ($Q1 - Q3$)

Варианты культивирования	$CD45RA^+CD62L^+$			Число $CD45RO^+$ клеток (%)
	Число $CD127^+$ клеток (%)	Число $CD28^+$ клеток (%)	Число $CD45RA/RO$ клеток (%)	
Интактная проба	92,50 (88,40 - 97,90)	96,00 (89,30 - 98,00)	8,90 (5,67 - 9,80)	10,5 (6,18 - 12,31)
Exp	75,41 (72,20 - 81,40) $p_0 < 0,05$	74,20 (69,23 - 77,20) $p_0 < 0,05$	21,45 (19,90 - 25,74) $p_0 < 0,05$	24,62 (21,0 - 27,81) $p_0 < 0,05$
Exp + Dex (10^{-5} M)	78,81 (75,64 - 80,44)	51,34 (49,10 - 59,30) $p_1 < 0,05$	49,00 (48,00 - 54,33) $p_1 < 0,05$	55,02 (51,21 - 61,38) $p_1 < 0,05$
Exp + Dex (10^{-6} M)	81,15 (69,22 - 85,27)	65,22 (60,32 - 69,30) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	38,29 (33,14 - 43,23) $p_1 < 0,05$	44,38 (39,14 - 48,18) $p_1 < 0,05$
Exp + Dex (10^{-7} M)	77,83 (70,45 - 79,16)	74,80 (68,78 - 76,54) $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	25,34 (21,22 - 29,54) $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	26,19 (23,14 - 31,11) $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
Exp + Test (10^{-6} M)	72,55 (68,42 - 79,81)	71,30 (68,40 - 75,43)	15,30 (12,49 - 17,32) $p_1 < 0,05$	18,21 (15,32 - 19,21) $p_1 < 0,05$
Exp + Test (10^{-7} M)	78,51 (72,35 - 79,95)	74,30 (72,11 - 77,40)	13,30 (10,45 - 18,20) $p_1 < 0,05$	15,32 (11,15 - 19,30) $p_1 < 0,05$
Exp + Test (10^{-8} M)	73,82 (69,90 - 78,54)	70,50 (68,30 - 74,30)	21,37 (18,40 - 23,40) $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	25,18 (20,31 - 26,18) $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
Exp + Est (10^{-6} M)	55,78 (43,78 - 59,21) $p_1 < 0,05$	51,45 (45,38 - 52,34) $p_1 < 0,05$	49,30 (48,30 - 52,45) $p_1 < 0,05$	55,28 (51,45 - 58,93) $p_1 < 0,05$
Exp + Est (10^{-7} M)	64,22 (60,35 - 67,30) $p_1 < 0,05$	66,23 (59,20 - 68,32) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	42,30 (34,30 - 44,23) $p_1 < 0,05$	46,328 (39,40 - 54,71) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
Exp + Est (10^{-8} M)	70,35 (68,32 - 73,85) $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	69,32 (62,40 - 70,34) $p_2 < 0,05$	21,38 (19,00 - 23,10) $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	24,34 (21,02 - 26,15) $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
Exp + Est (10^{-9} M)	72,81 (69,55 - 78,81) $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	70,32 (68,43 - 74,00) $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	21,50 (21,29 - 26,30) $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	25,09 (22,18 - 29,03) $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$

Примечания:

p_0 - достоверность различий по сравнению с интактной пробой

p_1 - достоверность различий по сравнению с пробой с добавлением активатора (Exp)

p_2 - достоверность различий по сравнению с пробой с добавлением Exp + Dex (10^{-5} M)/Exp + Est (10^{-6} M) или Exp+Test (10^{-6} M)

p_3 - достоверность различий по сравнению с пробой с добавлением Exp + Dex (10^{-6} M)/ Ac/Exp + Est (10^{-7} M) или Exp + Test (10^{-7} M)

p_4 - достоверность различий по сравнению с пробой с добавлением Exp + Est (10^{-8} M)

Половые гормоны, наряду с глюкокортикостероидами, являются одними из ключевых дирижеров иммунных реакций, влияя на способность зрелых эффекторных клеток к реализации иммунного ответа (Селедцов и соавт., 2010; Litvinova L.S et al., 2013; Giefing-Kröll C. et al., 2015). Для человеческой популяции и разных видов животных характерен иммунологический половой диморфизм, который является результатом взаимодействия нейроэндокринной и иммунной систем (Lai J.J. et al., 2012; Peterson M.P. et al., 2013; Zhao S. et al., 2014; Furman D., 2015). Женские половые гормоны - эстрогены, участвуют в регуляции процессов созревания, дифференциации, активации и пролиферации лимфоидных клеток (McMurray R.W. et al., 2001; Priyanka N.P. et al., 2013). Установлена четкая взаимосвязь функциональной активности иммунной системы женщин от их менструального цикла: клеточные иммунные реакции имеют значительные отличия в фолликулярную и лютеиновую фазы менструального цикла, в пред- и постменопаузе (Priyanka N.P. et al, 2013). Диапазон физиологических концентраций эстрогенов включает разброс от 10^{-9} до 10^{-6} М (Кэттайл В.М., Арки Р.А., 2001; Камкин А.Г., Каменский А.А., 2004; Кишкун, А.А., 2007; Зильбернагель С., Деспопулос А., 2013). Дозы 10^{-7} - 10^{-6} М соответствуют концентрациям β -эстрадиола в последнем (III) триместре беременности, тогда как 10^{-9} - 10^{-8} М - определенным фазам менструального цикла (лютеиновая и фолликулярная) (Кэттайл В.М., Арки Р.А., 2001; Камкин А.Г., Каменский А.А., 2004; Кишкун, А.А., 2007; Зильбернагель С., Деспопулос А., 2013).

Культивирование CD2/CD3/CD28(TCR)-активированных наивных ($CD45RA^+CD62L^+$) Т-клеток в присутствии β -эстрадиола (10^{-9} - 10^{-6} М) сопровождалось дозозависимым увеличением уровня относительной экспрессии мРНК гена *U2af114* ($r^2=0,81$, $p\leq 0,05$) в сравнении с показателями, полученными в клеточных культурах, инкубируемых только с активирующими частицами (**рисунок 2**). Эффекты женского полового гормона на экспрессию гена *Gfi1* носили *равномерный супрессивный характер, независимо от действующей концентрации гормона, что может быть связано с временным фактором культивирования* (Heud F. et al., 2006; Litvinova L.S. et al., 2013; Юрова К.А., 2015). β -эстрадиол-опосредованное (10^{-7} - 10^{-6} М) повышение уровней экспрессии мРНК гена *U2af114* в TCR-активированных культурах наивных Т-клеток было ассоциировано с достоверным увеличением числа дубль-позитивных ($CD45RA/RO$) и $CD45RO^+$ Т-клеток по сравнению с пробами только с добавлением активатора ($r=0,67$, $r=0,75$, для концентраций гормона - 10^{-7} - 10^{-6} М, $p<0,05$ во всех случаях, соответственно) (**таблица 2, рисунок 2**).

Следует отметить, что сочетанное добавление активатора и 10^{-6} М β -эстрадиола в культуры $CD45RA^+CD62L^+$ Т-лимфоцитов сопровождалось резким снижением числа живых лимфоцитов (до 30,75 (28,34 - 34,24) %), на фоне усиления пролиферативной реакции Т-клеток (**рисунок 4**). Вышеописанные изменения морфофункциональной реакции наивных Т-клеток на добавление женского полового гормона сопровождалось резким снижением числа Т-клеток, экспрессирующих молекулы активации и костимуляции - $CD45RA^+CD62L^+CD127^+$ и $CD45RA^+CD62L^+CD28^+$ в культурах TCR-активированных наивных Т-лимфоцитах, по сравнению с пробами только с добавлением активирующих частиц (**таблица 2**). Мы предполагаем, что выявленное нами изменения экспрессионного профиля и фенотипических детерминант Т-клеток, опосредованные действием β -эстрадиола (10^{-7} - 10^{-6} М), сопровождающееся снижением числа $CD45RA^+CD62L^+CD28^+$ и $CD45RA^+CD62L^+CD127^+$ Т-клеток в первичных культурах наивных Т-клеток, ассоциированное с конверсией их фенотипа (увеличением переходных изоформ $CD45RA/RO$ Т-клеток и $CD45RO$ лимфоцитов) может свидетельствовать о

созревании и дифференцировке наивных Т-клеток под действием высоких концентраций женского полового гормона (**рисунок 4**). Данный тезис подтверждается фактами позитивной корреляции между уровнями относительной экспрессии мРНК гена *U2af114* и числом дубль-позитивных (*CD45RA/RO*) Т-клеток ($r=0,605$, $r=0,620$, $p<0,05$ во всех случаях при действии β -эстрадиола - 10^{-7} - 10^{-6} М, соответственно) и отрицательной между уровнем экспрессии мРНК гена *U2af114* и содержанием *CD28⁺* Т-клеток ($r=-0,650$, $p<0,05$ при действии 10^{-6} М β -эстрадиола). Кроме того, нами обнаружены отрицательные корреляции между уровнем экспрессии мРНК гена *Gfi1* и числом *CD45RO⁺* Т-клеток ($r=-0,56$, $p<0,05$ при действии β -эстрадиола - 10^{-6} М). Возможно, снижение клеток, экспрессирующих молекулы активации и костимуляции (*CD127⁺* и *CD28⁺*), наряду с дифференцировкой, может быть обусловлено повышенной гибелью наивных Т-лимфоцитов, индуцируемой сочетанием активатора и высокими концентрациями женского полового гормона, что подтверждается наличием положительных связей между содержанием мертвых клеток и числом *CD28*-негативных лимфоцитов ($r=0,76$, $r=0,67$ для 10^{-6} М β -эстрадиола, $p<0,05$ во всех случаях, соответственно). В литературе описано, что при гибели клеток происходит слушивание/потеря рецепторных структур (Кудрявцев И.В., 2014).

Тогда как действие женского гормона в дозах, соответствующих фазам нормального менструального цикла (10^{-9} - 10^{-8} М), было противоположным: инкубация ТCR-активированных *CD45RA⁺CD62L⁺* Т-клеток с β -эстрадиолом приводила к достоверному росту числа живых клеток, снижая негативный эффект активатора, не влияя на общую численность Т-клеток в первичных культурах и содержание *CD127⁺* и *CD28⁺* - экспрессирующих Т-клеток по сравнению с пробами только при добавлении активатора. Используемые концентрации β -эстрадиола, входящие в диапазон физиологических (10^{-9} - 10^{-8} М), не оказывали значимого влияния на конверсию фенотипа наивных клеток. Число дубль-позитивных (*CD45RA/RO*) и *CD45RO⁺* Т-клеток было сопоставимо с их содержанием при действии только активатора (**таблица 2**).

Дозы женского полового гормона β -эстрадиола (10^{-7} - 10^{-6} М), соответствующие III триместру беременности, оказывали *выраженное супрессивное действие* на транскрипцию мРНК гена *hTERT* в ТCR-активированных *CD45RA⁺CD62L⁺* Т-клетках, по сравнению с пробами только в присутствии клеточного активатора (**рисунок 3**). Наиболее выраженный эффект β -эстрадиол оказывал в своей концентрации - 10^{-6} М, снижая уровень экспрессии исследуемого гена почти в 63 раза в сравнении с контрольными цифрами. Следует еще раз отметить, что на фоне резкой β -эстрадиол-опосредованной супрессии транскрипции мРНК гена *hTERT*, регистрировалось одновременное усиление пролиферативной реакции и апоптотической гибели в культуре *CD45RA⁺CD62L⁺* Т-клеток, в частности, при действии гормона в концентрации 10^{-6} М. Возможно, ингибирующий эффект высоких концентраций β -эстрадиола на экспрессию гена *hTERT*, ассоциирован с его супрессивным влиянием на этап ранней активации наивных Т-клеток, сопряжённый с системой IL-2/IL-2R α (Шуплецова В.В., 2015). Инкубация ТCR-активированных *CD45RA⁺CD62L⁺* Т-лимфоцитов с β -эстрадиолом в 10^{-9} и 10^{-8} М концентрациях, напротив, приводила к повышению уровня относительной экспрессии мРНК гена *hTERT* (в среднем, в 2,5 раза) и сочеталось с увеличением числа живых лимфоцитов, по сравнению с пробами только с добавлением активатора ($p<0,05$) (**рисунки 3, 4**). Установлено, что эстрогены (воздействуют на процесс развития Т-клеток, изменяя активность теломеразы в ответ на ТCR-сигнализацию, в то время как зрелые периферические Т-клетки не реагируют на гормон изменениями в экспрессии или функциональной активности теломеразы (Benko A.L. et al., 2012). В то же время, другие исследователи установили, что эстрадиол, пассивно диффундируя в клетки, связывается с α -изоформой рецептора эстрогена (ER α). Последняя действует в качестве активатора транскрипции, путем связывания с чувствительными элементами эстрогена в геномной ДНК (Misiti S. et al., 2000; Xu D. et al., 2014).

Авторы предполагают, что половые стероиды - эстрогены и андрогены, таким образом, увеличивают экспрессию *hTERT*, и в конечном итоге приводят к увеличению активности теломеразы в клетках (Calado R.T. et al., 2009).

Следует остановиться на обнаруженных нами ряде закономерностей, свидетельствующих о косвенном участии *hTERT* в дифференцировке наивных Т-клеток. Так, нами была выявлена позитивная взаимосвязь между экспрессией генов *hTERT* и *Gfi1* при действии β -эстрадиола (10^{-7} - 10^{-6} М) ($r=0,70$, $r=0,65$, $p<0,05$ во всех случаях, соответственно), а также негативная, между экспрессией гена *hTERT* и числом CD45RO⁺ Т-клеток при действии 10^{-6} М β -эстрадиола ($r=0,52$, $p<0,05$), что может свидетельствовать об однонаправленном действии генов *hTERT* и *Gfi1* в процессах дифференцировки и созревания наивных Т-клеток. Кроме того, нами обнаружены отрицательные связи между уровнем экспрессии мРНК генов *hTERT* и *Gfi1* с количеством CD28-негативных клеток ($r=-0,62$; $r=-0,71$, $p<0,05$ во всех случаях, соответственно) при действии гормона в максимально допустимой физиологической концентрации (10^{-6} М). На наш взгляд, выявленные нами противоположные изменения экспрессионного и фенотипического профилей наивных Т-клеток при действии β -эстрадиола могут быть связаны с дозовой зависимостью влияния эстрогенов на компоненты иммунной системы, в целом (Grossman C.J. et al., 1991; Cunningham M, Gilkeson G., 2011). Установлено, что высокие концентрации эстрогенов блокируют генерацию Т-клеток в тимусе, а также оказывают избирательное действие на разные субпопуляции Т-лимфоцитов: супрессируют развитие и функции цитотоксических Т-клеток, и напротив, опосредуют активацию Т-хелперов (Grossman C.J. et al, 1994). Тогда как низкие дозы эстрогенов, обеспечивают так называемое иммуномодулирующее действие, т.е. способствуют восстановлению иммунных нарушений, развивающихся на фоне дефицита эстрогенов (Sallusto F. et al., 2004; Fedor M.E., Rubinstein A. 2006; Литвинова Л.С. и соавт., 2011; Litvinova L.S. et al., 2013; Шуплецова В.В., 2015). Становится очевидным, что такая неоднозначность действия эстрогенов (в одних случаях - стимуляция клеточного роста, в других – активация клеточной гибели) связана, в том числе, с передачей сигнала внутрь клетки (Razandi M. et al., 2002; Берштейн Л., 2003; Mann M. et al., 2011).

Таким образом, эффекты женского полового гормона - β -эстрадиола, оказываемые на параметры TCR-активированных CD45RA⁺CD62L⁺ Т-клеток, определяющие процессы их активации, пролиферации, дифференцировки и гибели, имели четкую зависимость от концентрации гормона. Можно сделать предположение, что физиологический смысл выявленных нами изменений в уровнях экспрессии генов и конверсия фенотипических характеристик активированных наивных Т-клеток, индуцированные дозами β -эстрадиола (10^{-7} - 10^{-6} М), сопровождающиеся высокой гибелью CD45RA⁺CD62L⁺ Т-клеток и одновременно, их дифференцировкой, по сути, в суррогатные Т-клетки памяти, имеет компенсаторный механизм, который предполагает создание иммуносупрессии в этот период, за счет образования поликлональных Т-клеток памяти, подразумевая ограничение агрессивной иммунной реакции при вынашивании плода. В то же время, рассматриваются механизмы передачи клеточного субстрата от матери к плоду (Priyanka H.P. et al., 2013), как запуск и своеобразная тренировка иммунной системы плода. Тогда как дозы эстрогенов (10^{-9} - 10^{-8} М), соответствующие определенным фазам нормального менструального цикла (лютеиновой и фолликулярной), напротив, оказывают протективное влияние на пул зрелых наивных клеток периферических крови, увеличивая их жизнеспособность и поддерживая экспрессию высокомолекулярных изоформ CD45 - CD45RA, имеющих высокую фосфатазную активность и поддерживающих Т-клеточный рецептор в премированном состоянии для распознавания антигена, препятствуя их поликлональной дифференцировке в Т-клетки памяти и сохраняя их высокий репликативный потенциал.

Андрогены – гормоны, ориентированные, в большей степени, на анаболические реакции организма (Hartgens F., Kuipers H., 2004; Geyer H. et al., 2014; Mhillaj E. et al.,

2015; Piacentino D. et al., 2015; Nieschlag E., Vorona E., 2015). Участие андрогенов и их рецепторов (AR) в регуляции развития и функционирования иммунной системы на сегодняшний день является доказанным, поскольку экспрессия андрогеновых рецепторов, помимо клеток гормон-зависимых органов и тканей, обнаружена в различных иммунных клетках, включая нейтрофилы, тучные клетки, макрофаги, Т- и В- лимфоциты (Heinlein C.A., Chang C., 2002; Lai J.J. et al., 2012; Foradori C.D. et al., 2008; Chang C. et al., 2013; Giefing-Kröll C. et al., 2015; Furman D., 2015).

Диапазон концентраций тестостерона (Sigma, USA), используемых в нашем in vitro эксперименте, составил 10^{-8} – 10^{-6} М и соответствует физиологическому, с учетом возрастных критериев. Так, дозы 10^{-6} М тестостерона сопоставимы с концентрациями мужского полового гормона в пубертатный период (гормональный всплеск); дозы 10^{-8} – 10^{-7} М – идентифицируются у половозрелых особей мужского пола (Вильям М.К., Рональд А.А. 2001; Зильбернагель С., Деспопулос А., 2013).

Влияние тестостерона на экспрессию мРНК генов *Gfi1* и *U2af114* в культурах активированных $CD45RA^+CD62L^+$ Т-лимфоцитов, носило разнонаправленный характер. В целом, тестостерон оказывал негативный эффект на экспрессию гена *U2af114*, и напротив, стимулирующий, на уровень транскрипции мРНК гена *Gfi1* (**рисунок 2**). Концентрации гормона, соответствующие верхним пределам физиологического диапазона (10^{-7} - 10^{-6} М), обладали наиболее выраженным влиянием на изучаемые показатели, повышая уровень транскрипции мРНК гена *Gfi1* (в среднем, в два раза) и снижая экспрессию мРНК гена *U2af114* (больше, чем в десять раз) (**рисунок 2**). Параллельно с выявленными нами изменениями уровней экспрессии исследуемых генов, действие тестостерона (10^{-7} - 10^{-6} М) сопровождалось достоверным снижением числа дубль-позитивных $CD45RA/RO$ и $CD45RO^+$ Т-лимфоцитов в сравнении с пробами только с добавлением Т-клеточного активатора (**таблица 2**). В отношении числа клеток, экспрессирующих молекулы костимуляции ($CD28$) и активации ($CD127$), регистрировалось их увеличение, однако эти изменения носили недостоверный характер. Эффекты более низких концентраций тестостерона (10^{-8} М) на активированные наивные Т-клетки были сопоставимы с действием на культуру наивных Т-клеток только $CD2/CD3/CD28$ -активатора (**таблица 2**).

Полученные нами результаты лишь частично согласуются с данными мировой научной периодики. В основном, преобладает точка зрения, что андрогены обладают способностью к умеренному подавлению функций иммунной системы (Heinlein C.A., Chang C., 2002; Foradori C.D. et al., 2008; Chang C. et al., 2013). Литература предоставляет сведения, касающиеся разнонаправленного действия мужских половых гормонов на активацию программированной гибели клеток-мишеней в зависимости от типа и стадии их дифференцировки (Татарчук Т.Ф., Сокольский Я.П., 2003; Hince M. et al., 2008; Литвинова Л.С. и соавт., 2011; Litvinova L.S. et al., 2013; Шуплецова В.В., 2015). Ранее, Шуплецовой В.В. и соавт. (2015) было установлено, что тестостерон в широком диапазоне действующих концентраций снижал число живых клеток в культурах ТCR-активированных Т-клеток памяти, но не наивных Т-лимфоцитов (Шуплецова В.В. и соавт., 2015). Кроме того, в отношении иммунокомпетентных клеток установлено антипролиферативное действие андрогенов (Roden A.C. et al., 2004; Lai J.J. et al., 2012). Предполагают, что один из механизмов его действия связан с ингибцией IL-2 – IL-2R системы на уровне транскрипции, за счет подавления экспрессии фактора NF- κ B (Roden A.C. et al., 2004; Литвинова Л.С. и соавт., 2011; Lai J.J. et al., 2012; Litvinova L.S. et al., 2013; Li S. et al., 2013; Шуплецова В.В., 2015). Касаясь тематики стероидной регуляции иммунных реакций, следует упомянуть интересный факт, указывающий на взаимосвязь между структурной и функциональной атрофией тимуса, связанной, в частности, с уменьшением количества наивных клеток в крови и секрецией половых гормонов (Hince M. et al., 2008).

В нашем эксперименте тестостерон в использованных физиологических концентрациях (10^{-8} - 10^{-6} М) не влиял существенно на такие клеточные характеристики, как жизнеспособность и общее количество (в мл) $CD45RA^+CD62L^+$

Т-клеток (**рисунок 4**). Следует отметить, что добавление тестостерона в культуры активированных CD45RA⁺CD62L⁺ Т-клеток сопровождалось дозозависимым повышением экспрессии мРНК гена *hTERT* ($r^2=0,89$, $p<0,05$) (**рисунок 3**). Самый высокий уровень экспрессии каталитической субъединицы фермента теломеразы регистрировался при добавлении 10^{-6} М гормона (**рисунок 3**). *In vivo*, андрогены под действием ароматазы способны превращаться в эстрогены (Calado R.T. et al., 2009; Xu D. et al., 2014). Далее, имеет место ранее описанный механизм, аналогичный для эстрогенов (Misiti S. et al., 2000; Calado R.T. et al., 2009; Xu D. et al., 2014).

Следует отметить однонаправленность изменений уровней экспрессии гена *hTERT* с *Gfi1* ($r=0,81$, $r=0,67$, при действии 10^{-7} и 10^{-6} М тестостерона $p<0,05$ во всех случаях, соответственно) и разнонаправленность с экспрессией гена *U2af114* ($r=-0,68$, $r=-0,61$, при действии 10^{-7} и 10^{-6} М тестостерона $p<0,05$ во всех случаях, соответственно). Кроме того, нами выявлен ряд закономерностей между исследуемыми параметрами: отрицательная взаимосвязь между уровнем относительной экспрессии генов *hTERT* и *Gfi1* с числом CD45RO⁺ Т-клеток при действии 10^{-6} М тестостерона ($r=0,67$, $r=0,71$, $p<0,05$, соответственно) и между уровнем относительной транскрипции гена *Gfi1* и содержанием дубль-позитивных (CD45RA/RO) Т-клеток при действии 10^{-7} М тестостерона ($r=0,78$, $p<0,05$). Вполне закономерным явилось обнаружение позитивной взаимосвязи между уровнем относительной экспрессии мРНК гена *hTERT* и содержанием CD28⁺ CD127⁺ - экспрессирующих Т-клеток при действии 10^{-7} - 10^{-6} М тестостерона ($r=0,65$, $r=0,58$ при действии 10^{-7} М тестостерона; $r=0,72$, $r=0,64$ при действии 10^{-6} М тестостерона, $p<0,05$ во всех случаях, соответственно), а также между уровнем относительной экспрессии мРНК гена *Gfi1* и числом CD28⁺ Т-клеток при действии 10^{-6} М гормона ($r=0,68$, $p<0,05$). Таким образом, выявленные нами изменения свидетельствуют о том, что тестостерон, во всем спектре физиологических концентраций (10^{-8} - 10^{-6} М), предотвращает дифференцировку и созревание зрелых наивных Т-клеток периферической крови в Т-клетки памяти. Его эффекты на дифференцировку ТCR-активированных наивных Т-клеток опосредованы влиянием на активность генов: угнетающим на уровень экспрессии мРНК гена *U2af114* и стимулирующим на экспрессию генов *hTERT* и *Gfi1*. Выявленные изменения в экспрессии исследуемых генов фенотипически проявляются достоверным снижением числа дубль-позитивных и CD45RO⁺ Т-клеток, при неизменном содержании Т-лимфоцитов, экспрессирующих молекулы костимуляции/активации (CD28 и CD127).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поводя итог вышесказанному, можно выделить ряд закономерностей, касающихся выявления роли стероидных гормонов в модулировании молекулярно-генетических и иммуноморфологических процессов, определяющих дифференцировку и созревание наивных Т-клеток в условиях CD2/CD3/CD28 – стимуляции. Выявлено, что индуцированные стероидными гормонами процессы дифференцировки и созревания наивных (CD45RA⁺CD62L⁺) Т-клеток осуществляются за счет изменения активности генов - *U2af114*, *Gfi1* и *hTERT*, что проявляется конверсией фенотипических характеристик наивных клеток; в частности, регистрируется рост содержания дубль-позитивных (CD45RA/RO) и CD45RO⁺ Т-клеток, при снижении числа Т-лимфоцитов, экспрессирующих молекулы костимуляции и активации (CD28 и CD127) (**рисунок 4**). Продемонстрирована однонаправленность изменений в отношении активности генов *Gfi1* и *hTERT*, и напротив, разнонаправленная динамика - *U2af114* и *hTERT*, в наивных (CD45RA⁺CD62L⁺) Т-клетках (**рисунок 4**).

Полученные нами результаты, безусловно, нуждаются в дальнейшем анализе. На наш взгляд, исследование механизмов молекулярно-генетического контроля, обеспечивающих процессы гомеостаза Т-клеток в ответ на воздействие антигенной и не антигенной природы, может иметь актуальность при создании общей модели дифференцировки и самоподдержания иммунокомпетентных клеток.

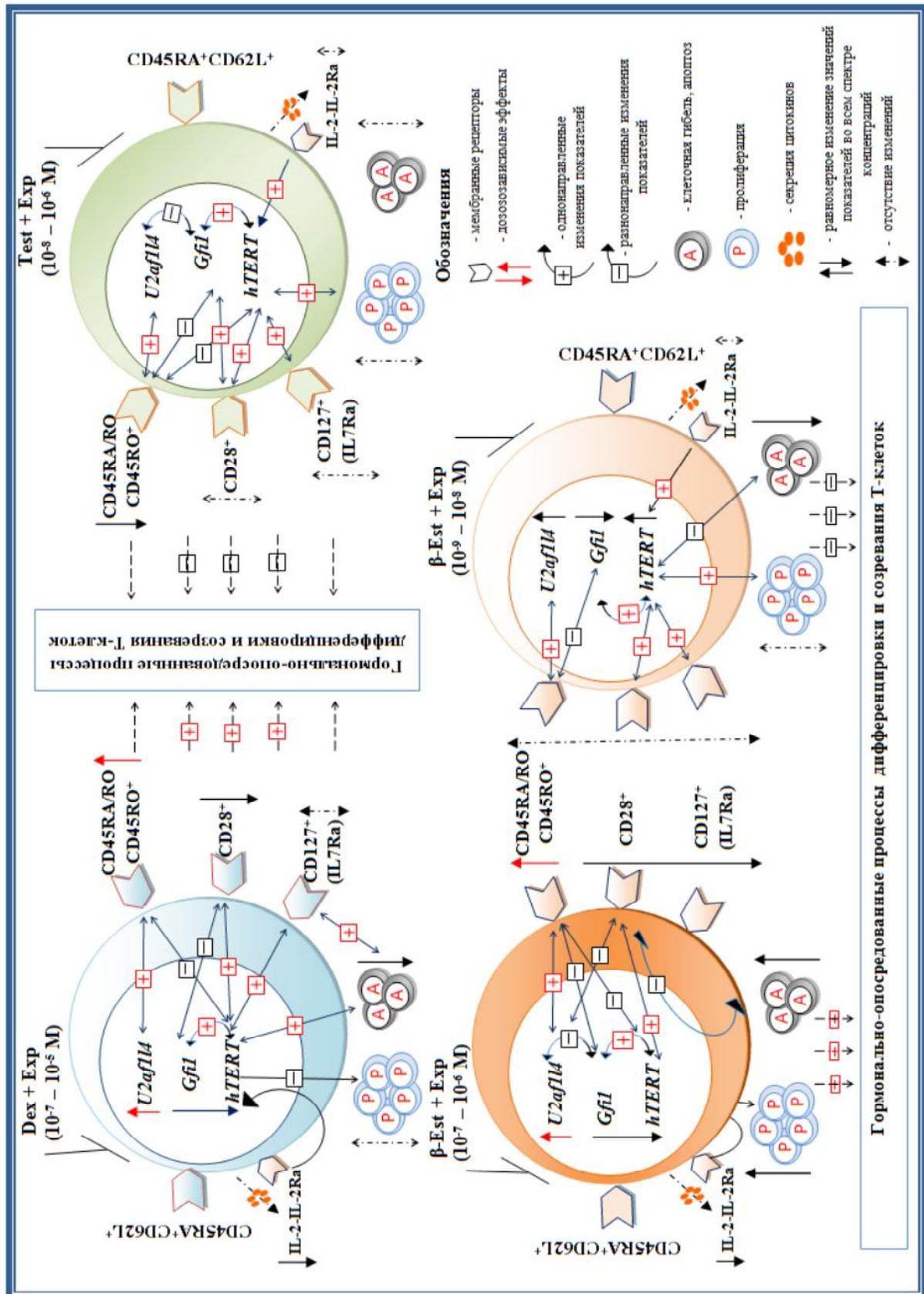


Рисунок 4 - Влияние стероидных гормонов на активацию, дифференцировку и созревание наивных Т-клеток (по результатам собственных исследований и данных литературы). В заключительной схеме приведены изменения фенотипического и экспрессионного профиля CD2/CD3/CD28-активированных наивных Т-клеток, опосредованные гормонами, по сравнению с аналогичными значениями, полученными в культурах только с добавлением активатора

В целом, выявление тонких молекулярно-клеточных механизмов влияния стероидных гормонов на гомеостаз Т-клеток позволит расширить представления о регулирующих механизмах адаптивного иммунитета на разных этапах его реализации.

ВЫВОДЫ

1. Разнонаправленное действие стероидных гормонов на процессы дифференцировки и созревания CD2/CD3/CD28-индуцированных наивных (CD45RA⁺CD62L⁺) Т-клеток, ассоциированные с механизмом альтернативного сплайсинга гена *Ptprc*, реализуется через изменение активности генов *U2af114*, *Gfi1* и *hTERT*, сопровождается конверсией клеточного иммунофенотипа наивных Т-лимфоцитов.

2. На фоне CD2/CD3/CD28-активации, действие физиологических концентраций (10^{-7} – 10^{-5} М) глюкокортикоида дексаметазона на дифференцировку наивных (CD45RA⁺CD62L⁺) Т-клеток *in vitro* ассоциировано с увеличением уровней относительной экспрессии мРНК гена *U2af114*, и, напротив, с угнетением транскрипции мРНК генов *Gfi1* и *hTERT*, сопровождается ростом дубль-позитивных (CD45RA/RO) и CD45RO⁺ Т-клеток на фоне снижения содержания CD45RA⁺CD62L⁺CD28⁺ Т-лимфоцитов.

3. Женский половой гормон β-эстрадиол в физиологических концентрациях 10^{-7} – 10^{-6} М увеличивает уровень экспрессии мРНК гена *U2af114* и, напротив, снижает экспрессию генов *Gfi1* и *hTERT*, что способствует росту числа переходных форм Т-лимфоцитов (CD45RA/RO) и CD45RO⁺ Т-клеток на фоне уменьшения содержания CD45RA⁺CD62L⁺CD28⁺ и CD45RA⁺CD62L⁺CD127⁺ Т-клеток. Выявленные изменения свидетельствуют о процессах гормонально-опосредованной дифференцировки CD2/CD3/CD28-активированных наивных (CD45RA⁺CD62L⁺) Т-лимфоцитов.

4. На фоне активации *in vitro* физиологические концентрации β-эстрадиола (10^{-9} – 10^{-8} М), ограничивают дифференцировку наивных Т-клеток за счет угнетения экспрессии гена *U2af114* (на фоне активации *Gfi1* и *hTERT*), поддерживают экспрессию изоформы рецептора CD45 - CD45RA с высокой фосфатазной активностью и молекул костимуляции и активации Т-клеток (CD28; CD127).

5. Эффекты мужского полового гормона тестостерона, используемого *in vitro* в диапазоне физиологических концентраций (10^{-8} – 10^{-6} М), на дифференцировку CD2/CD3/CD28 -активированных наивных Т-клеток опосредованы:

- супрессивным влиянием - на уровень экспрессии мРНК гена *U2af114*;
- стимулирующим - на уровни экспрессии мРНК генов *hTERT* и *Gfi1*. Выявленные изменения в экспрессии исследуемых генов сопровождаются достоверным снижением числа дубль-позитивных (CD45RA/RO) и CD45RO⁺ Т-клеток при неизменном содержании Т-лимфоцитов, экспрессирующих молекулы костимуляции/активации (CD28 и CD127), что свидетельствует о гормон-зависимом ограничении дифференцировки наивных Т-клеток.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Литвинова Л.С., Мазунин И.О., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Хазиахматова О.Г., Кофанова К.А. (Юрова К.А.). Дозозависимые эффекты стероидных гормонов на экспрессию генов *Gfi1* и *U2af114* в Т-лимфоцитах разной степени дифференцировки // **Молекулярная биология**. – 2013. - Т. 47, № 4. - С. 656-667 (IF-0,740).
2. Литвинова Л.С., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Шуплецова В.В., Кофанова К.А., Хазиахматова О.Г., Кайгородова Е.В., Гончаров А.Г. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов // **Медицинская иммунология**. – 2014. - Т. 6, № 1. - С. 7-26 (IF-0,359).
3. Шуплецова В.В., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Литвинова Л.С. Эффекты мужского полового гормона (тестостерона) на

- функциональную активность Т-лимфоцитов разной степени дифференцировки // *Гены&Клетки*. – 2014. Т. IX, №4. – С. 21-26 (IF=0,228).
4. Yurova K. A., Sokhnevich N. A., **Khaziakhmatova O.G.**, Litvinova L. S. Cytokine-mediated regulation of expression of Gfi1 and U2af1l4 genes by activated T-cells with various differentiation status in vitro // **Biochemistry (Moscow) Supplement series B: Biomedical Chemistry**. – 2015. – №2. – С. 145-149 (IF=0,365).
 5. Сохоневич Н.А., Юрова К.А., Гуцол А.А., **Хазиахматова О.Г.**, Мазунин И.О., Литвинова Л.С. Эффекты иммунорегуляторных цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на экспрессию генов Gfi1 и U2af1l4 в Т-лимфоцитах разной степени дифференцировки // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2015. - Т.159 (№ 2). - С. 196-200 (IF=0,565).
 6. Сохоневич Н.А., Юрова К.А., **Хазиахматова О.Г.**, Шуплецова В.В., Литвинова Л.С. Фенотипическая характеристика и функциональные особенности Т- и В-клеток иммунной памяти // **Цитология**. – 2015. – Т.57, №5. – С. 311-318. (IF=0,340).
 7. Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Юрова К.А., **Хазиахматова О.Г.**, Шуплецова В.В., Литвинова Л.С. Дозозависимые эффекты дексаметазона на функциональную активность Т-лимфоцитов разной степени дифференцировки // **Молекулярная биология**. – 2015. – Т. 49, №1. – С. 149-157 (IF=0,740).
 8. Шуплецова В.В., **Хазиахматова О.Г.**, Гуцол А.А., Юрова К.А., Сохоневич Н.А., Литвинова Л.С. Влияние половых стероидных гормонов (тестостерона и β -эстрадиола) на продукцию про- и противовоспалительных цитокинов активированными Т-лимфоцитами разной степени дифференцировки // **Цитокины и воспаление**. – 2015. – Т. 14, №1. – С. 57-62 (IF=0,355).
 9. Юрова К.А., **Хазиахматова О.Г.**, Сохоневич Н.А., Гончаров А.Г., Литвинова Л.С. Альтернативный сплайсинг молекулы CD45 в механизмах молекулярно-генетического контроля дифференцировки Т-клеток // **Российский иммунологический журнал**. – 2015. – Т. 9(18), №2. – С. 186-193 (IF=0,286).
 10. Сохоневич Н.А., Юрова К.А., **Хазиахматова О.Г.**, Литвинова Л.С. Эффекты цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на процессы активации и пролиферации наивных Т-клеток in vitro // *Международный научно-исследовательский журнал*. – 2015. – №4(35). – С. 21-25.
 11. Кофанова К.А., Сохоневич Н.А., **Хазиахматова О.Г.**, Мазунин И.О., Литвинова Л.С. Оценка влияния IL-7 и IL-15 на пролиферацию и транскрипцию мРНК гена hTERT Т-клетками памяти (CD45RO+) с разным функциональным статусом // Сборник статей по материалам XX международной заочной научно-практической конференции «Научная дискуссия: вопросы медицины». — М.: «Международный центр науки и образования», 2013. — С. 72-79.
 12. Sokhnevich N.A., Kofanova K.A., **Khaziakhmatova O.G.**, Litvinova L.S. Influence of cytokine IL-2 on naïve T-cells differentiation in vitro // *Fundamental and applied research in biology 3rd international scientific conference, Donetsk national university, 2014, February 24-27*. – С. 231.
 13. Shupletsova V.V., Yurova K.A., Sokhnevich N.A., **Khaziakhmatova O.G.**, Litvinova L.S. The effect of β -estradiol on the proliferation and the level of transcription mRNA of hTERT gene in CD45RO+ T-lymphocytes // *3rd European Conference on Biology and Medical Sciences*. – Австрия, г. Вена, 2014. С. 184-189.
 14. Гуцол А.А., Юрова К.А., Сохоневич Н.А., **Хазиахматова О.Г.**, Литвинова Л.С. Гормональная регуляция экспрессии гена теломеразы hTERT в популяции CD45RO⁺ Т-клеток памяти // Сборник статей Международной научно-практической конференции «Современные направления развития медицины-2014». Брянск. 2014. С. 257-261.
 15. Сохоневич Н.А., Юрова К.А., Шуплецова В.В., **Хазиахматова О.Г.**, Литвинова Л.С. Эффекты IL-10 на функциональную активность Т - клеток разной степени дифференцировки // *Международная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы образования и науки»*. Тамбов. 2014. С. 110-112.

16. Юрова К.А., Сохоневич Н.А., Хазиахматова О.Г., Литвинова Л.С. Влияние иммунорегуляторных цитокинов, имеющих общую \square -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15) на взаимосвязь между транскрипцией мРНК гена *hnRNPLL* и мембранной экспрессией костимуляторной молекулы - CD28 в механизмах дифференцировки Т-клеток *in vitro* // Сборник статей по материалам XXXV международной заочной научно-практической конференции «Научная дискуссия: вопросы медицины». — М.: Изд. «Международный центр науки и образования». - 2015. – С.27-31.
17. Юрова К.А., Сохоневич Н.А., Хазиахматова О.Г., Литвинова Л.С. Влияние IL-7 и IL-15 на созревание и дифференцировку наивных Т-лимфоцитов *in vitro* // Сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции «Перспективы развития науки и образования». Москва. Мин-во обр. и науки. - 2015. - С. 12-13.
18. Сохоневич Н.А., Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Литвинова Л.С. Влияние дексаметазона на дифференцировку и пролиферативный потенциал наивных Т-лимфоцитов // Российский иммунологический журнал. Тематический выпуск «Пермский научный форум». – 2015. – Т. 9 (18), № 2 (1). – С. 341-342 (IF 0.286).
19. Сохоневич Н.А., Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Литвинова Л.С. Цитокин-индуцированная активация и пролиферации TCR-активированных Т-лимфоцитов памяти // Российский иммунологический журнал. Тематический выпуск «Пермский научный форум». – 2015. – Т. 9 (18), № 2 (1). – С. 318-319 (IF 0.286).
20. Юрова К.А., Сохоневич Н.А., Хазиахматова О.Г., Литвинова Л.С. Влияние интерлейкинов -7 и -15 на дифференцировку TCR-активированных наивных Т-лимфоцитов *in vitro* // Российский иммунологический журнал. Тематический выпуск «Пермский научный форум». – 2015. – Т. 9 (18), № 2 (1). – С. 357-359.
21. Сохоневич Н.А., Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Литвинова Л.С. Влияние цитокинов, имеющих общую \square -цепь рецепторов (IL-2, IL-7 и IL-15) на дифференцировку цитотоксических - CD8+CD45RO+ Т-лимфоцитов памяти *in vitro* // Медицинская иммунология. Специальный выпуск, посвященный XV Всероссийскому научному форуму с международным участием им. Академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге». – 2015. – Т.17s. – С. 47-48.
22. Юрова К.А., Сохоневич Н.А., Хазиахматова О.Г., Литвинова Л.С. Эффекты rIL-2 на конверсию фенотипа TCR-активированных Т-лимфоцитов *in vitro* // Медицинская иммунология. Специальный выпуск, посвященный XV Всероссийскому научному форуму с международным участием им. Академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге». – 2015. – Т.17. – С. 54-55.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

<p>ГК - глюкокортикостероиды ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота кДНК – копияная дезоксирибонуклеиновая кислота мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота ПЦР – полимеразная цепная реакция РНК – рибонуклеиновая кислота CD – кластер дифференцировки (<i>cluster of differentiation</i>) Gfi1 (<i>Gfi1</i>) – фактор транскрипции (<i>growth factor independent 1</i>) PTPase – белок тирозиновая фосфатаза, рецепторный тип (<i>Protein Tyrosine-Phosphatase, Receptor Type</i>). qPCR – количественная полимеразная цепная реакция (<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>)</p>	<p>CD45 - общелейкоцитарный рецептор CD45RA - высокомолекулярная изоформа рецептора CD45 CD45RO - низкомолекулярная изоформа рецептора CD45 CD62L - молекула, отвечающая за поступление Т-клеток из кровяного русла во вторичные лимфоидные органы. hTERT – каталитическая субъединица фермента теломеразы (<i>humans Telomerase reverse transcriptase</i>) TCR – Т-клеточный рецептор (<i>T-cell receptor</i>) U2AF26 (U2af114) – вспомогательный фактор сплайсинга (<i>U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1 like 4</i>)</p>
---	--

Подписано в печать __. __. **2015**
формат 60X90 1/16. Усл. печ. листов 0,65. Тираж 100 экз. Заказ №
Отпечатано полиграфическим отделом
Издательства Балтийского федерального университета им. И. Канта
236041, г. Калининград, ул. А. Невского 14