

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта"

На правах рукописи

**Хазиахматова Ольга Геннадьевна**

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

03.03.01 - физиология

Диссертация  
на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,  
Л.С. Литвинова

Калининград - 2015

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ</b>	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	5
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	13
1.1. Характеристика общелейкоцитарного рецептора – молекулы CD45	13
1.2. Альтернативный сплайсинг и его роль в экспрессии изоформ молекулы CD45	22
1.3. Краткая характеристика теломер и фермента теломеразы	30
1.3.1. Роль теломеразы в пролиферативном гомеостазе Т-клеток	32
1.4. Гормональная регуляция иммунной системы	36
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ</b>	43
2.1. Объект и материал исследования	43
2.2. Методы исследования	43
2.2.1. Выделение мононуклеарных лейкоцитов из периферической крови	45
2.2.2. Выделение наивных (CD45RA <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> ) Т-лимфоцитов из фракции мононуклеарных лейкоцитов методом иммуномагнитной сепарации	45
2.2.3. Культивирование CD45RA <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> Т-клеточных культур	48
2.2.4. Определение общего числа клеток (в мл) и количества жизнеспособных лимфоцитов в культурах CD45RA <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> Т-клеток методом проточной цитометрии	49
2.2.5. Определение поверхностных молекул костимуляции и активации (CD127 и CD28) на CD45RA <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> Т-клетках методом проточной цитометрии	50
2.2.6. Определение поверхностных маркеров конверсии наивных Т-клеток методом проточной цитометрии	52
2.2.7. Выделение тотальной РНК	53
2.2.8. Обратная транскрипция образцов тотальной РНК	55
2.2.9. Определение уровня относительной экспрессии генов методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени	56
2.2.10. Методы статистического анализа данных	60
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ</b>	62
3.1. Оценка эффектов стероидных гормонов на общее количество клеток (10 <sup>6</sup> /мл) и жизнеспособность в культурах CD2/CD3/CD28-активированных CD45RA <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> Т-клеток	62
3.2. Оценка эффектов стероидных гормонов на мембранную экспрессию молекулы активации - CD127 в культурах CD2/CD3/CD28-активированных CD45RA <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> Т-клеток	64

3.3. Оценка эффектов стероидных гормонов на мембранную экспрессию молекулы позитивной костимуляции (CD28) в культурах CD2/CD3/CD28-активированных CD45RA <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> Т-клеток	66
3.4. Оценка эффектов стероидных гормонов на мембранную экспрессию изоформ общелейкоцитарного рецептора CD45 в культурах CD2/CD3/CD28-активированных CD45RA <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> Т-клеток	68
3.5. Оценка влияния стероидных на экспрессию гена каталитической субъединицы теломеразы - <i>hTERT</i> в культурах CD2/CD3/CD28-активированных CD45RA <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> Т-клеток	70
3.6. Оценка влияния стероидных гормонов на экспрессию генов <i>Gfi1</i> и <i>U2af1l4</i> в культурах активированных CD45RA <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> Т-клеток	72
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ</b>	<b>76</b>
<b>ВЫВОДЫ</b>	<b>106</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>	<b>107</b>

## СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ГК - глюкокортикостероиды  
ER - ядерные рецепторы к эстрадиолу (*estradiol reseptor*)  
ERE - функциональный элемент ответа на эстроген (*estrogen responsive element*)  
GCRm – рецепторы к ГК, экспрессированные на клеточной мембране  
CD – кластер дифференцировки (*cluster of differentiation*)  
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.  
Th – Т-хелперы  
NK – натуральные киллеры  
TCR – Т-клеточный рецептор (*T-cell receptor*)  
МНС – главный комплекс гистосовместимости (*major histocompatibility complex*)  
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота  
АПК – антиген-презентирующая клетка  
Ptpnc – белок тирозинфосфатаза, рецепторный тип (*Protein Tyrosine-Phosphatase, Receptor Type*).  
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота  
РНК – рибонуклеиновая кислота  
кДНК – копияная дезоксирибонуклеиновая кислота  
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота  
АТФ - аденозинтрифосфат  
ПЦР – полимеразная цепная реакция  
ARS- активационно-ответная последовательность (*activation-responsive sequence*)  
Bcl – антиапоптотический фактор  
Gfi1 (*Gfi1*) – фактор транскрипции (*growth factor independent 1*)  
IL - интерлейкин  
Jak - тирозинкиназа  
qPCR – количественная полимеразная цепная реакция (*Quantitative polymerase chain reaction*)  
STAT – фактор транскрипции эукариот  
U2AF26 (U2af114) – вспомогательный фактор сплайсинга (*U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1 like 4*)  
*hTERT* – каталитическая субъединица фермента теломеразы (*humans Telomerase reverse transcriptase*)

## ВВЕДЕНИЕ

Иммунная система организма характеризуется сложной ауторегуляцией (Ярилин А.А., 2010; Черешнев В.А., 2011; Thomas J.A., Badini M., 2011; Harris N., 2015; Bel S., Hooper L.V., 2015). Перестройка функций 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 действие на все звенья иммунитета, о чем свидетельствует изменение уровней экспрессии гормонов и их концентрационных характеристик в периферическом кровотоке (Kim M.S., 2003; Beigneux A.P., 2003; Brierre 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 реакции на стресс, 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 иммунные реакции 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 варибельных 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 не антигенной природы. Мы предполагаем, что стероидные гормоны принимают непосредственное участие в дифференцировке и созревании наивных Т-клеток посредством регуляции альтернативного сплайсинга гена *Ptpnc1*, 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<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) 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<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) 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<sup>+</sup> 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 ( $10^{-7} - 10^{-5}$  M), и женский половой гормон  $\beta$ -эстрадиол в концентрациях -  $10^{-7} - 10^{-6}$  M, 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<sup>+</sup> Т-лимфоцитов на фоне уменьшения содержания CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> и CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup> (в случае воздействия  $\beta$ -эстрадиола) Т-клеток. Выявленные нами изменения свидетельствуют о процессах глюкокортикоид- и эстроген-опосредованной модуляции процессов дифференцировки и созревания наивных (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) 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 ( $10^{-8} - 10^{-6}$  M) и  $\beta$ -эстрадиол в концентрациях  $10^{-9} - 10^{-8}$  M, 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 ( $10^{-8} - 10^{-6}$  M) и  $\beta$ -эстрадиола ( $10^{-9} - 10^{-8}$  M) на дифференцировку и созревание CD2/CD3/CD28-активированных наивных Т-клеток ассоциированы с 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, ответственных за сохранение 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) 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 3<sup>rd</sup> 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 иммуноморфологический 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 и 13 статей и тезисов в материалах конференций и симпозиумов.

### **Структура и объем диссертации**

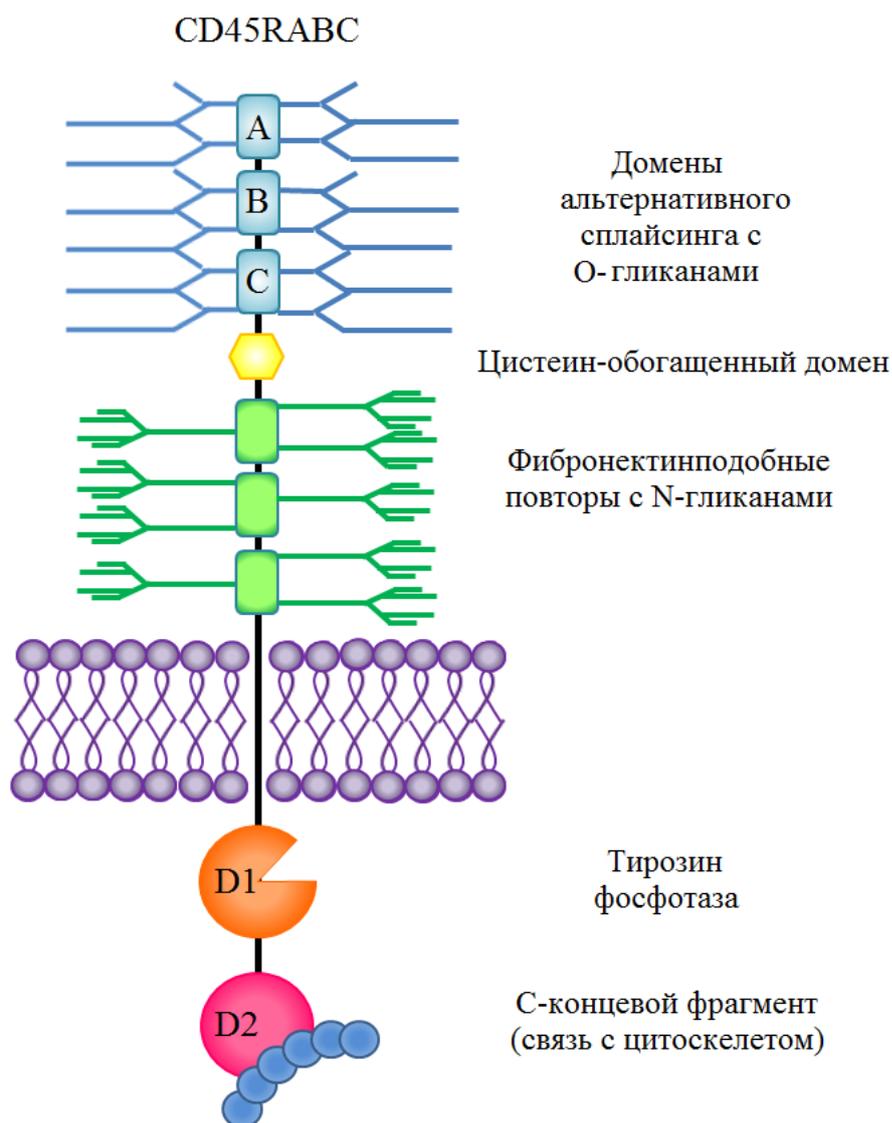
Диссертация изложена на 142 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырёх глав, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 25 рисунками и 7 таблицами. Библиографический указатель включает 396 источников (42 - отечественных и 354 - иностранных).

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

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Характеристика общелейкоцитарного рецептора – молекулы CD45

CD45 – белок-рецептор тирозин фосфатазы (PTP), экспрессируется на высоком уровне во всех ядерных клетках гемопоэтического происхождения и участвует в процессах их развития, активации, старения и апоптотической гибели (Thomas M.L., 1989; Hermiston M.L. et al., 2003; Tchilian E.Z., Beverley P.C., 2006). CD45 – общий лейкоцитарный антиген (LCA), относится к семейству трансмембранных гликопротеинов, молекулярная масса которых составляет 180 - 240 кДа. Полипептидная цепь состоит из 1281 аминокислоты. Тирозин-специфическая фосфатаза (CD45) выполняет важную функцию в передаче сигнала с Т-клеточного рецептора (TCR) внутрь клетки и представлена на поверхности Т-клеток разными изоформами. Одной из функций CD45 является связывание TCR с корецепторами - CD4 или CD8, что обеспечивает эффективную клеточную сигнализацию (Hermiston M.L. et al., 2003; Tchilian E.Z., Beverley P.C., 2006; Thiel N. et al., 2015). В молекуле CD45 выделяют три домена: *внеклеточный, гидрофобный домен мембранного пространства* (состоит из 22 аминокислот) и *цитоплазматический* домен. Внутриклеточная область CD45 состоит из домена тирозин фосфатазы (D1) и С-концевого домена (D2), который связывает цитоплазматическую часть CD45 с цитоскелетом (Lokeshwar V.B., Bourguignon L.Y., 1992; Iida N. et al., 1994) (рисунок 1). D1 домен обладает тирозинфосфатазной активностью. Его основным субстратом является Lck-киназа, которая относится к семейству Src- киназ (Felberg J. et al. 2004). Фосфатаза CD45 действует на Lck в двух нормативных сайтах, которые модулируют деятельность Lck: изменения в активности CD45 могут активировать или подавлять сигнализацию Lck (Lefebvre D.C. et al., 2003; Falahati R., Leitenberg D., 2007). Мембранно-дистальный D2 домен CD45 разделяет последовательность и гомологичную структуру с D1 доменом, но не обладает фосфатазной активностью. Домен D2 действует в качестве регулятора D1 фосфатазы и специфично связывается с цитоскелетом через линкерный белок - *фодрин*. Связывание области D2 с фодрином увеличивает активность фосфатазы домена D1 (Lokeshwar V.B., Bourguignon L.Y., 1992; Wang Y., Johnson P., 2005; Pericolini E. et al., 2010).



**Рисунок 1.** Модель CD45RABC, крупнейшей изоформы CD45. В молекуле выделяют три домена: внеклеточный домен (домены альтернативного сплайсинга, цистеин-обогащенный домен, фибронектин подобные повторы), гидрофобный домен мембранного пространства (состоит из 22 аминокислот) и цитоплазматический домен (D1 и D2 домены) (адаптировано из Earl L.A., Baum L.G., 2008).

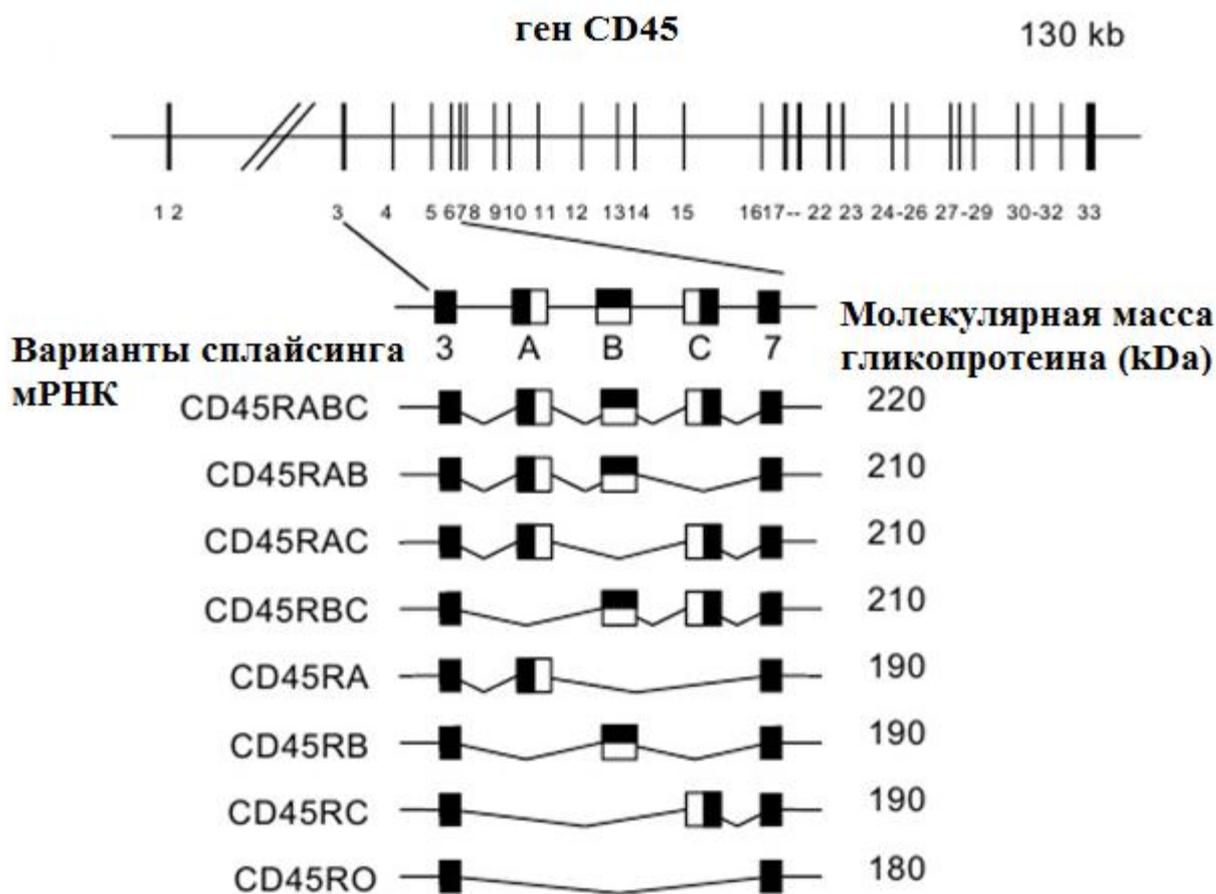
Внеклеточная часть CD45 состоит из трех фибронектинподобных (FN) регионов, цистеин-обогащенных доменов и трех доменов, формирование которых связано с альтернативным сплайсингом мРНК доменов - А, В и С. Внеклеточная часть по всей длине несет N-гликаны, в то время как O-связанные гликаны находятся, в основном, на В и С доменах (Barclay A.N. et al., 1987; Jackson D.I., Barclay A.N., 1989; Earl L.A. et al., 2010) (рисунок 1). Несмотря на то, что влияние структуры внеклеточного домена на активность фосфатазы внутриклеточного домена не обнаружено, различные изоформы CD45, имея разную степень гликозилирования, могут дифференцированно регулировать связывание лиганда и,

следовательно, внутриклеточную сигнализацию (Majeti R. et al., 1998; Irlles C. et al., 2003; Earl L.A. et al., 2010). В отличие от обычных детерминант лиганд-рецепторной специфичности, связь нескольких различных лигандов CD45 зависит от общего размера и гликозилирования внеклеточной области, а не от точной последовательности белка или структуры аминокислот (Earl L.A., Baum L.G. 2008; Clark M.C., Baum L.G. 2012; Thiel N. et al., 2015).

Мембрано-проксимальная область эктодомена CD45, состоящая из трех FN повторов и богатой цистеином области, в значительной степени, является N-гликозилированной (Lim Y.C. et al., 2001). Формирование сложных N-гликанов необходимо для стабильности молекулы CD45 и транспорта к поверхности клетки (Pulido R., Sánchez-Madrid F., 1992). Установлено, что правильное присоединение внутриклеточного домена CD45 к цитоскелету и надлежащее расположение гликанов FN-повторов внеклеточного домена, имеют решающее значение для экспрессии CD45 на поверхности клетки (Lokeshwar V.B., Bourguignon L.Y., 1992; Pradhan D., Morrow J., 2002).

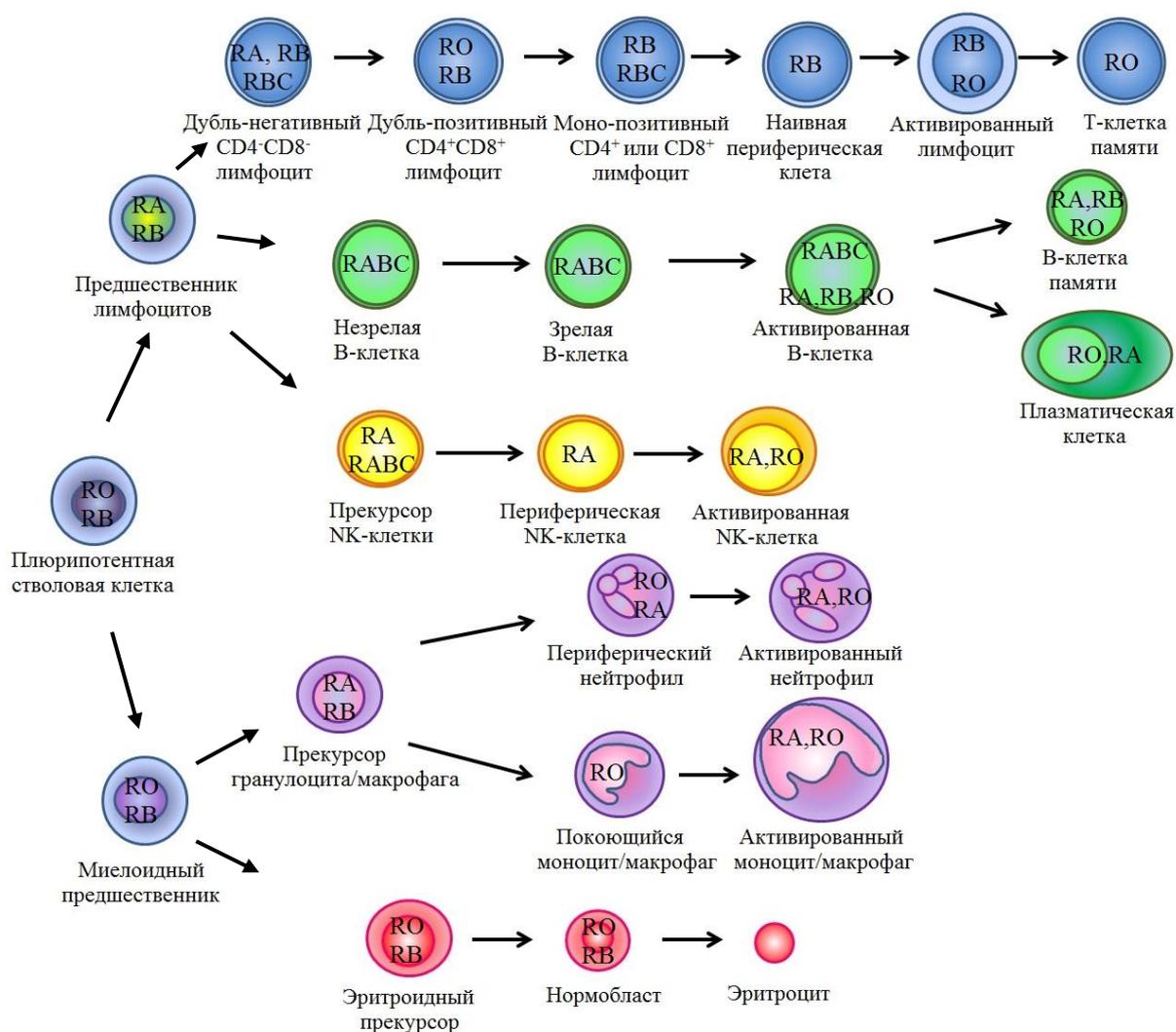
Доказано, что с использованием механизма альтернативного сплайсинга, в результате дифференциального использования трех экзонов внеклеточного домена, возможно формирование восьми различных CD45 изоформ (Hathcock K.S. et al., 1992), пять из которых присутствуют на лимфоцитах человека (R0, RA, RB, RBC and RABC изоформы) (Thomas M.L., 1989; Trowbridge I.S., Thomas M.L., 1994; Dornan S. et al., 2002) (рисунок 2). CD45 изоформы, в которых отсутствуют все или некоторые из возможных сплайсинговых регионов (например R0, RA или RB), содержат меньше O-связанных гликанов, чем полноценная RABC изоформа, хотя специфические изоформы могут нести уникальные гликаны (Barclay A.N. et al., 1987; Pulido R. et al., 1994).

Основные изоформы R0, RA, RB, RBC и RABC дифференциально экспрессируются в течение развития и дифференцировки лимфоидных клеток (Trowbridge I.S., Thomas M.L., 1994; Dornan S. et al., 2002; Hermiston M.L. et al., 2003).



**Рисунок 2.** Ген и структура белка CD45. Экзон-интрон структура гена, в том числе большой интрон (W50 кб) между экзонами альтернативного сплайсинга 2 и 3. Экзоны 4 (A), 5 (B) и 6 (C) могут генерировать восемь изоформ. Все изоформы имеют общий внеклеточный участок полученный из экзонов 7-15, который кодирует цистеин богатые домены и три фибронектинподобных домена, трансмембранный сегмент – эксон 16 и домены интрацитоплазматической фосфатазы – D1 (каталитически активный) и D2 (адаптировано из Tchilian E.Z., Beverley P.C., 2006).

Экспрессия CD45 регистрируется уже на стадии плюрипотентных стволовых клеток и сохраняется в лимфоидной и миелоидной линиях; исключением являются зрелые эритроциты (Earl L.A., Baum L.G., 2008; McDonald L.T. et al., 2015) (рисунок 3). Лимфоидные клетки-предшественницы экспрессируют CD45RA и CD45RB изоформы, однако Т-клетки памяти экспрессируют, преимущественно, низкомолекулярную изоформу - CD45RO (Merkenschlager M., Beverley P.C., 1989; McNeill L. et al. 2004). Различия в размере и относительной гликозилированности изоформ могут привести к изменениям в динамике уровня активности фосфатазы CD45 в клетке, изменяя, таким образом, ее чувствительность на внешние раздражители (Clark M.C., Baum L.G., 2012; Thiel N. et al. 2015).



**Рисунок 3.** Экспрессия преобладающих изоформ рецептора CD45 на клеточной поверхности гемопоэтических клеток (адаптировано из Hermiston M.L. et al., 2003).

Несмотря на многочисленные исследования, установление функциональных особенностей для различных изоформ рецептора CD45 представляется довольно трудной задачей. В целом, известно, что уровень экспрессии CD45 является критическим параметром и что различные уровни экспрессии этой молекулы необходимы на разных этапах развития Т-клеток (Mustelin T., Tasken K. 2003; Holmes N., 2006; McNeill L. et al., 2007).

Экспрессия изоформ CD45 имеет существенные различия в популяциях хелперных и цитотоксических Т-клеток. Выявлено, что у мышей, пролиферирующие CD4<sup>+</sup> Т-клетки экспрессируют, преимущественно, CD45RO и CD45RB, в то время как CD8<sup>+</sup> Т-клетки – CD45RBC изоформы (Seki I. et al., 2010).

На основе различного уровня экспрессии изоформ CD45RB, CD4<sup>+</sup> Т-клетки (у мышей) можно разделить на две популяции. Так, для CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup> Т-клеток

характерна продукция интерферона- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), в то время как CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> T-клетки продуцируют, в основном, интерлейкин-4 (IL-4) (Powrie F. et al., 1994; Mosmann T.R., Coffman R.L., 1989; McNeill L. et al., 2004; Wu Z. et al., 2010).

Еще в 90-х гг прошлого столетия разработаны терапевтические подходы, основанные на свойствах CD45RB предотвращать процессы отторжения почечного аллотрансплантата у мышей в эксперименте (Lazarovits A.I. et al., 1996). Кроме того, описана способность mAb CD45RB обращать вспять острое отторжение трансплантата, вследствие чего приобретается толерантность (Gao Z. et al., 1999). В другой работе, свойства иммунологической толерантности CD45RB связывают с влиянием анти-CD45RB моноклональных антител на функциональные свойства дендритных клеток. Так, добавление anti-CD45RBmAb в культуральную среду, способствует угнетению экспрессии - МНС, CD86 и CD40 на дендритных клетках, что соответствует их незрелому фенотипу (Xia X. et al., 2009). Описано, что CD45RB является преобладающей изоформой в культуре клеток микроглии у мышей. Показано, что инкубация этих клеток с анти-CD45RB антителами приводит к снижению ЛПС-индуцированной активации микроглии. Подтверждением этому является угнетение продукции фактора некроза опухолей  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Townsend K.P. et al., 2004).

Установлено, что наивные Т-лимфоциты экспрессируют изоформу с высоким молекулярным весом, содержащую экзон А (CD45RA), который после активации клетки заменяется изоформой с низким молекулярным весом - CD45RO (Akbar A.N. et al., 1988; Verfuether S. et al., 2015). Однако разделение Т-клеток на CD45RA и CD45RO - Т-клетки, фенотипы которых соответствуют наивным клеткам-предшественницам и Т-клеткам иммунной памяти, сильно упрощены, поскольку Т-клетки человека могут переходить от CD45RO к CD45RA в условиях *in vivo* и *in vitro*, без антигенной стимуляции (Michie C.A. et al., 1992; Callan M.F. et al., 1998; Wills M.R. et al., 1999; Geginat J. et al., 2001; Dunne P.J. et al., 2005). Кроме того, концепция, основанная на экспрессии CD45RA на поверхности «наивных» клеток и CD45RO на Т-клетках памяти, не в полной мере объясняет наличие выраженных эффекторных свойств у цитотоксических (CD8<sup>+</sup>) Т-клеток с фенотипом CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>, равно как и их способности быстро отвечать на повторный контакт с антигеном (Кудрявцев И.В., 2014). В связи с этим,

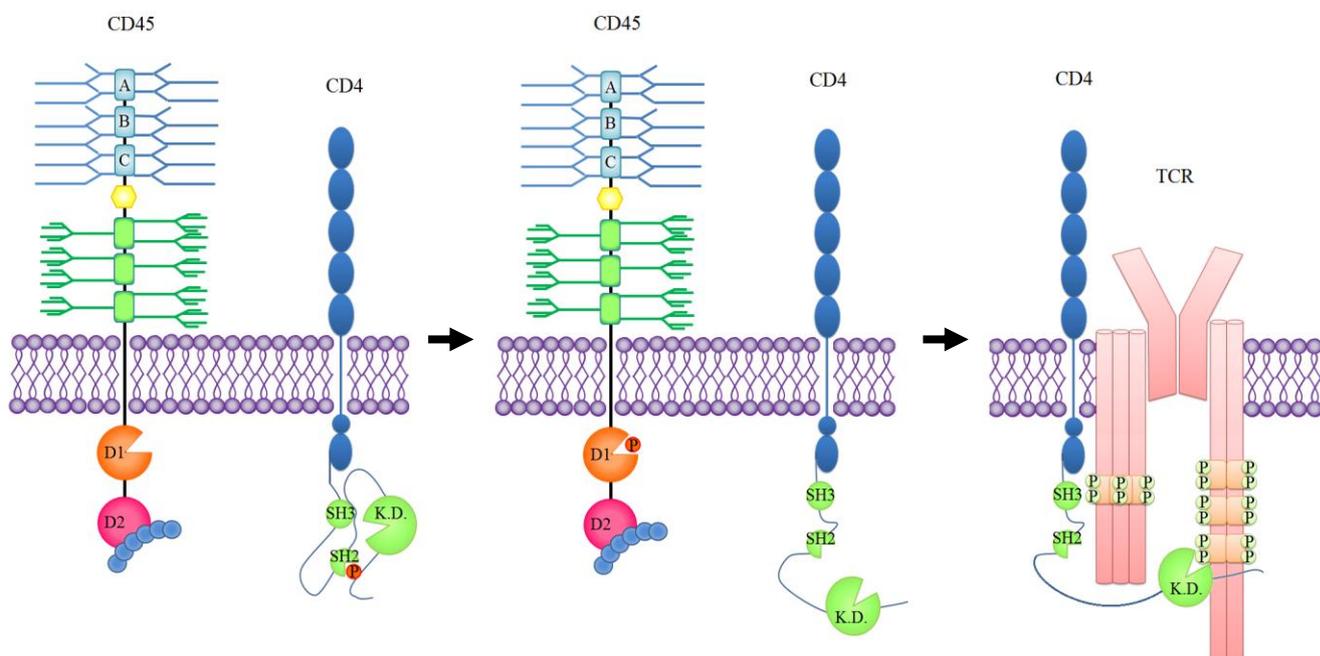
современные способы разделения Т-клеток на популяции *наивных* и *Т-клеток памяти*, базируются на выявлении экспрессии молекул, отвечающих за миграцию клеток (CD62L и/или CCR7) и/или ко-стимулирующих рецепторов - CD27 и/или CD28 (Picker L.J., 1993; Picker L.J. et al., 1993; Libregts S. et al., 2011; Кудрявцев И.В., Савицкий В.П., 2012; van Montfrans J.M. et al., 2012; Mahnke Y.D. et al., 2013; Coquet J.M. et al., 2013; Ribeiro S.T. et al., 2015).

Существуют неопровержимые доказательства, что укороченная молекула – CD45RO имеет более высокую активность, чем изоформы с высоким молекулярным весом (CD45RABC, CD45RA, BC) (Novak T.J. et al., 1994). В Т-клеточных линиях, экспрессия CD45RO обеспечивает более эффективную сигнализацию TCR, и, соответственно, активацию Т-клеток (Holmes N., 2006). Установлено, что формирование иммунного синапса клетками, несущими на своей поверхности укороченный вариант молекулы CD45, облегчается за счет устранения помех при взаимодействии клеток, создаваемых сложной молекулой CD45RA (Ярилин А.А., 2010). Кроме того, высказано предположение, что молекула CD45RABC не способна создавать CD45/CD3 близкое взаимодействие, а также вызывать ответ цитотоксических Т-клеток, в связи с ее размером и распределением заряда (Kozieradzki I. et al., 1997; Leitenberg D. et al. 1999).

В лейкоцитах, некоторые члены семейства Src-киназ были идентифицированы как субстраты для CD45: Lck, и в меньшей степени Fyn, в Т-клетках (Ostergaard H.L. et al., 1989; Mustelin T., Coggeshall K.M., 1989; Hurley T.R. et al., 1993; Mustelin T., Tasken K. 2003); Lyn в В-клетках (Katagiri T. et al., 1995; Pao L.I., Cambier J.C. 1997; Katagiri T. et al., 1999; Shrivastava P. et al., 2004); Hck и Lyn в макрофагах (Roach T. et al., 1997); Lyn, Hck и Fyn в дендритных клетках (Cross J.L. et al., 2008).

Lck-киназа находится в непосредственной близости от TCR и при активации фосфорилирует рецептор на основе тирозина (ITAMs) – субъединицу комплекса CD3-TCR (Gabaev I. et al., 2011). По аналогии с другими Src-киназами, активность Lck регулируется с помощью статуса фосфорилирования тирозиновых остатков – Y505 и Y394 (Salmond R.J. et al., 2009) (рисунок 4). Так, при фосфорилировании регуляторного тирозина - Y505, Lck сохраняется в неактивной, нерабочей форме (Gabaev I. et al., 2011). CD45, дефосфорилируя Y505, приводит к конформации

молекулы Lck (раскручивание молекулы); сигнал от комплекса CD3-TCR приводит к фосфорилированию Y394, активируя, тем самым Lck-киназу (Gabaev I. et al., 2011) (рисунок 4). CD45 также имеет подавляющую функцию, дефосфорилируя Y394 (McNeill L. et al., 2007).



**Рисунок 4.** Модель активации Lck-киназы. pY394 Lck связан с CD4 и локализуется с TCR / CD3 и CD45. В покоящихся Т-клетках, CD3 $\zeta$  является гипофосфорилированным и находится в комплексе с неактивной ZAP-70-киназой. Активация Т-клеток сопровождается каскадом событий. МНС-TCR связывание способствует кластеризации CD4-Lck в результате активации Lck. Активность Lck киназы регулируется обратным фосфорилированием двух тирозиновых остатков: положительной регуляцией тирозина Y394 в домене киназы (K.D.) и отрицательным регулированием тирозина Y505 в С-терминальном конце. Когда Y505 фосфорилируется (P в красном круге), он образует внутримолекулярные связи с его собственным доменом SH2, блокируя домен киназы. CD45 может дефосфорилировать pY505, открывая структуру Lck, которая характеризуется относительно низкой активностью киназы. Для достижения полной активности киназы, Y394 фосфорилируется (изображен здесь P в зеленом круге). Активированная Lck киназа фосфорилирует ITAMs CD3цепей, которая запускает ZAP-70 (адаптировано из Filipp D. et al., 2012).

Исследование активности фосфатазы продемонстрировало линейную зависимость с уровнем ее экспрессии. Более низкие уровни мембранной экспрессии CD45 активируют Lck, тогда как высокие - ингибируют (McNeill L. et al., 2007) (рисунок 4).

Исследования в научной периодике, описывающие механизмы регуляции CD45, крайне малочисленны. Отсутствие доказательств для лиганд-индуцированной активации CD45 (общий механизм для рецепторных тирозинкиназ) привело к мнению, что фосфатазная активность CD45 не включается конкретным внеклеточным лигандом. Вместо этого полагают, что CD45 постоянно находится в активном состоянии, обеспечивая дефосфорилирование киназ семейства Src, поддерживая их в рабочем, нефосфорилированном состоянии (Saunders A.E., Johnson P., 2010). Единственным специфическим внеклеточным лигандом является полиморфный белок цитомегаловируса UL11 (Gabaev I. et al., 2011). В присутствии pUL11 ингибируется несколько CD45-опосредованных функций: сокращается индукция фосфорилирования тирозина у нескольких сигнальных белков при стимуляции TCR и нарушается пролиферация Т-клеток (Gabaev I. et al., 2011). Большая часть молекулы CD45 находится в плазматической мембране, оставляя лишь небольшой процент, который расположен в липидных слоях. Тем не менее, расположение молекулы CD45 на мембране не является статичным, ее связь с липидными рафтами является динамичной и зависит от содержания холестерина (Edmonds S.D., Ostergaard H.L., 2002).

Как уже упоминалось ранее, в Т-клетках CD45 имеет важное значение для передачи сигналов активации, принятых через TCR эффекторными молекулами, что, в конечном счете, приводит к активации и пролиферации иммунокомпетентных клеток. В отсутствие CD45, Lck-киназа – неактивна и сигнализация через TCR, отсутствует (Gabaev I. et al., 2011).

Установлено, что CD45 через рецепторные взаимодействия, способен регулировать уровень секреции цитокинов в различных типах гемопоэтических клеток (de Dios A. et al., 2005). Так, CD45 модулирует уровень продукции интерферона и активацию его рецептора, посредством дефосфорилирования Jaks-киназ (Janus киназы) (Hermiston M.L. et al., 2003). Отрицательное регулирование системы JAK-STAT посредством CD45 имеет решающее значение для основных процессов клеточного гомеостаза: пролиферации, дифференцировки и анти-вирусной активности, опосредованных эффектами цитокинов (Penninger J.M. et al., 2001).

CD45 также играет значительную роль в регуляции секреции цитокинов и хемокинов натуральными киллерами (NK-клетки). Стимуляция через MHC I-связывающий рецептор Ly49 на NK-клетках активирует SFKs-киназы, такие как SYK, JNK и p38, которые приводят к запуску продукции хемокинов и цитокинов. В дополнении к вышесказанному, CD45 регулирует выброс гистамина после дегрануляции в тучных клетках, а также уровень продукции IL-6 нейтрофилами (Tchilian E.Z., Beverley P.C., 2006).

Выявлено, что CD45 может модулировать клеточные реакции путем регуляции порога относительной чувствительности клеток к внешним раздражителям, что позволяет рассматривать тирозинфосфатазы в качестве потенциальных терапевтических мишеней (He R.J. et al., 2014).

Интерес к CD45 возрастает, в связи с его функциями в качестве регулятора апоптоза. Так, перекрестное сшивание внеклеточной части CD45 с моноклональными антителами или галектином-1, может индуцировать апоптоз в эозинофилах и Т- и В-клетках (Dupéré-Minier G. et al., 2010). Интересно, что тирозинфосфатаза CD45 также вовлечена в ядерный апоптоз, индуцированный митохондриальными агентами. Описано участие CD45 в апоптозе, индуцированном ВИЧ-инфекцией (Dupéré-Minier G. et al., 2010). Некоторые исследования показали, что для активированных Т-клеток характерна критическая экспрессия B220, которая ассоциирована с индукцией апоптоза (Benbijja M. et al., 2014). Следует отметить, что B220 является изоформой CD45 и, как правило, конститутивно экспрессируется на В- и NK-клетках (Hermiston M.L. et al., 2003).

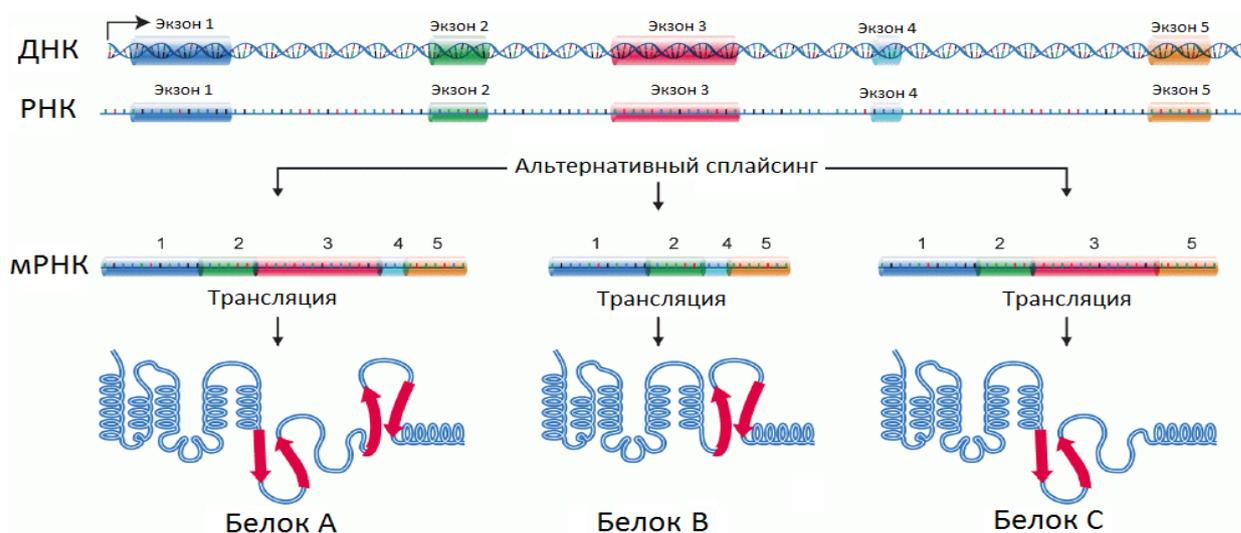
Резюмируя вышесказанное, следует заключить, что молекула CD45 - член семейства протеин-тирозин-фосфатаз, регулирует различные клеточные процессы, включая рост клеток, их дифференцировку, митотический цикл и онкогенную трансформацию. В Т-клетках, CD45 имеет важное значение для передачи TCR сигналов активации, что, в конечном счете, приводит к активации и пролиферации иммунокомпетентных клеток.

## **1.2. Альтернативный сплайсинг и его роль в экспрессии изоформ молекулы CD45**

*Ключевым механизмом* регуляции экспрессии генов, позволяющим получить несколько уникальных мРНК из одного гена с помощью избирательного включения или исключения экзонов, является альтернативный сплайсинг (Tong A., et al., 2005). Более 90% человеческих генов регулируются посредством альтернативного сплайсинга (Tong A., Nguyen J., 2010). Изменение потенциала кодирования белков генов человека специфично для определенных типов клеток, а также может наблюдаться в ответ на воздействие факторов окружающей среды (Wang E.T. et al., 2008; Pan Q. et al., 2008). Альтернативный сплайсинг особенно распространен в генах, экспрессирующихся в нервной и иммунной системах, в которых особое значение имеют функциональное разнообразие и скорость клеточного ответа (Modrek V. et al., 2001). Нарушение нормального протекания процессов альтернативного сплайсинга в этих типах клеток вызывает возникновение разного рода нарушений, подтверждая физиологическую значимость альтернативного сплайсинга (Cooper T.A. et al., 2009; Evsyukova I. et al., 2010; Motta-Mena L.V. et al., 2011).

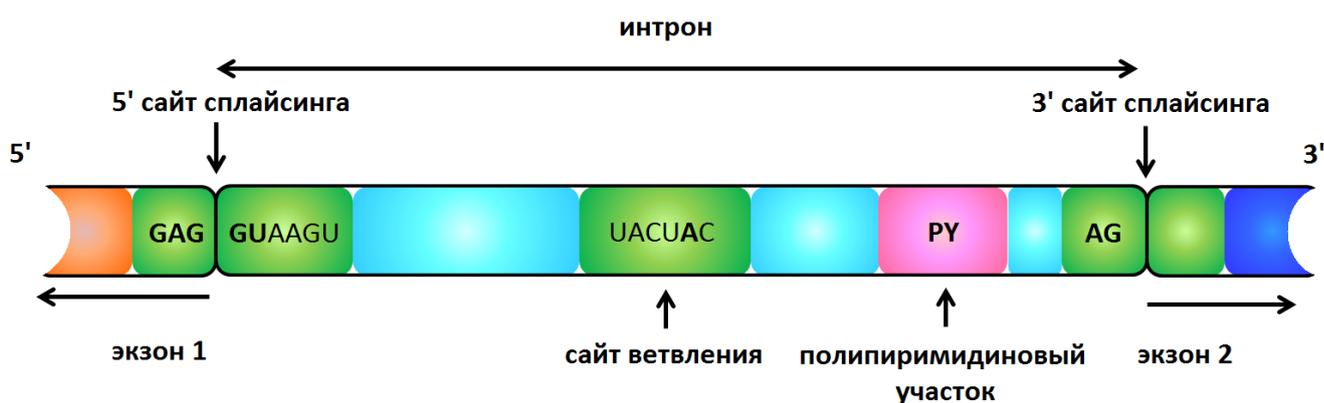
Сплайсинг РНК происходит в результате транскрипции прерывистых генов и, как правило, приводит к образованию единственного типа мРНК. В этом случае реализуется лишь один вариант разрезания и сшивания интронов и экзонов. Однако РНК некоторых генов подвергается альтернативному сплайсингу – процессу, который обеспечивает кодирование одним геном нескольких последовательностей мРНК (Льюин Б., 2011) (рисунок 5). В рамках обработки РНК, интроны удаляются путем сплайсинга РНК либо сразу после, либо одновременно с транскрипцией (Tilgner H. et al. 2012). В некоторых случаях, окончательная модель экспрессии гена, определяется первичным транскриптом, поскольку схема сплайсинга изменяется в результате использования разных стартовых точек транскрипции или образования альтернативных 3'-концов. Так же существует регуляция разных вариантов сплайсинга единственного первичного транскрипта, при этом внутренние экзоны заменяются на другие, добавляются или исключаются из состава зрелой мРНК. Так, несколько продуктов сплайсинга единственного РНК-предшественника, образуются в одной и той же клетке; иногда, процесс альтернативного сплайсинга регулируется таким образом, что каждый конкретный вариант реализуется лишь в определённых условиях. Самым

острым вопросом в этой области остаются механизмы выбора того или иного варианта сплайсинга (Льюин Б., 2011).



**Рисунок 5.** Модель альтернативного сплайсинга ДНК (адаптировано из Matera A.G., Wang Z., 2014).

Сплайсинг катализируется сплайсосомой, большим РНК-белковым комплексом, состоящим из пяти малых ядерных рибонуклеопротеинов (мяРНП). Сборка и функционирование сплайсосомы происходит во время транскрипции пре-мРНК. РНК компоненты мяРНП взаимодействуют с интроном и участвуют в катализе. В последовательности интрона выделяют три консервативных сайта сплайсинга: донорный сайт, сайт ветвления (*branch point*) и сайт акцептор (рисунок 6).



**Рисунок 6.** Строение интрона (адаптировано из Clancy S., 2008).

Сайт *донор* включает в себя почти инвариантную последовательность GU на 5'-конце. Сайт *акцептор* на 3'-конце завершает интрон почти инвариантной последовательностью - AG. *Сайт ветвления* представляет собой 2'-гидроксильную

группу остатка аденина интрона, он расположен на расстоянии 17-40 нуклеотидов выше 3'-сайта сплайсинга. Между *сайтом ветвления* и *сайтом акцептором* есть область с высоким содержанием пиримидинов (С и U), или полипиримидиновый участок (Black D.L., 2003; Clancy S., 2008).

Сплайсосома соединяет концы интронов, которые содержат GU последовательность нуклеотидов на 5' сайте сплайсинга и AG на 3' сайте сплайсинга. Она состоит из U1, U2, U4, U5 и U6 мяРНП (small nuclear RNAs - snRNAs) и большого количества вспомогательных белков (номенклатура – U образовалась из-за высокого содержания уридина) (рисунок 6). Вместе они способны точно распознать сайты сплайсинга и катализировать 2 шага реакции сплайсинга. Кроме того, некоторые белки, в том числе малый ядерный РНК U2 вспомогательный фактор 1 (U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1) или U2AF35 (масса 35 кДа), U2AF2 (U2AF65) (Graveley B.R. et al., 2001) и SF1 – фактор сплайсинга 1, участвующий в АТФ-зависимом формировании комплекса сплайсосомы (Rino J. et al., 2008), необходимы для сборки сплайсосомы (Black D.L., 2003; Matlin A.J. et al., 2005).

Процесс сборки сплайсосомы протекает в несколько стадий, формируя промежуточные комплексы (Matera A.G., Wang Z., 2014). В начале сборки сплайсосомы, U1 распознает и связывается с консервативной последовательностью GU на 5'-сайте сплайсинга. Затем SF1 связывается с интроном в точке разветвления (с аденозином). На данном этапе эти связи являются «Е'» комплексом. На следующем этапе большая субъединица (65 kDa) гетеродимерного вспомогательного фактора U2 (U2AF2 или U2AF65) связывается с полипиримидиновым участком интрона (polypyrimidine tract), а малая субъединица (35 kDa) U2AF1 (U2AF35) связывается с консервативной последовательностью AG на 3'-сайте сплайсинга. После этого все образовавшиеся связи являются АТФ-независимым комплексом «Е». Позже U2 snRNP (small nuclear ribonucleoproteins - snRNPs) вытесняет SF1 и связывается с последовательностью сайта ветвления. АТФ гидролизует, комплекс «Е» становится АТФ-зависимым комплексом «А» (pre-spliceosome) (Guth S., Valcárcel J., 2000).

Комплекс «В» (pre-catalytic spliceosome) формируется, когда тример U5 и U4/U6 мяРНП, связывается с комплексом «А». Этот комплекс можно

рассматривать как сплайсосому, так как содержит в своем составе все компоненты, необходимые для протекания реакции сплайсинга. После экстенсивных конформационных изменений и перестроек комплекс «В» превращается в каталитически активный комплекс С (catalytic spliceosome) (Chen M., Manley J.L. 2009). U6 занимает позицию U1, а U1 и U4 уходят. Оставшийся комплекс претерпевает 2 реакции переэтерификации.

С химической точки зрения, сплайсинг представляет собой реакцию трансэтерификации: связь в действительности переносится с одного положения в другое. На первом этапе происходит нуклеофильная атака 2'-ОН группой инвариантного А (расположенного в сайте разветвления) на 5'-сайт сплайсинга (фосфодиэфирная связь). На втором этапе свободная 3'-ОН группа экзона 1, высвободившегося в результате первой реакции, атакует связь в 3'-сайте сплайсинга (Льюин Б., 2011). При разрезании в 3'-сайте сплайсинга высвобождается интрон, имеющий форму лассо, а правый экзон сшивается (сплайсируется) с левым экзоном. После этого лассо разворачивается, интрон приобретает линейную форму и быстро деградирует. (Black D.L., 2003; Cheng Z., Menees T.M., 2011).

Восемь изоформ молекулы CD45 формируются благодаря альтернативному сплайсингу гена *Ptprc*, кодирующего трансмембранную тирозиновую протеинфосфатазу (Heyd F. et al., 2006; Litvinova L.S. et al., 2013). Альтернативный сплайсинг CD45 по-разному регулируется в зависимости от типа клеток, стадий развития, и в ответ на сигнализацию, такую как рецептор-опосредованную антигенную сигнализацию (Martinez N.M., Lynch K.W., 2013). Контроль происходит с помощью изменения концентрации регуляторных белков (Stamm S., 2002).

Существуют противодействующие классы факторов, которые регулируют протекание сплайсинга. Многочисленные свидетельства того, что эти факторы участвуют во многих вариантах сплайсинга, привело к разработке простой модели альтернативного сплайсинга (Fu X.D., 2004). В этой модели, использование сайта сплайсинга определяется количеством положительно действующих сайтов (усилителей сплайсинга, которые связаны с белками SR) и отрицательно действующих сайтов (глушителей сплайсинга связанные с hnRNPs). Когда

положительных сайтов больше, чем отрицательных, сплайсинг происходит; когда отрицательные сайты преобладают, сплайсинг приостанавливается. Хотя эта модель утешает своей простотой и имеет некоторую прогностическую ценность, это значительно уменьшает биохимическую сложность регулирования сплайсинга (Zhang X.H. et al., 2009; Grigoryev Y.A. et al., 2009; Nilsen T.W., Graveley B.R., 2010).

Предполагают, что один из механизмов, регулирующих альтернативный сплайсинг гена *Ptprc* основан на противоположном действии факторов: сплайсинга *U2af114* (*U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1-like 4, U2af114*) и транскрипции *Gfi1* (*growth factor independent 1*), что, в конечном итоге, определяет образование разных изоформ молекулы CD45 и активацию Т-клеток во время иммунного ответа (Heyd F. et al., 2006; Litvinova L.S. et al., 2013). В частности, *U2AF26* индуцирует пропуск экзонов в CD45 пре-мРНК, стимулируя, таким образом, образование изоформы CD45RO, в то время как *Gfi1* противодействует этому эффекту и способствует формированию изоформ CD45 более высокого молекулярного веса (Heyd F. et al., 2006).

Ген *U2af114* кодирует фактор сплайсинга *U2AF26* – белок массой 26-кДа с 76% сходством в последовательности с родственным *U2* - небольшим ядерным рибонуклеопротеиновым вспомогательным фактором 35 (*U2AF35*) (Shepard J. et al., 2002; Didych D.A. et al., 2011), который кодируется *U2af1*. *U2AF35* и *U2AF26* содержат два цинковых пальца, но только *U2AF35* несет аргинин-серин богатые домены и глициновую растяжку на С-конце. *U2AF26* и *U2AF35* могут взаимодействовать с *U2AF65* и принимать участие в сплайсинге (Graveley B.R. et al., 2001; Shepard J. et al., 2002), в частности, за счет формирования связи с динуклеотидом AG в 3'-сайте сплайсинга, способствуя тем самым сбору сплайсосомы (Wu S. et al., 1999; Heyd F. et al., 2006). К одной из основных функций фактора сплайсинга *U2AF26* относится способность регулировать формирование изоформ мРНК CD45 за счет исключения экзонов, в частности экзона В (Экзон 5). С увеличением количества *U2AF26*, экспрессия изоформ CD45RBC и CD45RB снижается и изменяется отношение CD45RB к CD45RO, преимущественно, в сторону низкомолекулярной изоформы - CD45RO. Параллельно с *U2AF26*-опосредованным пропуском экзона В, экспрессируется изоформа CD45RAB,

исключая возможность неспецифического подавления образования изоформ с высоким молекулярным весом.

Ген *Gfi1* кодирует небольшой, около 55 кДа, ядерный белок – Gfi1, который функционирует как репрессор транскрипции ДНК. Gfi1 взаимодействует с рядом гистонов, модифицируя ферменты (Zweidler-Mckay P.A. et al., 1996; Duan Z. et al., 2005; Saleque S. et al., 2007). Эти ферменты и Gfi1 являются частью более крупного белкового комплекса, который связывается с конкретной областью промотора, определенного сайта связывания Gfi1. Образование комплекса Gfi1 с конкретными целевыми промоторами генов приводит к транскрипции глушителей в этом локусе (Möröy T., Khandanpour C., 2011). Исследования дефицитных по Gfi1 мышей показали, что Gfi1 играет важную роль в активации периферических зрелых Т-клеток. В состоянии покоя, Gfi1 экспрессируется на низких уровнях в зрелых Т-клетках, выделенных из селезенки или лимфатических узлов. После антигенной стимуляции, экспрессия Gfi1 индуцируется на уровне, необходимом для защиты как CD4- и CD8-позитивных клеток от активационно-индуцированной клеточной гибели. Потеря экспрессии Gfi1 зрелыми CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитами ассоциирована с апоптозом после антигенной стимуляции (Pargmann D. et al. 2007).

Анализ гена *Gfi1* у дефицитных мышей позволил определить роль Gfi1 в IL-7 зависимой передаче сигналов и экспрессии рецептора IL-7. Отсутствие гена *Gfi1* коррелирует с утратой IL-7 опосредованного ответа, что ассоциировано с отсутствием фосфорилирования STAT5. Более детальный анализ показал, что JAK ингибитор – SOCS3 положительно регулируется в Gfi1 нулевых клетках, что в свою очередь, приводит к нарушению фосфорилирования STAT5. Кроме того, соединение Gfi1 было обнаружено вдоль PU.1 сайта связывания в интроне рецептора IL-7, что возможно, определяет участие Gfi1 в регуляции экспрессии IL-7R (Chandele A. et al., 2008). В другом исследовании было отмечено, что потеря Cdc42 (cell division control protein 42) приводит к повышению активности *Gfi1* а это, в свою очередь, вызывает репрессию гена IL-7R (Guo F. et al., 2010). Потеря Cdc42 связана с уменьшением количества зрелых Т-клеток на периферии, а на молекулярном уровне, ассоциировано с повышенной экспрессией Gfi1. Более высокие уровни Gfi1 связаны с более низкой экспрессией IL-7R (Möröy T., Khandanpour C., 2011).

*Gfi1* является важным регулятором процессов созревания и дифференцировки CD4 / CD8 *c-Kit*<sup>+</sup> предшественников Т-клеток. У мышей, лишенных *Gfi1*, снижена клеточность в тимусе из-за повышенной клеточной гибели, отсутствия пролиферации и дифференцировки незрелых CD4 - / CD8 - / *c-Kit*<sup>+</sup> цитокин-зависимых предшественников Т-клеток. Кроме того, у *Gfi1*-дефицитных мышей обнаружена повышенная экспрессия главного комплекса гистосовместимости I класса, что приводит к дифференцировке, преимущественно, CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Эти данные свидетельствуют о важной роли *Gfi1* в нормальной дифференцировке CD4 / CD8 клонов Т-клеток (Yücel R. et al., 2003).

В работе Heyd F. И соавт. (2006) был предложен ранее неизвестный механизм регуляции альтернативного сплайсинга гена *PTPRC*. В этой модели, фактор сплайсинга U2AF26 и транскрипционный фактор *Gfi1* антагонистически действуют в процессе альтернативного сплайсинга *Ptprc* и либо индуцируют, либо ингибируют образование изоформы CD45RO и, как следствие, регулируют антиген-зависимую активацию Т-клеток. Взаимодействие между *Gfi1* и U2AF26 подтверждается ко-иммунопреципитацией эндогенных белков ядерных экстрактов клеточной линии Jurkat. Иммунопреципитация свидетельствует о взаимодействии глутатион S-трансферазы (GST) - *Gfi1* гибридного белка с U2AF26. Очищенные GST-G *Fi1* и GST-U2AF26 взаимодействуют в присутствии РНКазы без учета косвенного, РНК-опосредованного комплекса. Кроме того, иммунофлуоресцентный анализ показал совместную локализацию обоих белков в ядрах трансфецированных клеток. Следовательно, прямое взаимодействие белков необходимо для противодействия *Gfi1* пропуску экзонов *PTPRC*, опосредованному U2AF26. Возможно, физическое связывание U2AF26 с *Gfi1* блокирует фактор сплайсинга, останавливая на начальных этапах формирование сплайсосомы, тем самым, изменяя результат процессов сплайсинга (Heyd F. et al., 2006).

Таким образом, альтернативный сплайсинг является основным механизмом регуляции экспрессии генов, позволяющий получить несколько уникальных мРНК из одного гена с помощью избирательного включения или исключения экзонов. В процессе дифференцировки Т-клеток памяти важная роль принадлежит альтернативному сплайсингу гена *Ptprc*, кодирующего трансмембранную тирозинфосфатазу CD45.

### 1.3. Краткая характеристика теломер и фермента теломеразы

Теломеры - концевые участки линейной молекулы ДНК, которые состоят из повторяющейся последовательности нуклеотидов. Они «опечатаывают» концы хромосом, поддерживая стабильность генома. Одноцепочечный концевой выступ теломерной ДНК производит замещение гомологичного участка в вышележащем дуплексе, и свободные концы хромосомной ДНК оказываются спрятанными в составе образовавшейся петли. Отсутствие свободного конца ДНК, защищает линейные концы хромосом эукариот от деградации и слияния. Теломеры выполняют важные биологические функции, участвуя в полной репликации хромосом и их функциональной внутриядерной организации, а также регулируя экспрессию генов (Gerbi, S.A., 2015).

В 1971 году российский ученый Алексей Матвеевич Оловников впервые предположил, что при каждом делении клеток концевые участки хромосом укорачиваются. Причина этого явления неполная репликация концов хромосом из-за особенностей молекулярного механизма репликативного синтеза ДНК (Оловников А.М., 1971; Watson J.D., 1972). Предполагают, что укорачивание хромосом до определенного размера индуцирует процессы клеточного старения. (Allsopp R.C. et al., 1992; Barrett J.H. et al., 2015).

Пролиферативная активность клеток в культуре и тканях ограничена, всего 50-70 клеточных делений, а длина теломер в человеческом организме составляет приблизительно 5-10 т.п.о. Когда теломеры достигают критической длины, клетка входит в стадию клеточного старения и теряет пролиферативные свойства (Levy M.Z. et al., 1992; d'Adda di Fagagna F. et al., 2003). Согласно этим представлениям, длина теломер может служить мерой пролиферативного потенциала клеток (Allsopp R.C. et al., 1992).

1985 г. Грейдер и Блэкборн обнаружили фермент – теломеразу, который способен достраивать недореплицированные участки ДНК (Greider C.W., Blackburn E.H., 1985). Теломеразы являются рибонуклеиновыми ферментами, специализированной разновидностью обратной транскриптазы, синтезирующими ДНК на матрице РНК. Теломераза состоит из РНК-прайма и каталитически-активного белка. РНК-компонент (TER – telomerase RNA) содержит

последовательность 15-22 оснований, идентичную двум повторам G-богатой цепи. РНК является матрицей для синтеза G-богатой повторяющейся последовательности теломерной ДНК. Белковый компонент теломеразы – это каталитическая субъединица (TERT – telomerase reverse transcriptase), функционирующая как ДНК-полимераза при использовании РНК-матрицы. Теломеразный комплекс состоит из целого ряда вспомогательных компонентов. Они поддерживают функциональную активность теломеразы *in vivo*. Белки, входящие в комплекс, отвечают за посадку теломеразы на теломеры в конкретный момент клеточного цикла (Osterhage J.L. et al., 2006), регуляцию активности (Hsu M. et al., 2007), а также они необходимы для создания теломеразного комплекса и для деградации его компонентов (Collins K. 2006).

Субстратами для теломеразы служат дезоксинуклеотид-5'-трифосфаты и 3'-конец теломеры. Реакцию теломеразы можно описать следующими стадиями: связывание праймера, элонгация, транслокация, и диссоциация (Зверева М.Э., 2010). РНК-матрица устанавливается на ДНК-затравку, каталитическая субъединица добавляет к затравке нуклеотиды и затем фермент перемещается вдоль субстрата (Льюин Б., 2011). Теломераза синтезирует добавочные повторы по отдельности, по одному на шаг и может добавлять несколько теломерных повторов за один акт присоединения к олигонуклеотидному субстрату (Зверева М.Э., 2010).

Активность теломеразы строго регулируется в процессе развития. В большинстве соматических клеток активность теломеразы снижается во время эмбриональной дифференцировки, но клетки некоторых типов тканей, такие как мужские половые клетки, активированные лимфоциты и некоторые виды стволовых клеток, сохраняют теломеразную активность (Kim N.W. et al.1994; Wright W.E. et al., 1996; Shay J.W., Bacchetti S., 1997;Prescott J. et al., 2012). Эта активность необходима для поддержания пролиферативного потенциала клетки, для того чтобы замедлить, но не предотвратить укорочение теломер. Во время роста и развития организма, активность теломеразы регулируется, сохраняя барьеры (старение) предотвращающие развитие опухоли (Arish N. et al., 2015).

Вопросы изучения теломер и регуляции активности теломеразы в изданиях научной периодики представляют большой интерес в контексте изучения

патогенеза разных заболеваний, в том числе, опухолевых, аутоиммунных и др. (Yokoi S. et al., 2003; Cao Y. et al., 2008; Koh C.M. et al., 2015).

В настоящее время, накопленные знания используют, в том числе, для изучения закономерностей функционирования иммунокомпетентных клеток.

### **1.3.1. Роль теломеразы в пролиферативном гомеостазе Т-клеток**

При антигензависимом прайминге, в ходе иммунного ответа, наивные Т-клетки приобретают специализацию и подвергаются пролиферации, что приводит к экспансии антиген-специфических Т-клеток. Во время клональной экспансии происходит активация теломеразы, которая поддерживает длину теломер. После *фазы экспансии*, 90% активированных клеток погибает путем апоптоза, сохраняется лишь небольшой пул Т-клеток памяти. Клетки иммунной памяти сохраняют репликативные свойства, хотя и на более низком уровне (Akbar A.N. et al., 2007). Известно, что популяции Т-клеток памяти, как CD4<sup>+</sup> так и CD8<sup>+</sup>, имеют более короткие теломеры, чем наивные Т-клетки-предшественницы (Weng N.P. et al., 1996; Fletcher J.M. et al., 2005; Plunkett F.J. et al., 2005; Yang L. et al., 2012) Многочисленными исследованиями показано, что потеря теломер у пациентов с Х-сцепленным лимфопролиферативным синдромом может быть связана с повторной активацией специфических Т-клеток (Engel P. et al., 2003). У этой категории лиц цитотоксические (CD8<sup>+</sup>) Т-клетки имеют короткие теломеры, соответствующие длине теломер пожилых людей. Ученые предполагают, что эрозия теломер связана с чрезмерной пролиферацией, а не с процессами старения (Plunkett F.J. et al., 2005).

Аналогичные изменения регистрируются у больных ВИЧ-инфекцией (Effros R.V. et al., 1996) и ревматоидным артритом (Wagner U. et al., 2004). Повторная активация приводит к формированию высоко дифференцированных клеток памяти, которые теряют способность повышать уровень теломеразы и имеют более короткие теломеры. Тем не менее, клетки еще способны пролиферировать. При каждой следующей активации, экспансия клеток памяти приводит к их репликативному старению.

Несмотря на то, что высокая активность теломеразы предотвращает эрозию теломер при первичном инфицировании, в специализированных Т-клетках

сокращение теломер регистрируется через 15 месяцев (Plunkett F.J. et al., 2001). При повторяющихся стимулах, Т-клетки постепенно теряют способность индуцировать активность теломеразы, что свидетельствует об изменении регуляции активности теломеразы в процессе клеточной дифференцировки (Plunkett F.J. et al., 2001). Скорость истощения теломер во время Т-дифференцировки и деления клеток в естественных условиях, неизвестна. Культура первичных Т-клеток *in vitro* позволяет оценить число делений и, соответственно, дает возможность оценивать истощение теломер в зависимости от числа делений. Такие наблюдения за долгосрочными культурами показали, что потеря длины теломер не является линейной функцией деления клеток. В начале эксперимента, укорочение теломер минимально, в то время как на более поздних сроках жизни культуры степень сокращения длины теломер становится все более очевидной. Это поднимает вопрос о том, как длина теломер регулируется и поддерживается в Т-клетках (Li Y. et al., 2005).

Важность репликации для лимфоцитов позволяет предположить, что они могут использовать механизмы для поддержания длины теломер. Исследования экспрессии теломеразы в Т-клетках показали, что ее активность высока во время развития и дифференцировки клеток. Во время развития Т-клеток в тимусе, высокий уровень активности TERT был обнаружен во всех субпопуляциях тимоцитов. Однако незрелые CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> и CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> популяции имеют более высокий уровень активности теломеразы, чем зрелые тимоциты (либо CD4<sup>+</sup>, либо CD8<sup>+</sup>). На периферии в зрелых покоящихся наивных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитах, теломераза практически неактивна. При стимуляции Т-клеток активность теломеразы резко возрастает. В CD4<sup>+</sup> Т-клетках активность фермента была обнаружена через 12-16 часов после стимуляции, достигала своего пика на 3-5 день и постепенно снижалась на 15-30 день. Повторная стимуляция клеток приводила к повышению активности теломеразы, но уровень ее активности был значительно ниже, чем индуцированный первичной стимуляцией. Дальнейшее стимулирование клеток привело к еще большему снижению активности фермента. Эта картина экспрессии теломеразы коррелирует с характером истощения теломер в долгосрочной культуре клеток, т.е. длина теломер стабильна до тех пор, пока

сохраняется высокая активность фермента, в то время как уменьшение длины теломер сопряжено со снижением ферментативной активности (Weng N.P. 2002).

Доказано, что Т-клеточная дифференциация и последовательная потеря костимуляционных и хемокиновых рецепторов CD27, CD28 и CCR7, сопровождается уменьшением длины теломер (Akbar A.N., Fletcher J.M. 2005). Так, например, CD4<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> Т-клетки имеют длинные теломеры. Промежуточные стадии – CD4<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD28<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> и CD8<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> имеют среднюю длину теломер, между недифференцированными и высокодифференцированными популяциями. И наконец, у CD4<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> и CD8<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> Т-клеток, в том числе, и у эффекторных клеток памяти, самые короткие теломеры. Также обнаружена соответствующая корреляция между активностью теломеразы со степенью дифференцировки Т-клеток (Fletcher J. M. et al., 2005; Fritsch R.D. et al., 2005).

Отсутствие экспрессии теломеразы ведет к репликативному старению, но возможно ли при повторном введении теломеразы избежать преждевременного старения? В нескольких исследованиях было проведено сравнение репликативного потенциала в *hTERT*-трансдуцированных Т-клетках и клетках родительских форм (Migliaccio M. et al., 2000; Hooijberg E. et al., 2000; Rufer N. et al., 2001; Roth A. et al., 2005). Все данные свидетельствуют о сохранении активности теломеразы в трансдуцированных клетках, в то время как родительская популяция претерпевала апоптотическую гибель. Следовательно, в *hTERT*-трансдуцированных клетках была стабилизирована длина теломер и сохранен пролиферативный потенциал. Но, несмотря на расширенные репликативные способности, трансдуцированные клетки со временем теряют скорость экспансии в связи с накопленными окислительными повреждениями (von Zglinicki T. 2000) или потерей геномной стабильности (Hooijberg E. et al., 2000; Roth A. et al., 2005)

Индукция теломеразной активности связана с экспрессией белка hTERT (Buchkovich K.J., Greider C.W. 1996; Liu K. et al., 1999; Chiba K. et al., 2015; Yoo Y.S. et al., 2015). hTERT является субстратом Akt киназы, которая требует фосфорилирования на двух разных участках для активации (Kang S.S. et al., 1999). Начиная с CD8<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup> уровня дифференцировки Т-клеток, появляется дефект в фосфорилировании Akt-киназы (Plunkett F.J. et al., 2007), что свидетельствует о

том, что регуляция теломеразной активности связана с изменениями в посттрансляционной модификации этого фермента (Plunkett F.J. et al., 2007).

Помимо антиген-зависимой активации Т-клеток, пролиферация может быть индуцирована биологически активными молекулами, в частности, цитокинами. Так, наивные Т-лимфоциты и Т-клетки памяти человека в естественных условиях (*in vivo*) поддерживают свое численное постоянство без антигенной стимуляции, за счет гомеостатической пролиферации, опосредованной наличием в микроокружении цитокинов: IL-2, IL-7 и IL-15 и др. (Geginat J. et al., 2001; Jaleco S. et al., 2003; Huang W., August A., 2015) и зависит от взаимодействия их рецепторных структур с продуктами МНС I (для CD8<sup>+</sup>) и МНС II (для CD4<sup>+</sup>) класса (Geginat J. et al., 2002; Surh C.D., Sprent J. 2005; Krawczyk C.M. et al., 2007; Purton J.F. et al., 2007; Singh M. et al., 2008; Tanel A. et al., 2009).

IL-2 является основным фактором роста Т-клеток, он увеличивает уровень транскрипции *hTERT* в Т-клетках человека. IL-2 способен индуцировать активацию транскрипции промотора *hTERT* в покоящейся Т-клеточной линии; эта активация совпадает с G1 периодом клеточного цикла. IL-7 играет важную роль в гомеостатической регуляции CD4<sup>+</sup> Т-клеток, в то время как IL-15 регулирует экспансию наивных Т-клеток (Wallace D. L. et al., 2006) и Т-клеток памяти (Weng N.P., 2002; Surh C. D., Sprent J. 2005; Li Y. et al., 2005;).

*In vitro*, индукция пролиферации CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток цитокинами IL-7 и IL-15-м, (Wallace D.L. et al., 2006), повышает активность теломеразы (Li Y. et al., 2005), предотвращая эрозию теломер. Установлено, что IL-15 реализует свои эффекты через Jak3 и PI3K (Li Y. et al., 2005). Скорость эрозии теломер в Т-клетках может определяться характером активирующего стимула и тканевой микросреды. IL-2 и IL-15 восстанавливают активность теломеразы в высоко дифференцированных Т-клетках лишь частично, не устраняя вышеуказанные дефекты (Plunkett A. et al., 2007).

Таким образом, сохранение активности теломеразы необходимо для поддержания пролиферативного потенциала клетки, то есть, замедления укорочения теломер. При повторяющихся стимулах, Т-клетки постепенно теряют способность индуцировать активность теломеразы, что свидетельствует об изменении регуляции активности теломеразы в процессе клеточной

дифференцировки. Обнаружена взаимосвязь между активностью теломеразы и степенью дифференцировки Т-клеток.

#### 1.4. Гормональная регуляция иммунной системы

Гормональная система регулирует иммунные процессы, оказывая дозозависимые разнонаправленные эффекты в отношении клеток иммунной системы. Внутриклеточные и мембранные гормональные рецепторы иммунокомпетентных клеток позволяют стероидным гормонам оказывать влияние на пролиферацию, митоз, синтез белка, репликацию нуклеиновых кислот, экспрессию генов, изменения на клеточных мембранах (Феодоритова Е., 2002; Ярилин А.А., 2010; Гуцол А.А. и соавт., 2011).

Важная роль стероидных гормонов принадлежит в регуляции адаптивных иммунных процессов. Уровень стероидных гормонов в организме подвержен значительным колебаниям, которые имеют важное значение в адаптации организма к разного рода воздействиям, включая антигенные (Karagiannidis С. et al., 2004; Sallusto F. et al., 2004; Fedor M.E. et al., 2006; van Mens S.P. et al., 2012). Реализация эффектов стероидных гормонов может проходить через *геномные и негеномные* механизмы, что является определяющим при разнонаправленном действии гормонов на макроорганизм (Wherry E.J. et al., 2003; Fedor M.E. et al., 2006; Gruver-Yates A.L., Cidlowski J.A., 2013; Cheng Q. et al., 2014; Ayroldi E. et al., 2014).

Стероидные гормоны – это жирорастворимые органические соединения полициклической группы. Они широко используются в качестве сигнальной молекулы практически во всех эукариотических клетках. Биологическая роль стероидных гормонов связана с обменом веществ, иммунной функцией, воспроизводством и половыми различиями (Schäcke H. et al., 2002; Maekawa M. et al., 2014). Гормоны этого класса представляют собой липиды с характерным "стероидным скелетом", в основе которого находится стерановое ядро (циклопентанпергидрофенантрен), образованное тремя насыщенными шестичленными кольцами (обозначают латиницей: А, В и С) и одним насыщенным

пятичленным кольцом (D). Модификаций стеранового скелета определяют свойства гормонов стероидного класса (Розен В.Б., 1994).

Стероидные гормоны подразделяются на подгруппы, включая глюкокортикоиды, минералокортикоиды, эстрогенов, андрогенов и прогестогены (Beato M., Klug J., 2000). Все классы стероидных гормонов производные холестерина, структурного компонента мембраны, посредством сложных путей биосинтеза, которые иницируются специализированными тканевыми ферментами, найденные в митохондриях (Miller W.L., 2013). Основным источником холестерина – циркулирующие в крови липопротеины. Кроме этого, в коре надпочечников холестерин образуется из ацетил-коэнзима А. (Камкин А. и соавт., 2004).

Синтез стероидных гормонов проходит в коре надпочечников под влиянием кортикотропина и в половых железах стимулированных лютропином. Эти гормоны ответственны за регуляцию транспорта эфиров холестерина, активности холестеролэстеразы, митохондриальных ферментов (Чиркин А.А., 2002).

Важный этап биосинтеза стероидных гормонов проходит в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме. Ферменты, участвующие в стероидогенезе, находятся именно в них. Митохондрии в клетках стероидогенеза надпочечников, половых желез, плаценты и мозга содержат систему фермента (P450<sub>sc</sub>, ферредоксинредуктаза и ферредоксин), который преобразует холестерин в прегненолон и определяет объемы стероидогенеза, регулируя хронический стероидогенез. (Miller W.L., Auchus R.J. 2011; Miller W.L., Bose H.S., 2011). P450<sub>sc</sub> расщепляет 20, 22 связи нерастворимого холестерина и формирует растворимый прегненолон. Прегненолон затем может быть превращен в прогестерон по 3 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы (3 $\beta$ HSD), который может быть найден как в митохондриях и в ЭР (Miller W.L. 2013). 3 $\beta$ HSD преобразует D5 стероиды (прегненолона, 17ОН-прегненолон, ДГЭА), имеющие двойную связь в В кольце к D4 стероидам, имеющим двойную связь в А кольце (Miller W.L., Auchus R.J. 2011; Miller W.L., Bose H.S., 2011). После действия 3 $\beta$ HSD и P450<sub>c17</sub>, P450<sub>c21</sub> катализирует 21-гидроксилирование глюкокортикоидов и минералокортикоидов.

P450<sub>c11 $\beta$</sub>  катализирует 11 $\beta$ -гидроксилирование 11-дезоксикортизола для формирования кортизола, и P450<sub>c11AS</sub> катализирует 11 $\beta$ -гидроксилирование, 18-

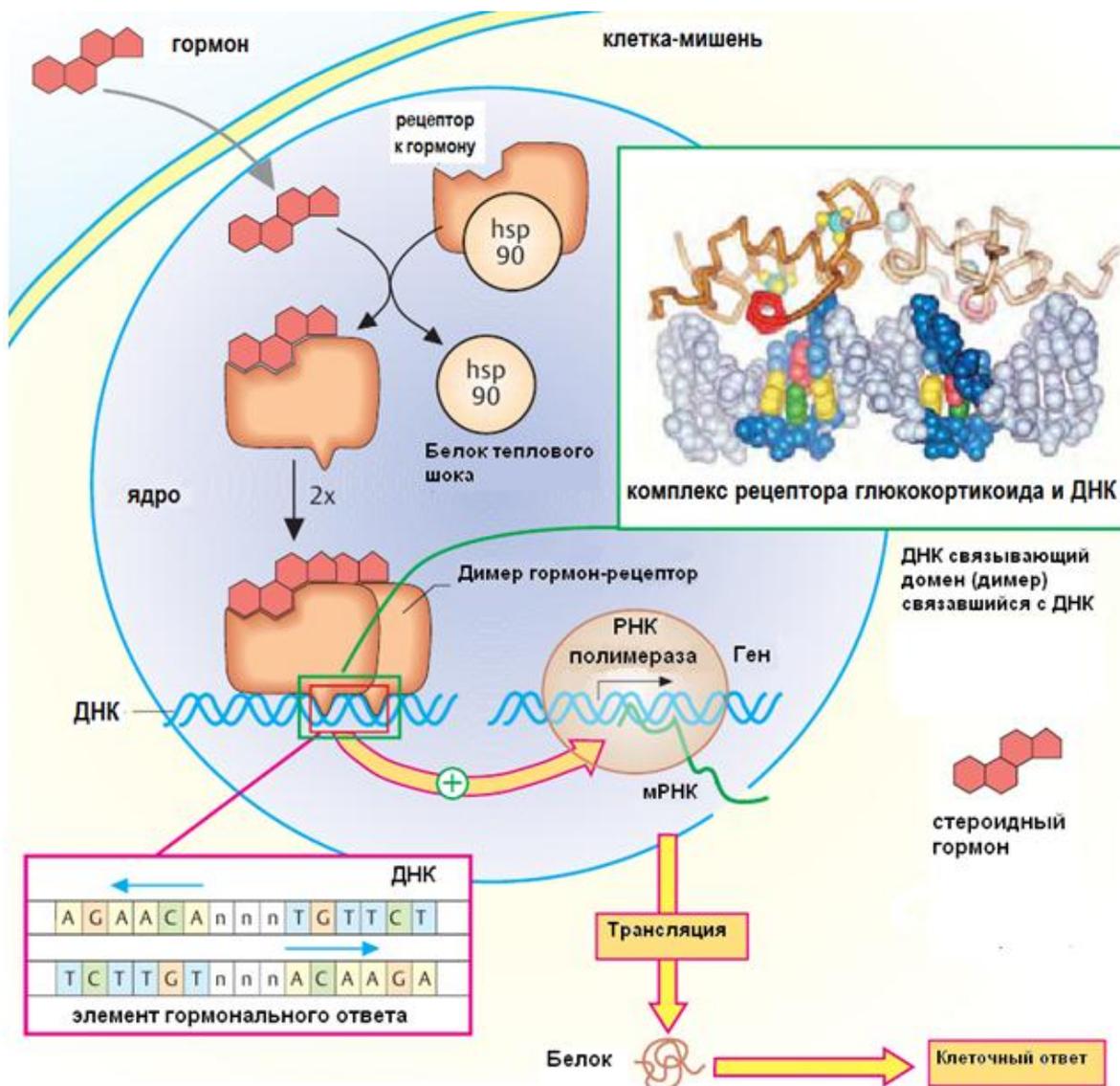
гидроксилирование и 18-метил окисление для преобразования дезоксикортистерон для альдостерона. (Miller W.L. 2013). Тестостерон может быть преобразован в 5 $\alpha$ -дигидротестостерона (5 $\alpha$ -ДГТ) с помощью фермента 5-альфа-редуктазы (SRD5a1, SRD5a2, SRD5a3) или 5b-дигидротестостерон (DHT-5b) с помощью фермента 5b-редуктазы (Langlois V.S. et al., 2009). 17 $\beta$ -эстрадиол (E2) и эстрон синтезируются с помощью фермента ароматазы (CYP19) (Duarte-Guterman P., 2014; Koolman J. et al., 2005). Стероидные гормоны в отличие от пептидных не накапливаются в клетке. В результате специфической стимуляции железы, продуцирующей стероиды, в ней индуцируется энзиматический синтез гормона вплоть до образования его активной формы (Камкин А. и соавт., 2004).

Поскольку стероиды имеют липофильную природу, они легко диффундируют через клеточные мембраны, и, следовательно, имеют очень большой объем распределения. В тканях-мишенях, стероиды концентрируются благодаря их высокой специфичности к внутриклеточным рецепторам (**рисунок 7**). Стероиды имеют как краткосрочные и долгосрочные эффекты. Долгосрочные эффекты (продолжительностью от нескольких часов до нескольких дней), как правило, связаны с взаимодействием гормона со специфическим рецептором. Комплекс стероид-рецептор связывается с восприимчивыми к гормону элементами на хроматине, регулируя транскрипцию генов (Muñoz-Cruz S. et al., 2011). Гены стероидных рецепторов экспрессируются только в тканях-мишенях, способствуя накоплению гормона в ядре клетки и облегчая диффузию стероида в клетки-мишени по закону действующих масс. Этот метод клеточной активации, называют геномным действием. Не геномный эффект гормона заключается в действии на клетки-мишени без непосредственного вовлечения транскрипции гена, например быстрый стероидный эффект на электрическую активность нервных клеток. (Samrana A., 2014) В отличие от геномных эффектов, не геномные эффекты требуют постоянное присутствие гормона.

Реакция клеток на воздействие половых гормонов является результатом специфического связывания гормона с рецептором. Липофильный характер стероидных гормонов позволяет им диффундировать через клеточную мембрану и связываться с внутриклеточными рецепторами (**рисунок 7**). Наличие рецепторов

стероидных гормонов на иммунных клетках (Muñoz-Cruz S. et al., 2011) указывает на участие стероидных гормонов в регуляции иммунной системы.

Основные медиаторы стероидных эффектов внутриклеточные рецепторы. Рецепторы эстрогена (ERs) включают два подтипа, ER-альфа и ER-бета, каждый кодируется различными генами с преобладанием лиганда 17-эстрадиола.



**Рисунок 7.** Механизм действия липофильных гормонов (адаптировано из Koolman J., Roehm K.H., 2006).

Рецепторы прогестерона (PRs) имеют две изоформы, PR-A и PR-B, кодируемые тем же геном, что и основной лиганд прогестерона. Андрогенные рецепторы (ARS) кодируются геном лигандов тестостерона и дигидротестостерона (DHT) (Nava-Castro K. 2012). В популяции лимфоцитов, ERs были обнаружены

только в Т-клетках супрессорных и цитотоксических популяциях в то время как хелперные лимфоциты не показали специфического связывания стероидов, возможно в связи с отсутствием рецепторов к стероидным гормонам. С другой стороны, мРНК ERs присутствует в обеих группах Т-лимфоцитов (Benten W.P. et al., 2002; Boulware M.I. et al., 2005). ERs способны связываться с Src киназой через высоко консервативный домен SH2, изменяя картина фосфорилирования нескольких транскрипционных факторов (Auricchio F., 2008). На Т-лимфоцитах, так же были обнаружены три рецептора PRs (mPRs), mPR- $\alpha$ , mPR- $\beta$ , and mPR- $\gamma$  (Dosiou C. et al., 2008). Не геномный эффект тестостерона на Т-клетки определяется наличием поверхностных рецепторов. Тестостерон взаимодействуя с рецепторами на поверхности Т-лимфоцитов вызывает быстрый рост  $[Ca^{2+}]^i$ , способствуя активации клеток. (Nava-Castro K. 2012)

Комплекс рецептора с гормоном транслоцируется в ядро клетки и, являясь фактором транскрипции, регулирует экспрессию генов, которые содержат сайт связывания комплекса в области промотора (Beato M., Klug J. 2000). Эффекты стероидных гормонов на продукцию цитокинов опосредуется ядерным фактором- $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ). Этот фактор индуцирует транскрипцию и позитивно регулирует экспрессию проиммунных и провоспалительных генов. Комплекс стероид-рецептор может физически взаимодействовать с NF- $\kappa B$  и ингибировать его активность (Bohman A. et al., 2005). Через этот механизм эстрогены, прогестерон и тестостерон могут препятствовать экспрессии провоспалительных цитокинов иммунными клетками с соответствующими рецепторами.

Глюкокортикоиды и минералокортикоиды являются стероидными гормонами секретируется в коре надпочечников, но могут также быть синтезированы локально в различных других тканях, в том числе первичных лимфоидных органах, кишечнике, коже, головном мозге. Локально синтезированные глюкокортикоиды регулируют активацию клеток иммунной системы, в то время как локально синтезированные минералокортикоиды регулируют объем крови и давление. Глюкокортикоиды могут индуцировать апоптоз лимфоцитов, и этот эффект особенно выражен у незрелых лимфоцитах. Тем не менее, глюкокортикоиды могут также ингибировать TCR-опосредованный апоптоз и способствовать выживанию, участвуя в дифференцировке тимоцитов.

(Iwata M., 1991; Taves M.D. et al., 2011). Сигнализация TCR индуцирует апоптоз тимоцитов со средним или высоким сродством TCR, глюкокортикоиды антагонистически влияют на проапоптотические сигналы, способствуя выживанию тимоцитов со средним или высоким сродством TCR (Vacchio M.S. et al., 1994). Несвязанный GR способен взаимодействовать с киназами TCR, облегчая передачу сигналов TCR, в то время как связывание глюкокортикоидов вызывает диссоциацию комплекса и ингибирование передачи сигналов TCR (Löwenberg M. 2005; Löwenberg M. et al., 2006; Taves M.D. et al., 2011). Стимуляция Т-клеток или макрофагов приводит к секреции TNF $\alpha$ , и опосредованного с воспалением повреждению кишечного эпителия (Taves M.D. et al., 2011). TNF $\alpha$  опосредованно приводит к увеличению производства глюкокортикоидов и повышенной пролиферации эпителиальных клеток (Noti M. et al., 2010; Noti M., Corazza N. et al., 2010). Вместе эти процессы могут подавлять воспалительный иммунный ответ и опосредовать восстановление воспалительных повреждений (Taves M.D. et al., 2011)

Стероидные гормоны оказывают мощное воздействие на восприимчивость и прогрессирование многочисленных аутоиммунных заболеваний у человека. Это связано с прямыми иммунологическими эффектами стероидных гормонов, которые влияют на иммунную систему. Эстрогены способны угнетать функции Т-клеток в зависимости от заболевания, но так же могут повысить выработку антител и усугубить заболевания, ассоциированные с В клетками. Андрогены подавляют Т-клеточный и В-клеточный иммунный ответ, и могут привести к подавлению заболевания (Da Silva JA., 1999).

Важная роль стероидных гормонов принадлежит регуляции адаптивных иммунных процессов. Уровень стероидных гормонов в организме подвержен значительным колебаниям, которые имеют важное значение в адаптации организма к разного рода воздействиям, включая антигенные (Karagiannidis C. et al., 2004; Sallusto F. et al., 2004; Fedor M.E. et al., 2006; van Mens S.P. et al., 2012).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Система иммунитета - открытая система, для которой характерна сложная ауторегуляция и быстрая модуляция функций. Системные реакции на глюкокортикоиды, развитие иммунитета в онтогенезе, системные реакции на стресс и другие гормональные перестройки, адаптивные реакции, развитие многих патологических процессов (иммунодефициты, аутоиммунные заболевания) прямо или опосредованно связаны с лимфоэндокринными взаимодействиями. Вероятно, что действие стероидных гормонов на Т-клетки носит дозозависимый характер, определяется типом клеток-мишеней и их функциональным статусом (степенью дифференцировки, функциональной активностью, состоянием рецепторного аппарата клетки). Альтернативный сплайсинг является ключевым этапом формирования всего разнообразия белков организма. Многие гены, относящиеся к функционированию иммунной системы, также подвергаются альтернативному сплайсингу. Ключевым событием в процессе дифференцировки Т-клеток памяти признана реорганизация молекул пре-мРНК гена *Ptprc*, кодирующего трансмембранную тирозин-фосфатазу CD45, которая присутствует на поверхности Т-лимфоцитов. Выявлено, что альтернативный сплайсинг CD45 регулируется совместными действиями факторов: U2AF26 (U2af114) и Gfi1 (Gfi1): U2AF26 инициирует формирование CD45RO, в то время как Gfi1 является его антагонистом, и, непосредственно взаимодействуя с U2AF26, приводит к формированию промежуточных форм белка CD45, в частности CD45RB. Предполагают, что антагонистические взаимодействия этих факторов могут определять соотношение вариантов рецептора CD45, регулирующего активность Т-клеток во время иммунного ответа. Кроме того, в контексте изучаемой тематики особого внимания заслуживает исследование функциональной активности фермента теломеразы.

Выявление механизмов, характеризующих иммунорегуляторные эффекты стероидных гормонов на процессы дифференцировки и созревания Т-лимфоцитов, могут иметь важное фундаментальное значение для понимания ключевых интегративных адаптационных механизмов, ответственных за сохранение внутренней среды многоклеточного организма.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Объект и материал исследования

В основу работы положены результаты комплексного исследования 120 условно 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 явились первичные культуры CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (n=120), полученные из взвеси мононуклеарных лейкоцитов (МНК) условно здоровых доноров. МНК выделяли из венозной крови, взятой из локтевой вены (20 мл) с помощью стандартных вакуумных систем "BD VACUTAINER TM" («Greiner-bio-one», Австрия) с гепарином (20 Ед/мл).

Разрешение на проведение диссертационного исследования получено в локальном этическом комитете (*регистрационный №5 от 05 ноября 2013 г.*). Все экспериментальные исследования проводились на базе лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И.Канта (зав. лабораторией – д-р мед. наук, Л.С. Литвинова).

### 2.2. Методы исследования

В соответствии с поставленными целью и задачами исследования, нами был предложен алгоритм экспериментального блока, позволяющий оценить дозозависимое влияние стероидных гормонов (*дексаметазона, β-эстрадиола и тестостерона*) на функциональную активность наивных Т-лимфоцитов (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>).

Дизайн исследования схематично представлен на рисунке 8.

## ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ

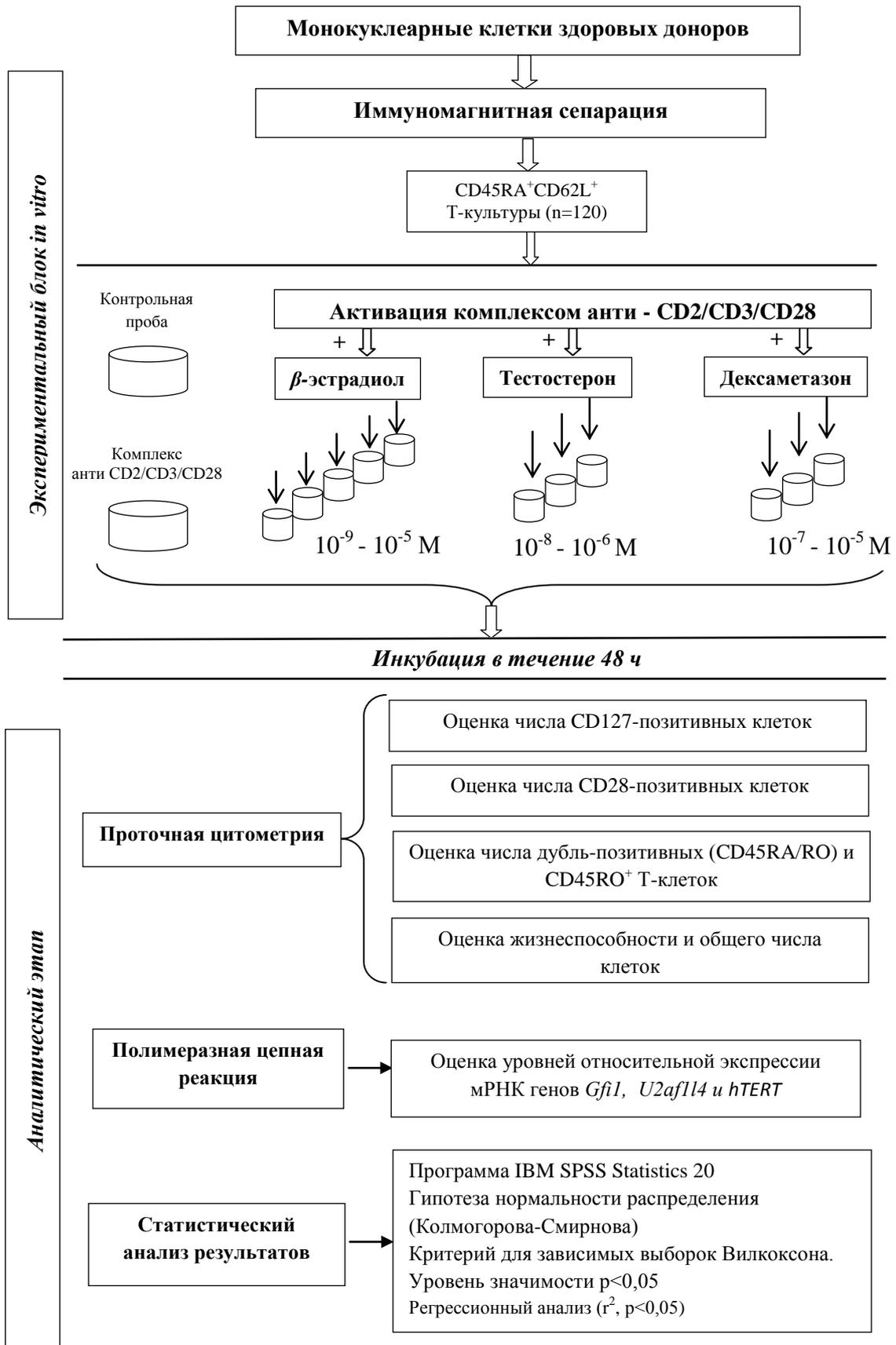


Рисунок 8. Схема дизайна исследования.

В своей работе мы использовали *активационную модель*, которая отражает процесс взаимодействия Т-лимфоцитов разной степени дифференцировки с антиген-презентирующими клетками (АПК) (активация Т-клеток через *CD2, CD3 и CD28*)

### **2.2.1. Выделение мононуклеарных лейкоцитов из периферической крови**

Выделение мононуклеарных лейкоцитов из периферической крови осуществляли стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографин («Pharmacia», Швеция) ( $\rho=1,077 \text{ г/см}^3$ ). Венозную гепаринизированную кровь (20 ЕД/мл) смешивали с 0,9% физ. раствором (NaCl) в соотношении 1:1. Полученную разведенную кровь наслаивали на градиент фиколл-урографина ( $1,077 \text{ г/см}^3$ ) в соотношении 1:3 и центрифугировали при 1500 об/мин 45 мин на мультифункциональной центрифуге с охлаждением Thermo Jouan CR3i (Thermo Fisher Scientific, США). Образовавшееся интерфазное кольцо из мононуклеарных клеток собирали автоматической пипеткой с раздела фаз в стерильную пробирку и дважды отмывали 0,9% раствором NaCl, последовательно ресуспендируя и центрифугируя каждый раз в течение 15 мин при 1500 об/мин. Тщательно слив надосадочную жидкость, 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  $CD45RA^+CD62L^+$  и  $CD45RO^+$  Т-лимфоцитов.

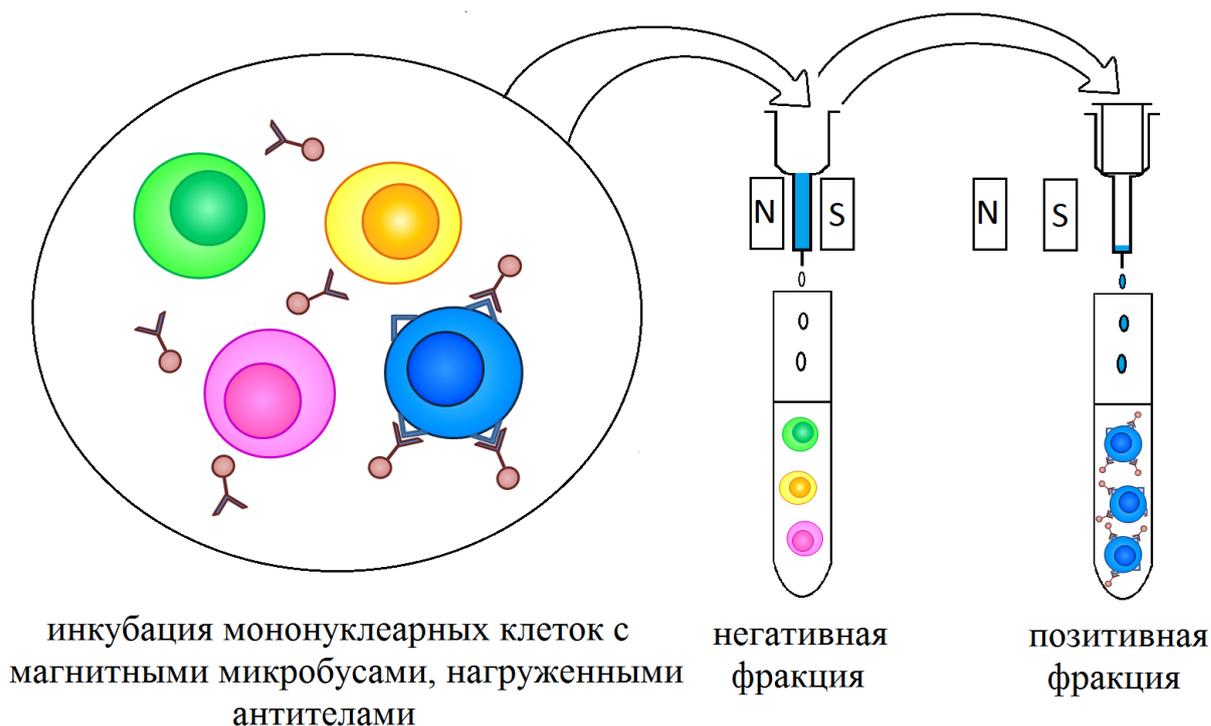
### **2.2.2. Выделение наивных ( $CD45RA^+CD62L^+$ ) Т-лимфоцитов из фракции мононуклеарных лейкоцитов методом иммуномагнитной сепарации.**

**Принцип метода:** Для получения монокультур наивных Т-клеток ( $CD45RA^+CD62L^+$ ) из взвеси МНК, был использован метод иммуномагнитной сепарации (ИМС), в основе которого лежит технология MACS® («Miltenyi Biotec» Германия), основанная на использовании суперпарамагнитных частиц MACS MicroBeads, конъюгированных с высокоспецифичными моноклональными антителами (МАТ). Добавленные к взвеси клеток MicroBeads, в течение короткого промежутка времени связываются с их мембранами, несущими соответствующие

рецепторы к антителам. Диаметр частиц значительно меньше порога разрешения светового микроскопа и составляет около 50 нм.

MACS MicroBeads биodeградируемы и не вызывают реакции со стороны клеток. Колонки MACS, заполненные не токсичным для клеток ферромагнитным матриксом, помещённые в сепаратор MACS, позволяют генерировать сильное магнитное поле для фиксации клеток, нагруженных MicroBeads, сохраняя их жизнеспособность. Клетки, не связавшие MicroBeads, удаляются промыванием колонки буфером, как **негативная фракция**. Это процедура представляет собой **негативную селекцию**.

После изъятия колонки из магнитного поля, с помощью поршня, под давлением столба жидкости (MACS-буфер) элюируется высокообогащённая фракция клеток, связавших магнитные частицы (**позитивная фракция**) - **позитивная селекция клеток** (рисунок 9).



**Рисунок 9.** Иммуномагнитная селекция клеток.

Для избавления смеси мононуклеаров от CD14<sup>+</sup>-клеток (моноцитов), был использован метод позитивной иммуномагнитной селекции с применением автоматического магнитного сепаратора AutoMACS Pro Separator Instrument («Miltinyi Biotec», Германия) и моноклональных антител к CD14<sup>+</sup> с

парамагнитными частицами (MicroBeads human, “Miltenyi Biotec”, Германия) согласно протоколу фирмы-изготовителя.

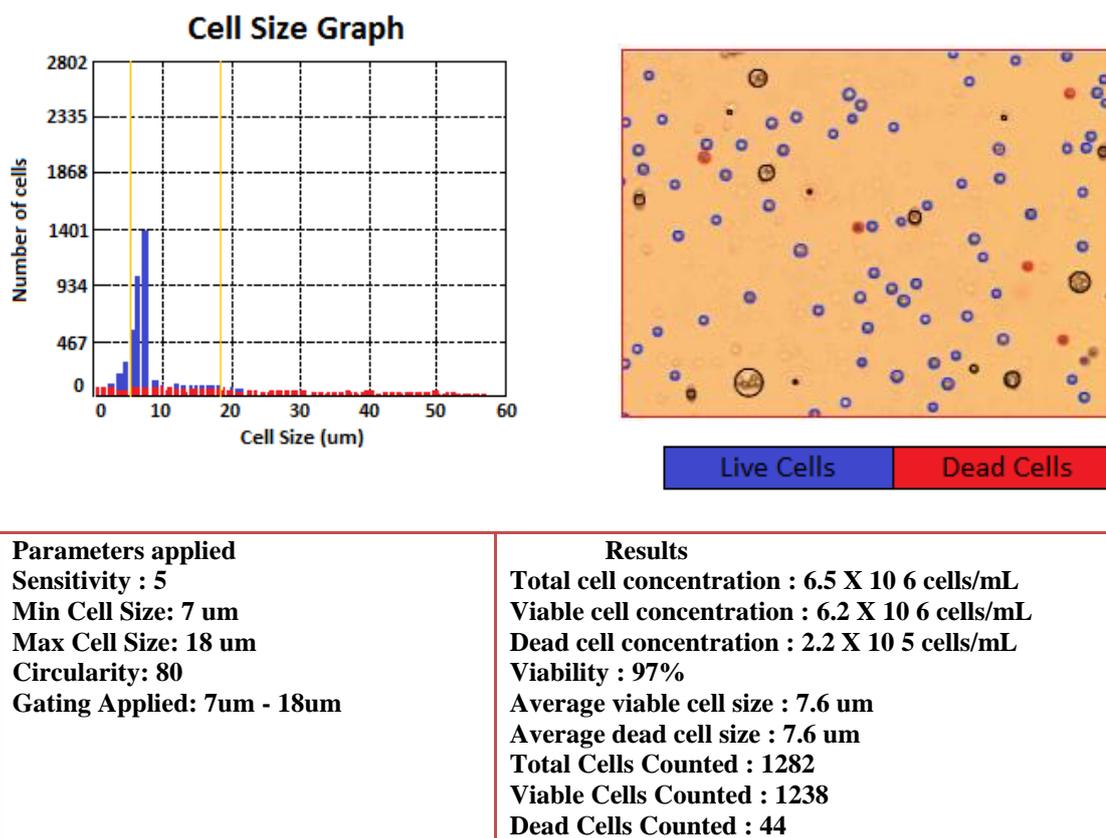
Для этого к выделенной ранее суспензии мононуклеарных клеток (80 мкл взвеси содержала не менее  $10^7$  кл), добавляли 20 мкл магнитных частиц к CD14<sup>+</sup> (MicroBeads human, «Miltenyi Biotec», Германия), согласно протоколу производителя. Суспензию с магнитными частицами инкубировали 15 мин в темноте при +4<sup>0</sup>С. После инкубации клетки отмывали в 2 мл буфера PBS (с 0,5% BSA, «Miltenyi Biotec», Германия) и центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин. Затем сливали надосадочную жидкость и добавляли 500 мкл буфера в клеточную суспензию, тщательно ресуспендируя. Далее переходили к автоматической иммуномагнитной сепарации, следуя протоколу производителя.

После проведенной селекции, для получения популяций наивных (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>), в дальнейшем, использовали **негативную фракцию**, которую центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин. Сливали надосадочную жидкость и добавляли в пробирку 80 мкл буфера и микс магнитных частиц к CD45RA<sup>+</sup> и CD62L<sup>+</sup> (20 мкл) (MicroBeads human, «Miltenyi Biotec», Германия). Для позитивной селекции CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-лимфоцитов повторяли процедуру, аналогичную для CD14<sup>+</sup> клеток.

Выделенные методом автоматической иммуномагнитной сепарации клетки с фенотипом CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, помещали в бессывороточную культуральную среду Искова, объемом 1 мл. Подсчёт клеточности в культурах Т-клеток разной степени дифференцировки проводили с помощью автоматического счётчика клеток (Countess<sup>™</sup> Automated Cell Counter, «Invitrogen», США) с использованием красителя Trypan blue 0,4% («Invitrogen», США). Жизнеспособность составляла не менее 95-98% от общего числа клеток (рисунок 10).

Отсутствие моноцитов (CD14<sup>+</sup>) и В-лимфоцитов (CD19<sup>+</sup>) в культурах CD45RA<sup>+</sup> Т-клеток до культивирования подтверждали с помощью проточной цитометрии с использованием моноклональных антител, конъюгированных с FITC, PE, PE-Cy7 и PerCP (“Abcam”, Великобритания и “e-Bioscience”, США).

Анализ поверхностных маркеров проводили на проточном цитофлуориметре MACS Quant (“Miltenyi Biotec”, Германия), согласно протоколам производителей. В эксперименте использовали клеточные культуры, содержание CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup> и CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup> Т-клеток в которых, составляло, в среднем 98,5 ± 1,5 %.



**Рисунок 10.** Количество живых и мёртвых клеток в культуре CD45RA<sup>+</sup> Т-лимфоцитов.

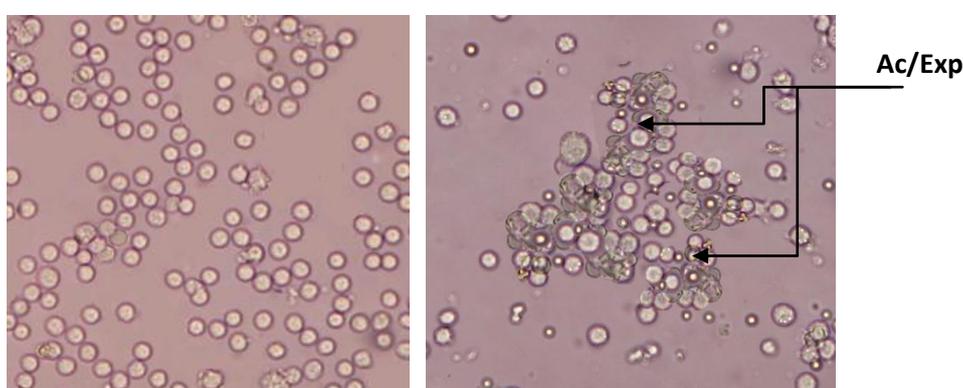
### 2.2.3. Культивирование CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-клеточных культур

CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> клетки (1×10<sup>6</sup> кл/мл) культивировали в 48-луночном планшетах в бессывороточной среде Искова («Sigma-Aldrich», США), содержащей 0,5% сывороточного альбумина человека («Микроген», Россия), 5×10<sup>-5</sup> М β-меркаптоэтанола («Acros Organics», США) и 30 мкг/мл гентамицина в течение 48 ч при 37<sup>0</sup>С, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>.

В эксперименте были использованы разные концентрации стероидных гормонов: дексаметазона («KRKA», Словения), тестостерона (Sigma, USA) и β-

эстрадиола (Sigma, USA).

В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали реагент T-Cell Activation/Expansion Kit human (Ac/Exp) («Miltenyi Biotec», Германия) - антибиотиновые частицы MACSiBead™ с биотинилированными антителами против CD2<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> человека. Нагруженные антителами анти-биотиновые частицы MACSiBead™ используются в качестве имитации АПК и активации покоящихся Т-клеток. Реагент Ac/Exp добавляли в пробы в количестве 5 мкл, которые содержали -  $0,5 \cdot 10^6$  анти-биотиновых MACSiBead™ частиц. Соотношение клеток и активирующих частиц составляло 1:2 (рисунок 11).



**Рисунок 11.** Культуры CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> -лимфоцитов без (А) и с добавлением (Б) Т-клеточного активатора (Ac/Exp).

Для выполнения исследования были использованы следующие варианты культивирования

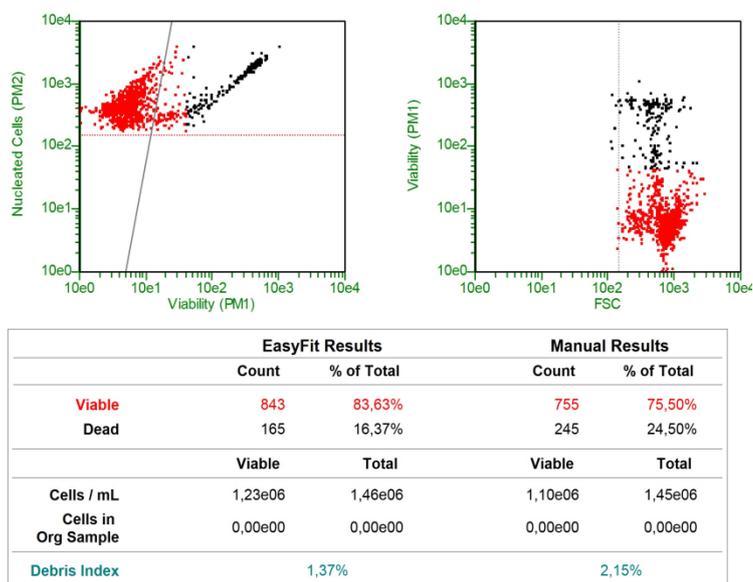
- 1) интактная проба;
- 2) проба с добавлением комплекса *анти-CD2/CD3/CD28* (Ac/Exp);
- 3) пробы с добавлением Ac/Exp и дексаметазона ( $10^{-7}$  -  $10^{-5}$  М);
- 4) пробы с добавлением Ac/Exp и тестостерона ( $10^{-8}$  -  $10^{-6}$  М);
- 5) пробы с добавлением Ac/Exp и β-эстрадиола ( $10^{-9}$  -  $10^{-5}$  М).

#### **2.2.4. Определение общего числа клеток (в мл) и количества жизнеспособных лимфоцитов в культурах CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-клеток методом проточной цитометрии**

**Принцип метода.** Дифференциальная проницаемость для ДНК-связывающих красителей позволяет разграничивать живые и мертвые клетки в любых клеточных суспензиях. Для подсчёта количества клеток в мл в культурах

CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, а также для определения их жизнеспособности, после культивирования, клеточные образцы тщательно ресуспендировали и отбирали 12,5 мкл, добавляли 125 мкл ViaCount Reagent (фактор разведения 10), тщательно ресуспендировали и оставляли на 5 минут в темном месте.

Регистрацию жизнеспособности и подсчет числа клеток в исследуемых клеточных культурах с проводили с использованием программы «Guava ViaCount» (Millipore, США), методом проточной лазерной цитометрии на проточном цитометре «Guava EasyCite Plus» (Millipore, США), согласно протоколу производителя (рисунок 12).



**Рисунок 12.** Стандартный протокол с использованием реагента и одноименной программы «GuavaViacount» (Millipore, USA).

### 2.2.5. Определение поверхностных молекул костимуляции и активации (CD127 и CD28) на CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-клетках методом проточной цитометрии

**Принцип метода** заключается в определении рассеивания света лазерного луча при прохождении через него клеток, окрашенных моноклональными антителами, мечеными флуоресцентными метками.

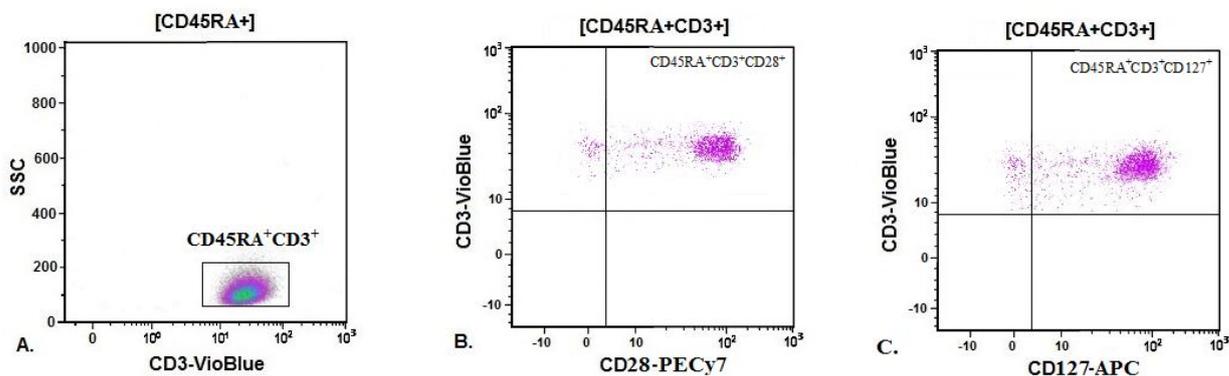
Имунофенотипирование клеток проводили с использованием коктейлей моноклональных антител («Bioscience», USA), приготовленных *ex temporo*:

- *CD45RA(FITC)*, *CD3 (ViaBlue)* и *CD127 (APC)*
- *CD45RA(FITC)*, *CD3 (ViaBlue)* и *CD28 (PECy7)*

После культивирования, образцы тщательно ресуспендировали. 50 мкл клеточной взвеси переносили в микроцентрифужные пробирки (типа эппендорф) и вносили 9 мкл коктейля моноклональных антител (pH=7,4). Инкубирование осуществляли в течение 30-45 мин в темноте при температуре 4<sup>0</sup>С. После инкубации добавляли 200 мкл фосфатно-солевого буфера и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем удаляли надосадочную жидкость. Доводили общий объем клеточной пробы до 200 мкл фосфатно-солевым буфером, тщательно ресуспендировали автоматическим дозатором и переносили в лунки иммунологического планшета. Измерение образцов клеточных суспензий проводили на проточном цитофлуориметре MACS Quant (“Miltenyi Biotec”, Германия).

Гейтинг исследуемой популяции клеток проводился в координатах FSC (ось абсцисс) и SSC (ось ординат). Затем данную популяцию клеток анализировали на наличие флуоресценции в различных координатах (флуоресценция по трем цветам на основе Dot Plot, либо по одному цвету на основе гистограммы). Использовалось автоматическое программное обеспечение и методы сбора и анализа данных с высоким разрешением (1024 канала). Сбор данных осуществляли до тех пор, пока не набиралось 10 000 событий (т.е. 10 000 клеток). Для получения корректных статистических данных, вводили необходимые логистические ограничения в гистограммы распределения клеток по SSC-A (боковое светорассеивание, характеризующее цитоплазматические и мембранные особенности клетки) и флуоресценции CD45 (FITC). Затем гейтирование проводили в области [CD45RA] по SSC-A и интенсивности флуоресценции CD3-*Viablue* (рисунок 13). На основании построенного гейта [CD45RA<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>], используя интенсивность флуоресценции – CD127 (APC) / или CD28 (PECy7), определяли относительное (%) число CD45RA<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup> и CD45RA<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> клеток (рисунок 13). Тактика «гейтирования» Т-клеток, экспрессирующих мембранные молекулы CD127 (IL-7Ra) и костимуляции – CD28, представлены на рисунке 13.

Результаты цитометрического анализа были проанализированы с помощью программы «KALUZA Analysis Software» (Beckman Coulter, США).



**Рисунок 13.** Тактика «гейтирования» наивных CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих молекулы активации и костимуляции (CD28 и CD127).

Гистограммы распределения CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (А) и основных субпопуляций CD127<sup>+</sup> (В) и CD28<sup>+</sup> (С) Т-клеток в популяциях CD45RA<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (контрольная проба), полученные в результате многоцветного анализа с использованием коктейлей моноклональных антител – CD45RA/CD3/CD127 и CD45RA/CD3/CD28.

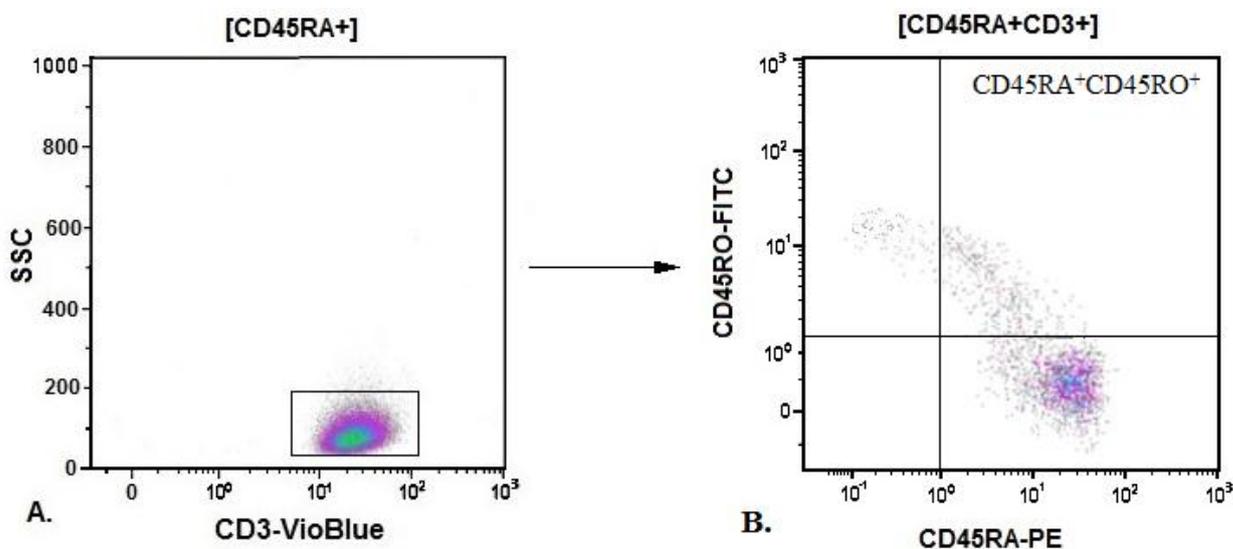
А - анализ распределения клеток по боковому светорассеянию (SSC) и CD3 проведен с использованием гейтирования по CD45RA. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции антител против CD3; по оси ординат – боковое светорассеяние, характеризующее структуру цитоплазмы клеток. На гистограмме приведены только лимфоциты, экспрессирующие на своей поверхности CD45RA. В - анализ проведен с использованием гейтирования по CD3. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции антител против CD28; по оси ординат – интенсивность флуоресценции антител против CD3. С - анализ проведен с использованием гейтирования по CD3. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции антител против CD127; по оси ординат – интенсивность флуоресценции антител против CD3.

### 2.2.6. Определение поверхностных маркеров конверсии наивных Т-клеток методом проточной цитометрии

Имунофенотипирование клеток проводили с использованием коктейля моноклональных антител к CD45 (APC), CD3 (ViaBlue), CD45RA (PE) и CD45RO (FITC) («eBioscience», USA).

*Процедура преаналитического этапа подготовки образцов к цитометрическому анализу описана в п.п 2.2.5.*

Тактика «гейтирования» Т-клеток, экспрессирующих мембранные молекулы CD45RA/RO (дубль-позитивные клетки), представлена на рисунке 14.



**Рисунок 14.** Алгоритм выявления популяций (тактика «гейтирования») дубль-позитивных CD45RA/RO) Т-клеток.

Гистограммы распределения CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (А) и основных субпопуляций дубль-позитивных (CD45RA/RO) (В) Т-клеток в первичных культурах CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (контрольная проба), полученные в результате многоцветного анализа с использованием коктейлей моноклональных антител – CD45RA/CD3/CD45RA/CD45RO.

А - анализ распределения клеток по боковому светорассеянию (SSC) и CD3 проведен с использованием гейтирования по CD45RA. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции антител против CD3; по оси ординат – боковое светорассеяние, характеризующее структуру цитоплазмы клеток. На гистограмме приведены только лимфоциты, экспрессирующие на своей поверхности CD45RA. В - анализ проведен с использованием гейтирования по CD3. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции антител против CD45RA; по оси ординат – интенсивность флуоресценции антител против CD45RO.

### 2.2.7. Выделение тотальной РНК

После инкубации клеточные культуры центрифугировали 5 мин при 2000 об/мин, удаляли надосадочную жидкость, оставляя 100 мкл, тщательно ресуспендировали клеточный осадок. Для выделения тотальной РНК в образцы добавляли по 1 мл ExtractRNA (водный раствор фенола и гуанидин-изотиоцианата) (ExtractRNA kit «Евроген», Россия) и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. После инкубации центрифугировали 10 минут при 15000g («Eppendorf», Centrifuge 5804R, Германия). Отбирали лизат и переносили его в подготовленный заранее эппендорф. Затем в полученный лизат добавляли 0,2 мл хлороформа («Вектон», Россия) и активно перемешивали содержимое (вручную) в течение 15 секунд. Инкубировали смесь 5 минут при комнатной температуре,

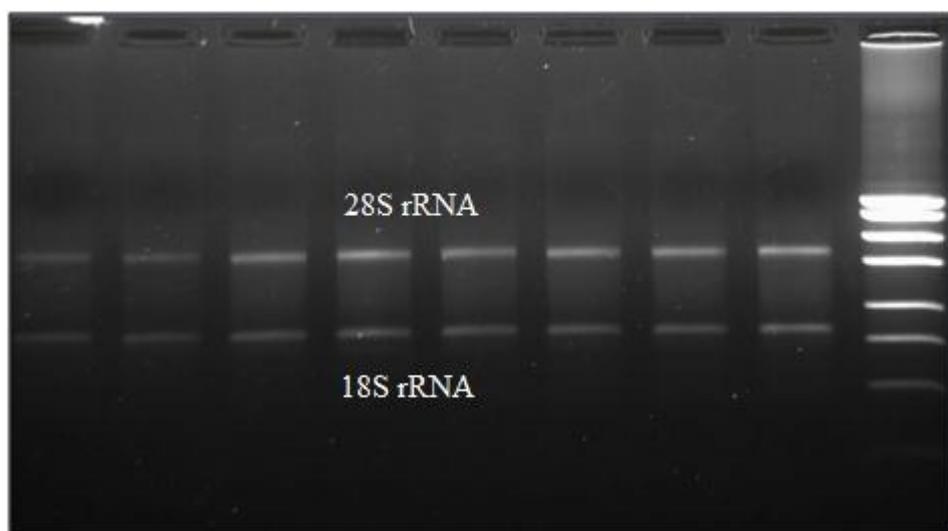
периодически встряхивая образец. Затем центрифугировали 15 минут при 15000g при 4°C. Из полученной трехфазной смеси аккуратно отбирали водную фазу, содержащую тотальную РНК и добавляли 0,5 мл 100% изопропанола.

Полученную смесь инкубировали при комнатной температуре 10 мин, затем центрифугировали при 12000g в течение 10 мин при комнатной температуре. Тщательно отбирали супернатант, оставив осадок РНК на дне пробирки. Затем добавляли 2 мл 75% этанола и центрифугировали в течение 5 мин при 15000g при комнатной температуре. Затем удаляли супернатант и высушивали осадок на воздухе в эппендорфе с открытой крышкой в течение 7 мин. Растворили полученную РНК 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 ( $A_{260 \text{ нм}}/A_{280 \text{ нм}}$ ). Значения варьировали в диапазоне 2,7-2,9 усл.ед.

Качество (целостность) выделенных образцов тотальной РНК определяли методом электрофоретического разделения в 1,5% агарозном геле и трис-ацетатном буфере (ТАЕ) по соотношению плотности бэндов, соответствующих большой (28S) и малой (18S) рибосомным субъединицам рРНК. Образцы выделенной РНК считали пригодными для последующего аналитического этапа, если плотность бэнда, соответствующего малой субъединице не превышала плотность бэнда, соответствующего большой субъединице (индекс RIN (RNA Integrity Number) был равным 1:2) (рисунок 15).

Для получения 1,5 %-ого агарозного геля 150 мг сухой агарозы помещали в 100 мл буфера ТАЕ (x1) и прогревали в микроволновой печи до полного растворения. Затем давали остыть до 50-60°C, добавляли 2мкл бромистого этидия (10%) и заливали планшетки с гребенкой. После застывания гель использовали для проведения электрофореза. Затем 2 мкл раствора анализируемой РНК смешивали с буфером для нанесения образцов и помещали в карманы геля. Горизонтальный электрофорез вели в ТАЕ (x1) буфере при напряженности поля 60В/см. Результаты электрофореза фиксировали при помощи CCD камеры GelDoc XR ("Bio-Rad", США) в УФ-свете.



**Рисунок 15.** Определение качества клеточной РНК по соотношению плотности бэндов, соответствующих большой (28S) и малой (18S) рибосомным субъединицам.

Концентрацию полученной РНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoVue Plus («GE Healthcare», США). Полученные образцы были заморожены при  $-80^{\circ}\text{C}$  до дальнейшего использования.

### **2.2.8. Обратная транскрипция образцов тотальной РНК**

Концентрации полученных образцов РНК были приведены к одному значению для получения одинакового количества кДНК. Для этого в имеющиеся пробы добавляли очищенную воду, доводя концентрацию РНК до 10 мкг/мл. Затем готовили по 13,5 мкл реакционной смеси в стерильной пробирке на каждый образец из следующих компонентов: 9 мкл РНК матрицы (10 мкг) смешивали с 4,5 мкл праймера oligo(dT) (20 мМ) (MMLV RT kit «Евроген», Россия). Аккуратно ресуспендировали смесь, сбрасывая капли со стенок на микроцентрифуге («ELMI SkyLine», Латвия), и помещали пробирки с образцами в ДНК-амплификатор T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США). По окончании реакции переносили образцы на лед. Далее добавляли по 16,5 мкл предварительно подготовленной смеси: 6 мкл пятикратного буфера для синтеза первой цепи, 3 мкл смеси dNTP (20 мМ), 3 мкл DTT (20 мМ) и 4,5 мкл MMLV ревертазы. Так же аккуратно перемешивая смесь и сбрасывая капли со стенок на микроцентрифуге («ELMI SkyLine», Латвия). Помещали пробирки в ДНК-амплификатор T100 Thermal Cycler («Bio-Rad»,

США). По окончании реакции пробирки с образцами замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$  до дальнейшего использования.

### **2.2.9. Определение уровня относительной экспрессии генов методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени**

Для определения уровней относительной экспрессии генов проводили мультиплексный анализ ПЦР с использованием реагентов qPCRmixHS («Евроген», Россия), специфических зондов TaqMan и праймеров в концентрации 10 пМ («Beagle», Россия). В качестве матрицы использовались 5 мкл кДНК, в качестве референсного гена – гены *GAPDH* и *B2M*.

**Принцип метода** реализуется за счет добавления в реакционную смесь, флуоресцирующих зондов комплементарных внутренней последовательности амплифицируемых фрагментов. Флуоресцентный зонд представляет собой олигонуклеотид, несущий на 5'-конце флуорофор, и на 3'-конце, так называемый «гаситель» - флуорофор подобранный таким образом, чтобы его диапазон поглощения совпадал с диапазоном эмиссии флуорофора связанного с 5'-концом. Подобная комбинация обеспечивает полноценное гашение флуоресценции 5'-концевого флуорофора 3'-концевым флуорофором за счет флуоресцентно-резонансного переноса энергии (FRET). Таким образом, флуоресценция 5'-концевого флуорофора при условиях целостности первичной структуры зонда оказывается близкой к нулю. Полимеразная цепная реакция представляет собой многократно повторяющиеся циклы синтеза (амплификации) фрагмента ДНК ограниченного участками посадки праймеров. На каждом цикле амплификации происходит гибридизация олигонуклеотидного зонда к комплементарному участку ампликона с последующим разрушением (гидролизом) зонда ферментом – термостабильной ДНК полимеразой (благодаря ее 5'-эксонуклеазной активности). При гидролизе зонда происходит пространственное разобщение 5' и 3' концевых флуорофоров, что делает невозможным гашение флуоресценции посредством FRET взаимодействия. Регистрируемое при этом увеличение значений флуоресценции 5'-флуорофора прямо пропорционально увеличению числа синтезированных ампликонов и отражает концентрацию ДНК в исходной матрице.

Предварительную оценку специфичности праймеров, ампликонов и зондов проводили с помощью on-line программы BLAST. В качестве матрицы использовались 5 мкл кДНК, в качестве референсного гена в эксперименте с генами *GF11* и *U2af114* – ген *GAPDH*, с геном *hTERT* – ген *B2M*. Последовательность олигонуклеотидных праймеров, используемых в эксперименте, представлены в таблицах 1 и 2.

**Таблица 1**

Последовательность олигонуклеотидных праймеров, используемых в эксперименте с генами *GF11* и *U2af114*

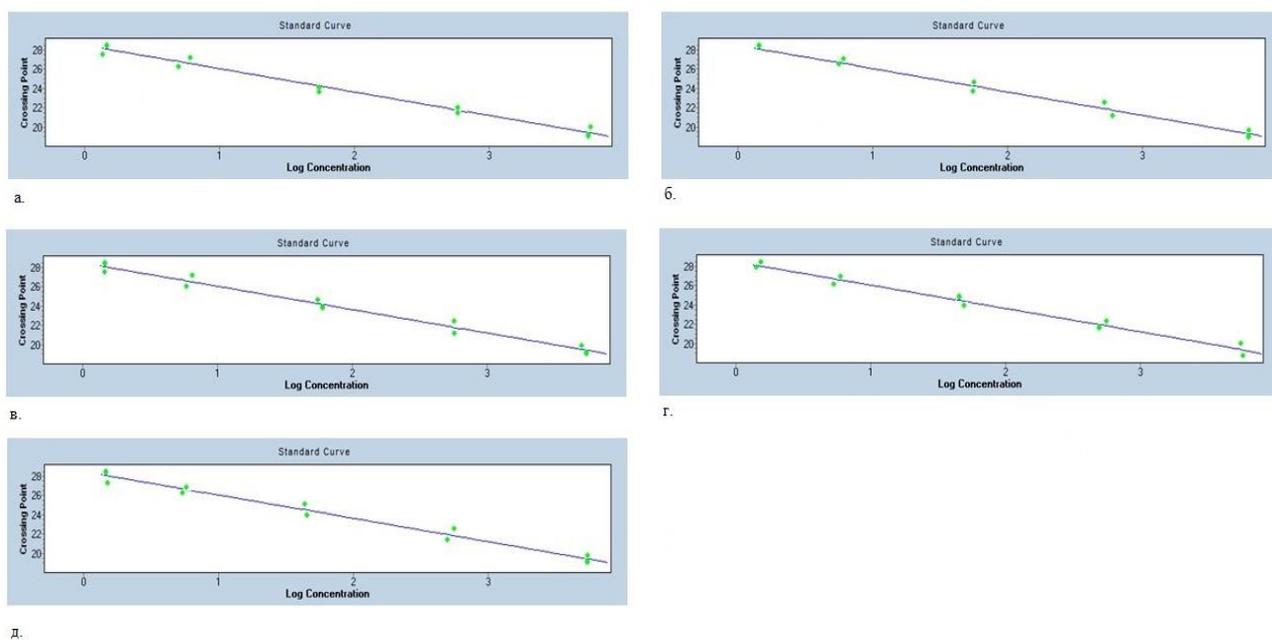
GF11_for 5'-TGGAGCAGCACAAAGCC-3'
GF11_rev 5'-GACAGTGTGGATGACCTCTTG-3'
U2af114_for 5'-CTTCACAACAAGCCGACATTC-3'
U2af114_rev 5'-CAAGGTTGTCCGACACATTC-3'
GAPDH_for 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'
GAPDH_rev 5'-GAAGATGGTGGTGGGATTTTC-3'
GF11_probe FAM-5'-CGCAGGAACGGAGCTTTGACTGTA-3'~BHQ-1
U2af114_probe FAM-5'-CCAGGAGGTGTTACAGAACTGCA-3'~BHQ-1
GAPDH_probe HEX-5'-CAAGCTTCCCCTTCTCAGCC-3'-BHQ-1

**Таблица 2**

Последовательность олигонуклеотидных праймеров, используемых в эксперименте с геном *hTERT*

hTERT_for 5'-TGACACCTCACCTCACCCAC-3'
hTERT_rev 5'-CACTGTCTTCCGCAAGTTCAC-3'
B2M_for 5'-AGCAAGGACTGGTCTTTCTATCT-3'
B2M_rev 5'-AAACCTCCATGATGCTGCTTAC-3'
hTERT_probe FAM-5'-ACCCTGGTCCGAGGTGTCCCTGAG-3'-BHQ-1
B2M_probe 5'-FAM-ACCTTGTACAGCCCAAGATAGTTA-BHQ1 - 3'

Для каждой пары праймеров была подобрана оптимальная температура отжига с использованием градиентной ПЦР (Bio-Rad T-100, Bio-Rad C-1000, США). Оптимизация условий полимеразной цепной реакции проводилась при амплификации пяти последовательных 2-х кратных разведений кДНК, каждая точка была представлена в двойном повторе (рисунок 16).



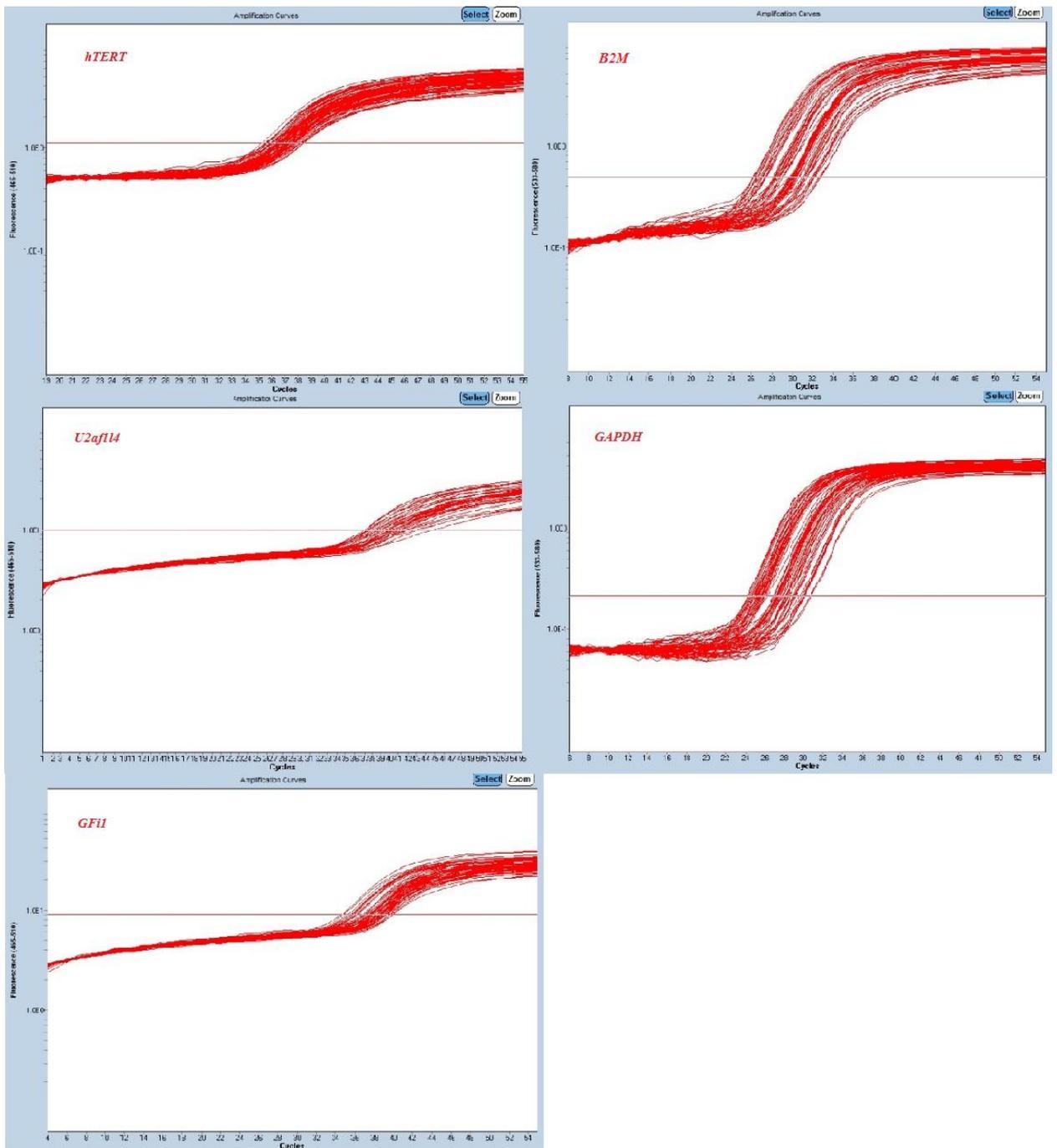
**Рисунок 16.** Проекция значений  $C_t$  серии двукратных разведений для построения калибровочной кривой генов: а) *U2af114*; б) *Gfi1*; в) *hTERT*; г) *GAPDH*; д) *B2M*.

ПЦР-реакцию проводили в трех повторах. Для проведения ПЦР использовали амплификатор LightCycler 480 Real-Time PCR («Roche», Швейцария).

Протокол амплификации:

- первичная денатурация – 5 мин при 95 °С;
- амплификационный цикл (x 45):
  - денатурация – 20 с при 95 °С;
  - отжиг праймеров - 30 с при 60 °С;
  - элонгация - 60 с при 72 °С;
- постинкубация - 5 мин при 72 °С;
- построение кривой плавления – нагревание амплификационной смеси с 65 до 95 °С, с шагом 5 °С.

Результаты ПЦР анализировали с помощью метода максимума второй производной (Second Derivative Maximum method), т.е. определения значения некоторой характеристической точки  $C_p$  (Crossing point) на графике накопления ДНК по форме кривой (рисунок 17).



**Рисунок 17.** Графическое представление кинетики накопления продукта ПЦР исследуемых генов при амплификации экспериментальных образцов.

Расчеты уровней относительной экспрессии исследуемых генов производили с помощью модифицированной формулы Пфаффа для разных эффективностей амплификации.

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

Относительный уровень экспрессии исследуемого гена вычисляется, исходя из его эффективности ПЦР в реальном времени (E) и разности ( $\Delta$ ) точек

пересечения (CP) неизвестного образца по сравнению с контрольным ( $\Delta CP = CP_{\text{контрольного образца}} - CP_{\text{исследуемого образца}}$ ).

Используемый относительный количественный анализ (Relative Quantification) основан на отношении экспрессий исследуемого к экспрессии референсного гена и является достаточным для большинства целей исследовать физиологические изменения в уровнях экспрессии генов.

Полученные в ходе анализа результаты зависят от референсного гена и применяемой процедуры нормализации. Некоторые математические модели уже разработаны для расчета относительных уровней экспрессии в одних образцах, с или без коррекции эффективности. Данная формула показывает наиболее удобную математическую модель, которая включает в себя коррекцию эффективности для эффективности ПЦР в реальном времени отдельных транскриптов.

#### **2.2.10. Методы статистического анализа данных**

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: медиану (M), первый и третий квартили ( $Q_1$ ,  $Q_3$ ). Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали критерий для зависимых выборок Вилкоксона. С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный (путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена ( $r$ )) и регрессионный (с вычислением коэффициента регрессии –  $r^2$ ) анализы. Различия считались достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$  (Кремер Н.Ш., 2004).

В таблице 3 представлено распределение экспериментальных клеточных моделей *in vitro* в соответствии с использованными методами исследования.

**Таблица 3.** Распределение экспериментальных клеточных моделей *in vitro* в соответствии с использованными методами исследования (число культур/число проб)

Методы исследования	Условия культивирования	Экспериментальные клеточные модели
		CD45RA <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup>
Определение общего числа клеток (в мл) и количества жизнеспособных лимфоцитах в культурах Т-клеток методом проточной цитометрии	Интактная проба + Ac/Exp Ac/Exp + Dex (10 <sup>-5</sup> M) Ac/Exp + Dex (10 <sup>-6</sup> M) Ac/Exp + Dex (10 <sup>-7</sup> M) Ac/Exp + Test (10 <sup>-6</sup> M) Ac/Exp + Test (10 <sup>-7</sup> M) Ac/Exp + Test (10 <sup>-8</sup> M) Ac/Exp + Est (10 <sup>-5</sup> M) Ac/Exp + Est (10 <sup>-6</sup> M) Ac/Exp + Est (10 <sup>-7</sup> M) Ac/Exp + Est (10 <sup>-8</sup> M) Ac/Exp + Est (10 <sup>-9</sup> M)	120/1560
Определение числа CD127-позитивных клеток методом проточной цитометрии		120/1560
Определение числа CD28-позитивных клеток методом проточной цитометрии		120/1560
Определение числа дубль-позитивных (CD45RA/RO) и CD45RO <sup>+</sup> Т-клеток методом проточной цитометрии		120/1560
Определение относительного уровня экспрессии мРНК генов <i>Gfi1</i> , <i>U2af114</i> и <i>hTERT</i> методом полимеразно-цепной реакции		120/1560

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### 3.1. Оценка эффектов стероидных гормонов на общее количество клеток ( $10^6$ кл/мл) и жизнеспособность в культурах CD2/CD3/CD28-активированных CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-клеток

После окончания срока культивирования (48 ч), общее количество клеток/мл в интактных культурах CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-клеток составляло  $1,01 (0,87 - 1,33) \times 10^6$  кл/мл. Инкубация наивных Т-лимфоцитов с активирующим *анти-CD2/CD3/CD28* - комплексом, приводила к достоверному увеличению числа клеток, в среднем, на 22% (таблица 4). Согласно полученным данным, глюкокортикоид - дексаметазон (в диапазоне используемых физиологических концентраций) в комбинации с активатором, не оказывал статистически значимого влияния на изменение общего количества (в мл) CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в культурах, по сравнению с пробами только с добавлением активатора (таблица 4).

Сочетанное действие тестостерона дексаметазон (в диапазоне используемых физиологических концентраций) и активатора также не повлекло за собой изменения общего числа клеток (в мл) (таблица 4). Инкубация наивных (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-клеток с  $\beta$ -эстрадиолом и активатором, напротив, сопровождалась ростом общего количества клеток в культурах. Эффекты женского полового гормона имели прямую зависимость от его действующей концентрации ( $r^2=0,82$ ,  $p<0,05$ ) (таблица 4).

В интактных пробах анализ жизнеспособности Т-лимфоцитов показал, что количество живых клеток в CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> - культурах, было равным 73,45 (68,59 - 80,20)%. TCR-активация CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> - лимфоцитов приводила к статистически значимому снижению числа живых клеток, по сравнению с интактной пробой (таблица 1). Количество живых CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в культуре с добавлением активатора достигало 53,45 (48,30 - 61,69)% (таблица 4).

Добавление в культуру Т-лимфоцитов дексаметазона ( $10^{-6}$  и  $10^{-7}$  М) в сочетании с активатором, сопровождалось значимым увеличением числа живых CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, по сравнению с пробами только с добавлением активирующих частиц. Более низкая концентрация гормона ( $10^{-7}$  М) не оказывала влияния на исследуемый параметр (таблица 4). Сочетанное добавление активатора и тестостерона (в диапазоне используемых физиологических концентраций), не

оказывало статистически значимого влияния на жизнеспособность наивных Т-клеток, по сравнению с действием только активирующих частиц (таблица 4).

Инкубация ТCR-активированных CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-клеток с концентрациями β-эстрадиола (10<sup>-9</sup> - 10<sup>-7</sup> М), приводила к росту числа живых клеток, снижая негативный эффект активатора. Тогда как сочетанное добавление активатора и β-эстрадиола в более высоких концентрациях (10<sup>-6</sup> и 10<sup>-5</sup> М) в культуры CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, сопровождалось противоположным эффектом, резко снижая число жизнеспособных лимфоцитов до 30,75 (28,34 - 34,24) и 10,54 (7,98 - 18,16)%, соответственно (таблица 4).

**Таблица 4.** Общее количество клеток (10<sup>6</sup>/мл) и содержание живых клеток (%) в культурах CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, инкубируемых с Т-клеточным активатором (Ac/Exp) и разными концентрациями гормонов: дексаметазоном (Dex), тестостероном (Test) и β-эстрадиолом (Est) (Me (Q1 - Q3))

Варианты культивирования	CD45RA <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup>	
	Общее количество клеток (10 <sup>6</sup> кл/мл)	Содержание живых клеток (%)
<b>Интактная проба</b>	1,01 (0,87 - 1,33)	73,45 (68,59 - 80,20)
<b>Ac/Exp</b>	1,22 (0,92 - 1,52) p <sub>0</sub> <0,05	53,45 (48,30 - 61,69) p <sub>0</sub> <0,05
<b>Ac/Exp + Dex (10<sup>-5</sup> М)</b>	1,28 (0,96 - 1,64)	74,15 (68,06 - 78,00) p <sub>1</sub> <0,05
<b>Ac/Exp + Dex (10<sup>-6</sup> М)</b>	1,16 (1,00 - 1,55)	73,45 (65,40 - 78,18) p <sub>1</sub> <0,05
<b>Ac/Exp + Dex (10<sup>-7</sup> М)</b>	1,16 (1,01 - 1,82)	66,87 (62,95 - 71,04) p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05
<b>Ac/Exp + Test (10<sup>-6</sup> М)</b>	1,17 (0,98 - 1,27)	67,58 (62,78 - 73,91)
<b>Ac/Exp + Test (10<sup>-7</sup> М)</b>	1,24 (1,00 - 1,36)	68,07 (62,58 - 72,00)
<b>Ac/Exp + Test (10<sup>-8</sup> М)</b>	1,24 (0,93 - 1,45)	63,08 (56,02 - 69,83)
<b>Ac/Exp + Est (10<sup>-5</sup> М)</b>	1,67 (1,45 - 1,85) p <sub>1</sub> <0,05	10,54 (7,98 - 18,16) p <sub>1</sub> <0,05
<b>Ac/Exp + Est (10<sup>-6</sup> М)</b>	1,63 (1,53 - 1,80) p <sub>1</sub> <0,05	30,75 (28,34 - 34,24) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05
<b>Ac/Exp + Est (10<sup>-7</sup> М)</b>	1,29 (1,15 - 1,43) p <sub>2</sub> <0,05	68,33 (55,31 - 72,00) p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05

<b>Ac/Exp + Est (<math>10^{-8}</math> M)</b>	1,24 (1,09 - 1,32) $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	67,01 (59,42 - 69,46) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
<b>Ac/Exp + Est (<math>10^{-9}</math> M)</b>	1,19 (1,10 - 1,42) $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	66,97 (65,86 - 70,06) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$ $p_5 < 0,05$

*Здесь и в сл. таблицах:*

$p_0$  - достоверность различий по сравнению с интактной пробой

$p_1$  - достоверность различий по сравнению с пробой с добавлением активатора Ac/Exp

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

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

$p_4$  - достоверность различий по сравнению с пробой с добавлением Ac/Exp + Est ( $10^{-7}$  M)

$p_5$  - достоверность различий по сравнению с пробой с добавлением Ac/Exp + Est ( $10^{-8}$  M)

### **3.2. Оценка эффектов стероидных гормонов на мембранную экспрессию молекулы активации - CD127 в культурах CD2/CD3/CD28-активированных активированных CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-клеток**

Молекула CD127 -  $\alpha$ -цепь рецептора к IL-7 (IL-7R) (Charles D., Surh J., 2008).

Угнетение экспрессии IL7R $\alpha$  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).

После окончания срока инкубации, в интактных пробах CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> клеток, количество Т-клеток, экспрессирующих на своей мембране молекулу CD127, составляло, в среднем, 92,50 (88,40 - 97,90)%. Активатор способствовал снижению числа CD127-экспрессирующих Т-клеток в CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> - культурах до 75,41 (72,20 - 81,40)% (таблица 5).

Инкубация CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-клеток, в условиях добавления активатора и дексаметазона (во всем спектре физиологических концентраций), способствовало незначительному равномерному повышению числа CD127-позитивных лимфоцитов по сравнению с пробой только с добавлением активирующих частиц, однако эти изменения носили недостоверный характер.

Добавление комбинации тестостерона (во всем спектре физиологических концентраций) и активатора не влияло на число наивных лимфоцитов, экспрессирующих мембранный рецептор к IL-7 (CD127) (таблица 5).

$\beta$ -эстрадиол в высоких концентрациях ( $10^{-7}$  -  $10^{-5}$  М) приводил к статистически достоверному снижению количества активированных *анти-CD2/CD3/CD28*-комплексом  $CD45RA^+CD62L^+$  лимфоцитов, экспрессирующих молекулу CD127. Использование максимальной концентрации женского полового гормона ( $10^{-5}$  М) приводило к наиболее выраженному снижению числа  $CD45RA^+CD62L^+CD127^+$  Т-клеток - до 55,69 (45,19 - 61,66)% (таблица 5).

**Таблица 5.** Содержание CD127 – позитивных клеток (%) в культурах  $CD45RA^+CD62L^+$  Т-лимфоцитов, инкубируемых с Т-клеточным активатором (Ac/Exp) и разными концентрациями гормонов: дексаметазоном (Dex), тестостероном (Test) и  $\beta$ -эстрадиолом (Est) (Me (Q1 - Q3))

Варианты культивирования	<b>CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup></b>
	Число CD127 <sup>+</sup> клеток (%)
<b>Интактная проба</b>	92,50 (88,40 - 97,90)
<b>Ac/Exp</b>	75,41 (72,20 - 81,40) $p_0 < 0,05$
<b>Ac/Exp + Dex (<math>10^{-5}</math> М)</b>	78,81 (75,64 - 80,44)
<b>Ac/Exp + Dex (<math>10^{-6}</math> М)</b>	81,15 (69,22 - 85,27)
<b>Ac/Exp + Dex (<math>10^{-7}</math> М)</b>	77,83 (70,45 - 79,16)
<b>Ac/Exp + Test (<math>10^{-6}</math> М)</b>	72,55 (68,42 - 79,81)
<b>Ac/Exp + Test (<math>10^{-7}</math> М)</b>	78,51 (72,35 - 79,95)
<b>Ac/Exp + Test (<math>10^{-8}</math> М)</b>	73,82 (69,90 - 78,54)
<b>Ac/Exp + Est (<math>10^{-5}</math> М)</b>	55,69 (45,19 - 61,66) $p_1 < 0,05$
<b>Ac/Exp + Est (<math>10^{-6}</math> М)</b>	55,78 (43,78 - 59,21) $p_1 < 0,05$
<b>Ac/Exp + Est (<math>10^{-7}</math> М)</b>	64,22 (60,35 - 67,30) $p_1 < 0,05$
<b>Ac/Exp + Est (<math>10^{-8}</math> М)</b>	70,35 (68,32 - 73,85) $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
<b>Ac/Exp + Est (<math>10^{-9}</math> М)</b>	72,81 (69,55 - 78,81) $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$ $p_4 < 0,05$

### 3.3. Оценка эффектов стероидных гормонов на мембранную экспрессию молекулы позитивной костимуляции (CD28) в культурах CD2/CD3/CD28-активированных CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-клеток

Молекула CD28 конститутивно экспрессируется на всех наивных (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-клетках и является первичным корецептором, опосредующим их позитивную костимуляцию, играя важную и сложную роль в контроле иммунного гомеостаза (лиганды на АПК - CD80 и CD86) (Ярилин А.А., 2010; Butte, J.M. et al., 2012; Кудрявцев И.В., 2014; Юрова К.А., 2015).

В контрольных пробах, число CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> клеток, несущих на своей поверхности маркер CD28, составило 96 (89,30 - 98,00)%. Инкубация наивных Т-лимфоцитов с анти-CD2/CD3/CD28 комплексом сопровождалась достоверным снижением числа CD28<sup>+</sup> Т-клеток, в среднем, на 23%, что составило 74,2 (69,23 - 77,20)% (таблица 6).

Дексаметазон, при добавлении его в концентрации  $10^{-5}$  М, в сочетании с активатором, приводил к резкому снижению числа CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> клеток по сравнению с пробами только с добавлением активирующих частиц. С уменьшением концентрации гормона, негативный эффект на экспрессию молекулы CD28 наивными Т-лимфоцитами, снижался до уровня, сопоставимого с пробами только с добавлением активатора (таблица 6).

Сочетанное использование анти-CD2/CD3/CD28 комплекса и *тестостерона* ( $10^{-8}$  и  $10^{-6}$  М) не оказывало значимого действия на исследуемый параметр (таблица 6).

Внесение в культуру активированных наивных CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-клеток  $\beta$ -эстрадиола, сопровождалось статистически достоверным снижением числа CD28<sup>+</sup> Т-лимфоцитов.

При добавлении максимальной концентрации женского полового гормона, число Т-клеток, несущих на своей поверхности молекулу CD28, достигало 44,32 (42,34 - 48,22)%, что в 1,6 раз было ниже значений, регистрируемых при добавлении в культуры наивных клеток только активирующих частиц (таблица 6).

**Таблица 6.** Содержание CD28 – позитивных клеток (%) в культурах CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, инкубируемых с Т-клеточным активатором (Ac/Exp) и разными концентрациями гормонов: дексаметазоном (Dex), тестостероном (Test) и β-эстрадиолом (Est) (Me (Q1 - Q3))

Варианты культивирования	CD45RA <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup>
	Число CD28 <sup>+</sup> клеток (%)
<b>Интактная проба</b>	96,00 (89,30 – 98,00)
<b>Ac/Exp</b>	74,20 (69,23 - 77,20) p <sub>0</sub> <0,05
<b>Ac/Exp + Dex (10<sup>-5</sup> M)</b>	51,34 (49,10 - 59,30) p <sub>1</sub> <0,05
<b>Ac/Exp + Dex (10<sup>-6</sup> M)</b>	65,22 (60,32 - 69,30) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05
<b>Ac/Exp + Dex (10<sup>-7</sup> M)</b>	74,80 (68,78 - 76,54) p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05
<b>Ac/Exp + Test (10<sup>-6</sup> M)</b>	71,30 (68,40 - 75,43)
<b>Ac/Exp + Test (10<sup>-7</sup> M)</b>	74,30 (72,11 - 77,40)
<b>Ac/Exp + Test (10<sup>-8</sup> M)</b>	70,50 (68,30 - 74,30)
<b>Ac/Exp + Est (10<sup>-5</sup> M)</b>	44,32 (42,34 - 48,22) p <sub>1</sub> <0,05
<b>Ac/Exp + Est (10<sup>-6</sup> M)</b>	51,45 (45,38 - 52,34) p <sub>1</sub> <0,05
<b>Ac/Exp + Est (10<sup>-7</sup> M)</b>	66,23 (59,20 - 68,32) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05
<b>Ac/Exp + Est (10<sup>-8</sup> M)</b>	69,32 (62,40 - 70,34) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05
<b>Ac/Exp + Est (10<sup>-9</sup> M)</b>	70,32 (68,43 - 74,00) p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05 p <sub>4</sub> <0,05 p <sub>5</sub> <0,05

### 3.4. Оценка эффектов стероидных гормонов на мембранную экспрессию изоформ общелейкоцитарного рецептора CD45 в культурах CD2/CD3/CD28-активированных CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-клеток

Изоформы молекулы CD45, генерированные путем альтернативного сплайсинга экзонов, отражают процесс дифференцировки Т-клеток во время антигензависимой активации иммунокомпетентных клеток и обладают разными свойствами при взаимодействии с лигандом (Alexander D.R., 2000; Lynch W.K., Weiss A, 2000). Наивные Т-лимфоциты на высоком уровне экспрессируют длинные, высокомолекулярные изоформы CD45 (CD45RA), тогда как активированные антигеном Т-клетки, преимущественно, короткий сплайс-вариант CD45 (CD45RO) (Tong A. et al., 2005; Литвинова Л.С. и соавт., 2013).

Число дубль-позитивных CD45RA/RO и CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток в интактных CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> - пробах было равным - 8,90 (5,67 - 9,80) и 10,5 (6,18 - 12,31)%, соответственно (таблица 7).

Добавление в культуру наивных Т-клеток анти-CD2/CD3/CD28 комплекса приводило к значимому увеличению содержания дубль-позитивных лимфоцитов и CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток (в среднем, в 2 раза) по сравнению с интактной пробой (таблица 7).

Инкубация TCR-активированных наивных Т-клеток с дексаметазоном ( $10^{-6}$  и  $10^{-5}$  М) способствовала достоверному росту числа CD45RA/RO и CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток по сравнению с пробами только с добавлением активирующих частиц (таблица 7).

Тестостерон ( $10^{-7}$  -  $10^{-6}$  М), на фоне активирующего действия анти-CD2/CD3/CD28-комплекса приводил к снижению количества CD45RA/RO и CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток в культурах наивных CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (таблица 7). Инкубация Т-клеток в условиях добавления комбинации активатора и  $\beta$ -эстрадиола ( $10^{-7}$  -  $10^{-5}$  М), способствовала статистически достоверному увеличению числа дубль-позитивных и CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток, по сравнению с добавлением только активатора.

Более низкие концентрации женского полового гормона ( $10^{-9}$  -  $10^{-8}$  М) не оказывали значимого влияния на исследуемые параметры (таблица 7).

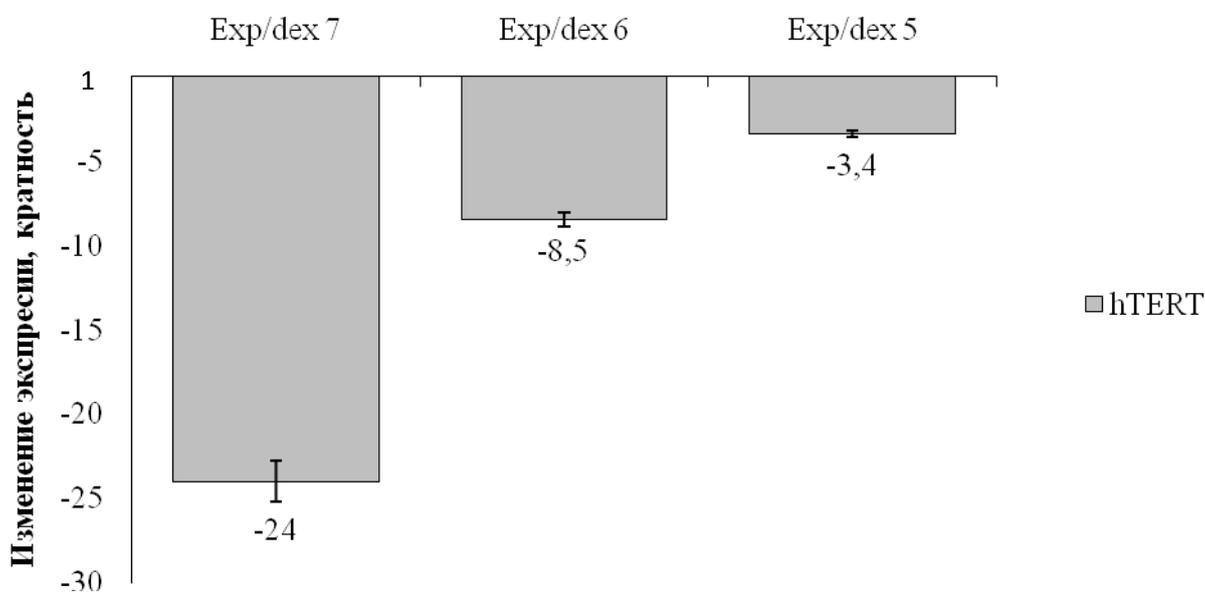
**Таблица 7.** Содержание дубль-позитивных (CD45RA/RO) Т-клеток (%) в культурах CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, инкубируемых с Т-клеточным активатором (Ac/Exp) и разными концентрациями гормонов: дексаметазоном (Dex), тестостероном (Test) и β-эстрадиолом (Est) (Me (Q1 - Q3))

Варианты культивирования	CD45RA <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup>	
	Число CD45RA/RO клеток (%)	Число CD45RO <sup>+</sup> клеток (%)
<b>Интактная проба</b>	8,90 (5,67 - 9,80)	10,5 (6,18 - 12,31)
<b>Ac/Exp</b>	21,45 (19,90 - 25,74) p <sub>0</sub> <0,05	24,62 (21,0 - 27,81) p <sub>0</sub> <0,05
<b>Ac/Exp + Dex (10<sup>-5</sup> M)</b>	49,00 (48,00 - 54,33) p <sub>1</sub> <0,05	55,02 (51,21 - 61,38) p <sub>1</sub> <0,05
<b>Ac/Exp + Dex (10<sup>-6</sup> M)</b>	38,29 (33,14 - 43,23) p <sub>1</sub> <0,05	44,38 (39,14 - 48,18) p <sub>1</sub> <0,05
<b>Ac/Exp + Dex (10<sup>-7</sup> M)</b>	25,34 (21,22 - 29,54) p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05	26,19 (23,14 - 31,11) p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05
<b>Ac/Exp + Test (10<sup>-6</sup> M)</b>	15,30 (12,49 - 17,32) p <sub>1</sub> <0,05	18,21 (15,32 - 19,21) p <sub>1</sub> <0,05
<b>Ac/Exp + Test (10<sup>-7</sup> M)</b>	13,30 (10,45 - 18,20) p <sub>1</sub> <0,05	15,32 (11,15 - 19,30) p <sub>1</sub> <0,05
<b>Ac/Exp + Test (10<sup>-8</sup> M)</b>	21,37 (18,40 - 23,40) p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05	25,18 (20,31 - 26,18) p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05
<b>Ac/Exp + Est (10<sup>-5</sup> M)</b>	48,30 (45,20 - 66,00) p <sub>1</sub> <0,05	53,29 (48,20 - 63,90) p <sub>1</sub> <0,05
<b>Ac/Exp + Est (10<sup>-6</sup> M)</b>	49,30 (48,30 - 52,45) p <sub>1</sub> <0,05	55,28 (51,45 - 58,93) p <sub>1</sub> <0,05
<b>Ac/Exp + Est (10<sup>-7</sup> M)</b>	42,30 (34,30 - 44,23) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05	46,328 (39,40 - 54,71) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05
<b>Ac/Exp + Est (10<sup>-8</sup> M)</b>	21,38 (19,00 - 23,10) p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05 p <sub>4</sub> <0,05	24,34 (21,02 - 26,15) p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05 p <sub>4</sub> <0,05
<b>Ac/Exp + Est (10<sup>-9</sup> M)</b>	21,50 (21,29 - 26,30) p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05 p <sub>4</sub> <0,05	25,09 (22,18 - 29,03) p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05 p <sub>4</sub> <0,05

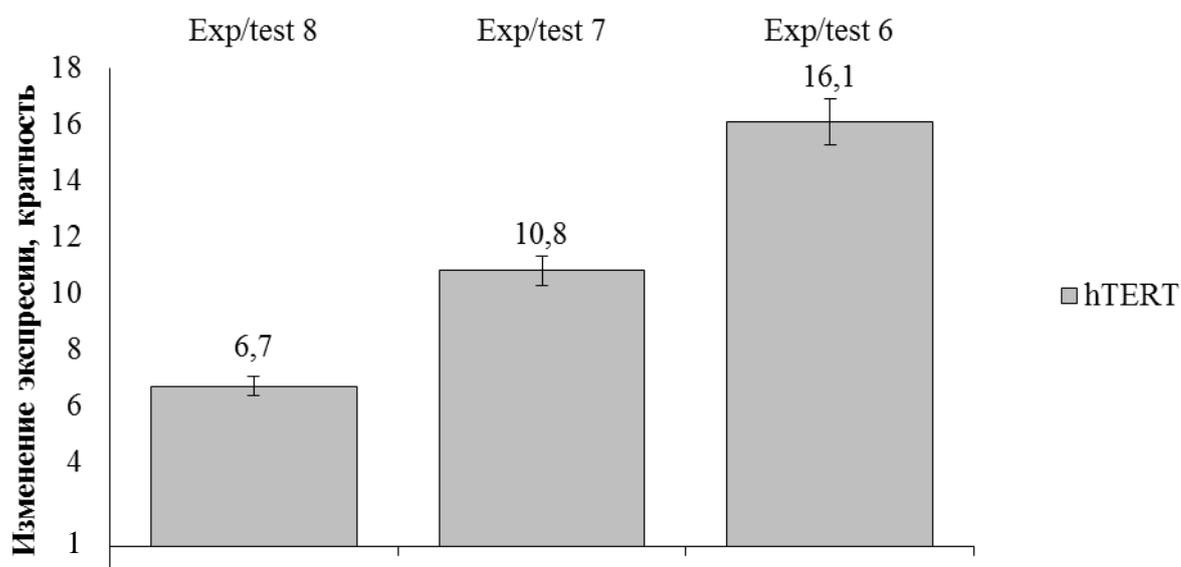
### 3.5. Оценка влияния стероидных на экспрессию гена каталитической субъединицы теломеразы - *hTERT* в культурах CD2/CD3/CD28-активированных CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-клеток

Т-клеточная активация и последовательная потеря экспрессии костимуляционных и хемокиновых рецепторов CD27, CD28 и CCR7, ассоциированные с процессами дифференцировки и созревания клеток, сопровождаются уменьшением длины теломер (Акбар А.Н., Fletcher J.M., 2005). Экспрессия мРНК гена каталитической субъединицы теломеразы - *hTERT* стабилизирует длину теломер, способствуя сохранению пролиферативного потенциала Т-клеток (Hooijberg E., 2000; Roth A., 2005).

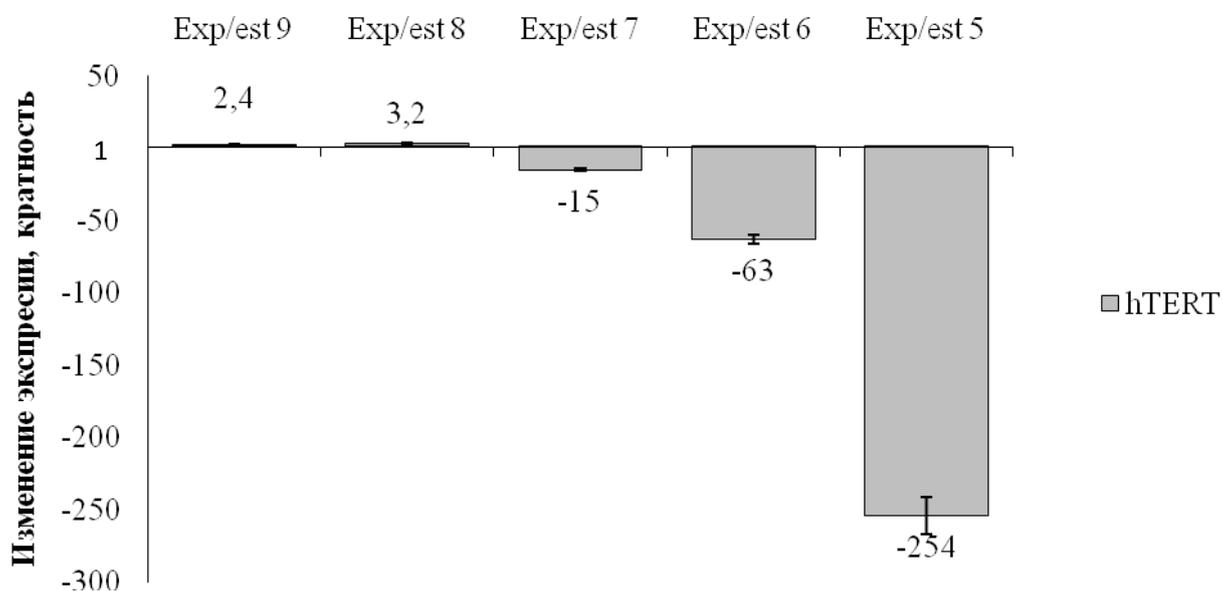
Активация CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-клеток анти-CD2/CD3/CD28 комплексом, сопровождалась повышением экспрессии мРНК гена каталитической субъединицы теломеразы – *hTERT*, в 78,6 раза по сравнению с контрольными цифрами. Инкубация TCR-активированных наивных Т-клеток с добавлением дексаметазона, в целом, приводила к значительному снижению относительного уровня экспрессии гена *hTERT*, в сравнении с эффектами только активирующих частиц (рисунок 18). Негативный эффект дексаметазона снижался с повышением концентрации гормона (рисунок 18).



**Рисунок 18.** Изменение относительного уровня транскрипции мРНК гена *hTERT* в CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-клетках в условиях культивирования *in vitro* с добавлением активатора (Exp) и дексаметазона (dex) в различной концентрации (кратность); Exp/dex 7-5 – 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).



**Рисунок 19.** Изменение относительного уровня транскрипции мРНК гена *hTERT* в CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-клетках в условиях культивирования *in vitro* с добавлением активатора (Exp) и тестостерона (test) в различной концентрации (кратность); Exp/test 8-6 – отношение уровней экспрессии мРНК гена *hTERT* в образцах с добавлением Т-клеточного активатора и CD2/CD3/CD28-активированных пробах с добавлением тестостерона ( $10^{-8}$  -  $10^{-6}$  М).



**Рисунок 20.** Изменение относительного уровня транскрипции мРНК гена *hTERT* в CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-клетках в условиях культивирования *in vitro* с добавлением активатора (Exp) и β-эстрадиола (est) в различной концентрации (кратность); Exp/est 9-5 – отношение уровней экспрессии мРНК гена *hTERT* в образцах с добавлением Т-клеточного активатора и CD2/CD3/CD28-активированных пробах с добавлением β-эстрадиола ( $10^{-7}$  -  $10^{-5}$  М).

Действие тестостерона на активированные наивные клетки в отношении экспрессии гена *hTERT* имело прямой дозозависимый эффект ( $r^2=0,89$ ,  $p<0,05$ ), повышая уровень относительной экспрессии мРНК гена *hTERT* в 16,1 раза при добавлении максимальной концентрации ( $10^{-6}$  М) (рисунок 19).

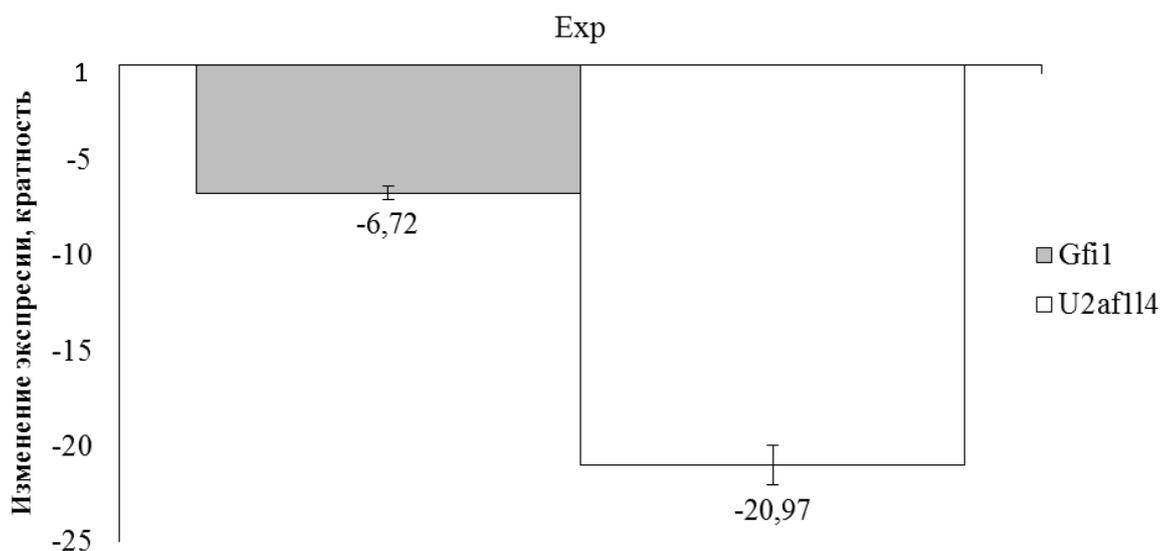
Инкубация  $CD45RA^+CD62L^+$  Т-лимфоцитов с  $\beta$ -эстрадиолом ( $10^{-9}$  -  $10^{-8}$  М) приводила к повышению экспрессии мРНК гена *hTERT* (в среднем, 2,4 и 3,2 раза). Более высокие дозы женского полового гормона ( $10^{-7}$  -  $10^{-5}$  М), напротив, оказывали супрессивный эффект и способствовали достоверному снижению транскрипции мРНК гена *hTERT* в  $CD45RA^+CD62L^+$  Т-клетках. Наиболее выраженный супрессивный эффект  $\beta$ -эстрадиол оказывал в своей максимальной концентрации ( $10^{-5}$  М) (рисунок 20).

### **3.6. Оценка влияния стероидных гормонов на экспрессию генов *Gfi1* и *U2af114* в культурах CD2/CD3/CD28-активированных $CD45RA^+CD62L^+$ Т-клеток**

Один из механизмов, регулирующих альтернативный сплайсинг гена *Ptprc*, основан на противоположном действии факторов: сплайсинга *U2af114* (U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1-like 4, *U2af114*) и транскрипции *Gfi1* (growth factor independent 1), что, в конечном итоге, определяет образование разных изоформ молекулы CD45 и активацию Т-клеток во время иммунного ответа (Heyd F. et al., 2006, Litvinova L.S., 2013).

Активация  $CD45RA^+CD62L^+$  Т-лимфоцитов комплексом анти-CD2/CD3/CD28 приводила к снижению уровней экспрессии мРНК генов *Gfi1* и *U2af114* по сравнению с контрольными цифрами (рисунок 21).

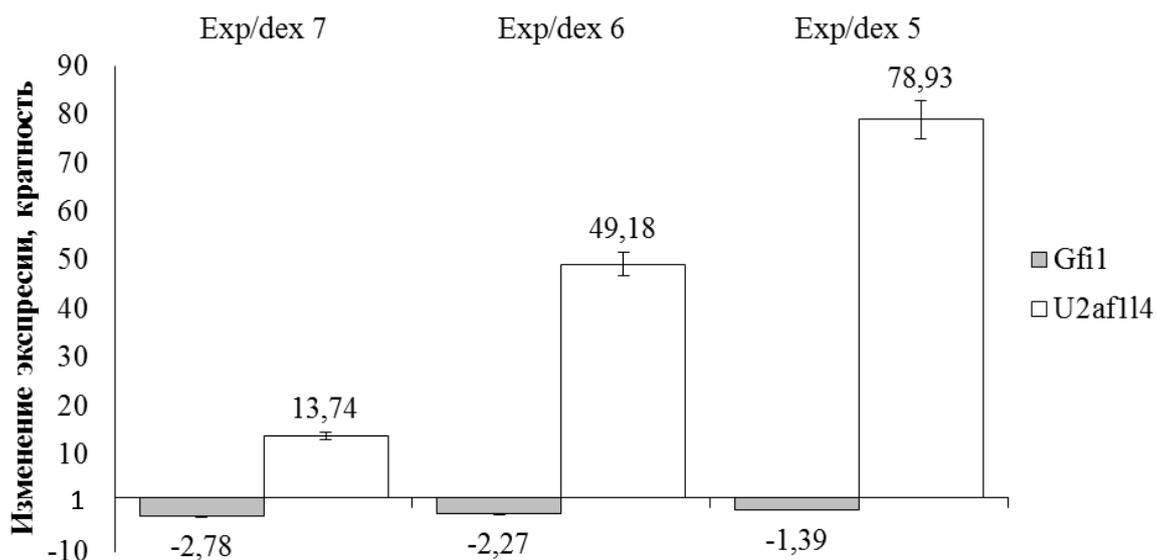
Культивирование наивных Т-клеток с дексаметазоном и активатором способствовало значительному снижению уровня относительной экспрессии мРНК гена *Gfi1*, по сравнению с активированной пробой (рисунок 22). Противоположный эффект дексаметазон оказывал на уровень относительной экспрессии мРНК гена *U2af114* (рисунок 22). При этом действие гормона носило дозозависимый характер ( $r^2=0,89$ ,  $p<0,05$ ) (рисунок 22).



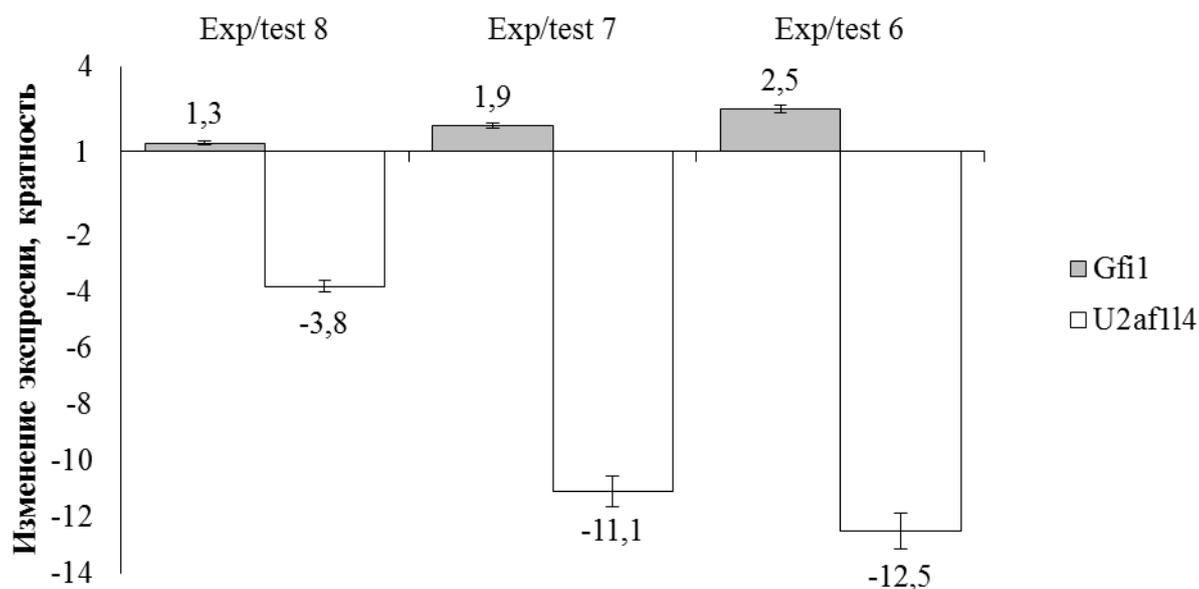
**Рисунок 21.** Изменение относительных уровней транскрипции генов *U2af114* и *Gfi1* в CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-клетках в условиях культивирования *in vitro* с добавлением активатора. Exp – отношение уровня экспрессии мРНК в интактных образцах (без воздействия) и образцов с добавлением Т-клеточного активатора (Exp).

Действие тестостерона на уровни экспрессии мРНК генов *Gfi1* и *U2af114* в культурах активированных CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, также носило разнонаправленный характер. В целом, тестостерон оказывал негативный эффект на экспрессию гена *U2af114*, и напротив, стимулирующий, на уровень транскрипции мРНК гена *Gfi1* (рисунок 23). Концентрации гормона -  $10^{-7}$  -  $10^{-6}$  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 23).

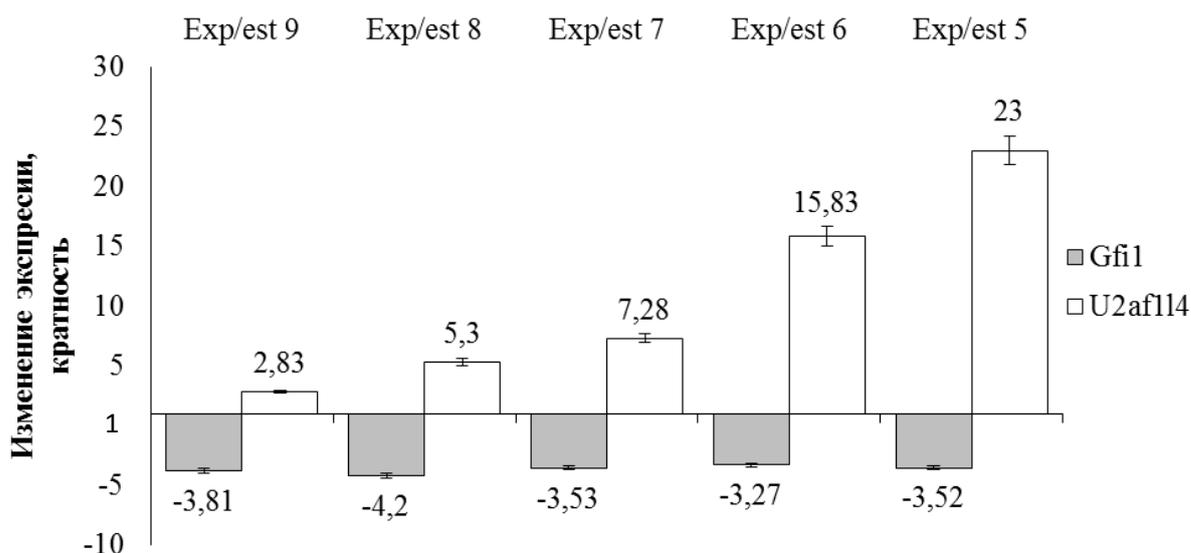
Культивирование CD2/CD3/CD28-активированных наивных (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-клеток в присутствии  $\beta$ -эстрадиола ( $10^{-9}$  -  $10^{-5}$  М) сопровождалось дозозависимым увеличением уровня относительной экспрессии мРНК гена *U2af114* ( $r^2=0,81$ ,  $p \leq 0,05$ ) в сравнении с показателями, полученными в культурах наивных клеток, инкубируемых только с активирующими частицами (рисунок 24). Эффекты женского полового гормона на экспрессию гена *Gfi1* носили равномерный супрессивный характер, независимо от действующей концентрации гормона (рисунок).



**Рисунок 22.** Изменение относительных уровней транскрипции мРНК генов *U2af114* и *Gfi1* в CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-клетках в условиях культивирования *in vitro* с добавлением активатора (Exp) и дексаметазона (dex) в различной концентрации (кратность); Exp/dex 7-5 – отношение уровней экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1* в образцах с добавлением Т-клеточного активатора и CD2/CD3/CD28-активированных пробах с добавлением дексаметазона ( $10^{-7}$  -  $10^{-5}$  М).



**Рисунок 23.** Изменение относительных уровней транскрипции мРНК генов *U2af114* и *Gfi1* в CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-клетках в условиях культивирования *in vitro* с добавлением активатора (Exp) и тестостерона (test) в различной концентрации (кратность); Exp/test 8-6 – отношение уровней экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1* в образцах с добавлением Т-клеточного активатора и CD2/CD3/CD28-активированных пробах с добавлением тестостерона ( $10^{-8}$  -  $10^{-6}$  М).



**Рисунок 24.** Изменение относительных уровней транскрипции мРНК генов *U2af114* и *Gfi1* в CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-клетках в условиях культивирования *in vitro* с добавлением активатора (Exp) и β-эстрадиола (est) в различной концентрации (кратность); Exp/est 9-5 – отношение уровней экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1* в образцах с добавлением Т-клеточного активатора и CD2/CD3/CD28-активированных пробах с добавлением β-эстрадиола (10<sup>-9</sup> - 10<sup>-5</sup> М).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя вышесказанное, следует заключить, что в ходе выполненного исследования получены данные, характеризующие дозозависимые эффекты стероидных гормонов (глюкокортикоидного - дексаметазона и половых: тестостерона и β-эстрадиола) на молекулярно-генетические и иммуноморфологические аспекты, определяющие процессы дифференцировки наивных Т-клеток, в условиях CD2/CD3/CD28 – стимуляции, ассоциированные с мембранной экспрессией молекул костимуляции/активации (CD28 и CD127) и изменением уровней транскрипции мРНК генов *U2af114*, *Gfi1* и *hTERT*, определяющих соотношение вариантов рецептора CD45.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Иммунная система обладает уникальным свойством защиты макроорганизма от антигенов инфекционной и неинфекционной природы, а так же от аутоклонов, путем их специфического распознавания и элиминации, обеспечивая стабильность гомеостаза, а также поддерживая многочисленные анатомо-функциональные связи с другими системами организма (Ройт А. и соавт. 2000; Хаитов Р.М. и соавт. 2000; Crotty S., Ahmed R., 2004; Ярилин А.А., 2010; Thomas JA, Badini M., 2011). Иммунный ответ, как правило, заключается в распознавании возбудителя или иного чужеродного материала и развертывании цепи реакций, направленных на их устранение (Галактионов В.Г., 1998; Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М., 2009; Селедцов В.И. и соавт. 2010; Ярилин А.А., 2010; Harris N., 2015; Bel S., Hooper L.V., 2015). В ходе развития нормального первичного иммунного ответа, в результате дифференцировки антиген-активированных наивных клеток-предшественниц, появляются эффекторные лимфоциты и Т-клетки памяти; основной функциональной характеристикой последних является быстрый и усиленный ответ на специфический антиген (Ярилин А.А., 1996, 1997; García-Berrocal J.R. et al., 1997; Carter L.L. et al., 1998; Sanders M.E. et al., 1988; Kimmig S. et al., 2002; Altemus M. et al., 2006; Хайдуков С.В., 2008; Сохоневич Н.А., 2015; Шуплецова В.В., 2015; Юрова К.А., 2015).

Молекула CD45 - трансмембранная тирозиновая протеинфосфатаза на иммунокомпетентных клетках признана критическим регулятором TCR-сигнализации, о чем свидетельствуют тяжелые иммунопатологические состояния, наблюдаемые у CD45-дефицитных людей и в экспериментальных модельных системах на животных (Mustelin T. et al., 2003; McNeill L. et al., 2007; Wu Z. et al., 2010). Ген *Ptpnc*, пре-мРНК которого состоит из 33 экзонов, кодирует лейкоцитарный рецептор CD45, и в ответ на активацию Т-клеток подвергается альтернативному сплайсингу (Hess K. et al., 2004; Motta-Mena B.L. et al., 2010; Butte J.M. et al., 2012), в результате которого возможна генерация восьми различных изоформ молекулы CD45 (Dornan S. et al., 2002), пять из которых присутствуют на лимфоцитах и определяют этапы дифференцировки Т-лимфоцитов (Heyd F. et al., 2006; Melton A.A. et al., 2007; Heyd F., Lynch W. K., 2010; Butte J.M. et al., 2012).

Стероидным гормонам принадлежит директивная роль в регуляции адаптивных иммунных реакций макроорганизма (Karagiannidis Y. et al., 2003; Fedor M.E. et al., 2006; Полевщиков А.В., 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; Finlay-Schultz J., Sartorius C.A., 2015; Giefing-Kröll C. et al., 2015). 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.

В нашем исследовании были использованы первичные клеточные культуры наивных Т-лимфоцитов ( $CD45RA^+CD62L^+$ ), полученные методом иммуномагнитной сепарации из МНК периферической крови условно здоровых доноров.

Для определения эффектов стероидных гормонов на процессы дифференцировки и созревания наивных ( $CD45RA^+CD62L^+$ ) Т-клеток, мы использовали активационную модель, ориентируясь на тот факт, что макроорганизм представляя собой многофакторную систему, которая постоянно подвергается антигенной нагрузке, что, по сути, является нормой. Наша активационная модель отражает процесс антиген-независимой активации Т-лимфоцитов, моделируемой добавлением в культуру клеток *in vitro* реагента – Т-клеточного активатора (*T-cell activation/expansion kit human*), содержащего частицы с лигандами к CD2, CD3 и CD28, имитирующими процесс костимуляции Т-клеток антиген-презентирующими клетками, в присутствии стероидных гормонов (дексаметазон, тестостерон и  $\beta$ -эстрадиол) в диапазоне их физиологических концентраций. Согласно данным научной периодики, плазменные концентрации стероидных гормонов, входящие в диапазон физиологических, варьируют в пределах -  $10^{-11}$  –  $10^{-6}$  М (Koolman J., Roehm K.H. 2006; Зильбернагель С., Деспопулос А., 2013). Однако необходимо отметить, что для большинства гормонов не существует стабильного базального уровня их концентраций, в таком

случае, корректней говорить об их секреторной динамике (Koolman J., Roehm K.H. 2006; Зильбернагель С., Деспопулос А., 2013). Выбор концентрационных характеристик стероидных гормонов, используемых в наших экспериментах обусловлен их средним уровнем в плазме крови, с учетом их суточных (циркадных), возрастных, половых, циклических, физиологических стрессовых 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).

### ***Роль TCR-активации в дифференцировке наивных Т-лимфоцитов: молекулярно-генетический и иммуно-морфологический аспекты***

Процессы активации, пролиферации и дифференцировки участников иммунного ответа – лимфоцитов, определяют сущность ответной иммунной реакции организма на различные агенты инфекционной и неинфекционной природы (Shipkova M, Wieland E., 2012; Литвинова Л.С. и соавт., 2014). Цикл функциональных изменений, которые происходят в ответ на антигенную стимуляцию Т-клеток, требует значительного изменения экспрессии множества белков. Молекула CD45 структурно близка к Т-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 Т-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). Наивные Т-лимфоциты на высоком уровне экспрессируют длинные, высокомолекулярные изоформы CD45 (CD45RA), тогда как активированные антигеном Т-клетки, преимущественно, короткий сплайс-вариант - CD45RO (Xu Z., Weiss A., 2002; Tong A. et al., 2005; Litvinova L.S. et al., 2013). В процессе регуляции альтернативного сплайсинга молекулы CD45, важная роль отведена совместным действиям вспомогательного фактора сплайсинга U2AF26 (U2 smallnuclear 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).

Согласно данным литературы, сплайсинг транскриптов, кодирующих молекулу CD45, значительно изменяется в ответ на продолжительную активацию Т-клеток (Hess K. et al., 2004; Motta-Mena B.L. et al., 2010; Butte J.M. et al., 2012). Нами установлено, что активация CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-лимфоцитов комплексом анти-CD2/CD3/CD28, наряду с противоположными по направленности протекающими/регистрируемыми процессами: пролиферацией и апоптозом (таблица 4), 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 21).

Следует отметить, что такая функциональная реакция клеток на TCR-активатор, ассоциированная с ростом числа клеток, с одной стороны и увеличением содержания мертвых клеток, с другой, вполне укладывается в рамки эффектов клеточного активатора на Т-лимфоциты. Имитируя действие антиген-презентирующих клеток, CD2/CD3/CD28-частицы стимулируют Т-клеточный рецептор (TCR) и корецепторные молекулы (CD28, CD58), что способствует формированию иммунного синапса, активации клетки и экспрессии многих генов, способствующих пролиферации лимфоцитов, в частности, IL-2 и его рецептора – IL-2-IL-2R (Ивашкин В.Т., 2008; Хаитов Р.М. и соавт., 2009; Хоченков Д.А., 2010; Ярилин А.А., 2010; Литвинова Л.С. и соавт., 2014). Тогда как TCR-индуцированное повышение числа мертвых Т-клеток в культурах наивных лимфоцитов обусловлено более высокой их чувствительностью к дисбалансу иницирующих сигналов, усиленных аутопродукцией IL-2 активированными Т-клетками (Самуилов В.И., 2000; Норкин М.Н. и соавт., 2002; Krueger A. et al., 2003; Bouillet Ph., O'Reilly L.A., 2009). Исследованиями Libri V. и соавт. (2011) показано, что стимуляция Т-клеточного рецептора антителами против CD3 в условиях *in vitro* сопровождается массовой гибелью наивных Т-клеток и терминально-активированных эффекторов - TEMRA CD4<sup>+</sup> - лимфоцитов (Libri V. et al., 2011). Выявленные нами изменения

являются результатом усиления активационно-индуцированного апоптоза, в процессе которого наблюдается повышение экспрессии молекулы CD95 на активированных Т-клетках и обуславливает дальнейшее развитие запрограммированной клеточной гибели (Норкин М.Н. и соавт., 2002; Krueger A. et al., 2003; Elmore S., 2007; Litvinova L.S. et al., 2013; Шуплецова В.В., 2015).

В связи с вышесказанным, мы предполагаем, что выявленное нами угнетение экспрессии обоих генов: *Gfi1* и *U2af114* в наивных (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-клетках в ответ на действие TCR-активатора, ассоциированное с повышенной гибелью Т-клеток и их пролиферацией, может свидетельствовать о дисбалансе, развивающемся на фоне многообразия иницирующих сигналов, следствием которых является синтез клеткой новых рецепторов, хемокинов, цитокинов и т.д., что, по всей вероятности, приводит к истощению резервного потенциала клетки.

*В то же время, один из механизмов угнетения экспрессии гена Gfi1 на фоне TCR-активации, может быть связан с временным фактором культивирования Т-клеточных культур.* Согласно данным литературы, после антигенной стимуляции в Т-клетках (через 24–72 ч) существенно активируется экспрессия гена фактора сплайсинга *U2AF26 - U2af114*, в то время как максимальная индукция синтеза белка *Gfi1* (с образованием различных изоформ) наблюдается через 6–12 ч и полностью отсутствует на третьи сутки (Heyd F. et al., 2006). Полученные нами ранее результаты на 48ч культуре мононуклеарных лейкоцитов крови (МНК) также демонстрируют активацию транскрипции *U2af114*, и, напротив, подавление его антагониста – *Gfi1* (Литвинова Л.С. и соавт., 2013; Юрова К.А., 2015).

*На наш взгляд, также нельзя игнорировать следующие предположения:* поскольку молекула CD45 - трансмембранная тирозинфосфатаза, выполнив свою основную функцию по дефосфорилированию киназ выводится из зоны иммунного синапса, то регуляция гена *Ptprc* после антигенной активации Т-клеток не является первостепенной (Ярилин А.А., 2010; Юрова К.А., 2015).

Логичным событием после активации наивных Т-клеток, наряду с экспансией специфических клонов, является их дифференцировка и созревание в эффекторные клетки (Ивашкин В.Т., 2008; Хаитов Р.М., 2009; Хоченков Д.А., 2010; Сохоневич Н.А., 2015). Выявленные нами изменения экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1*, опосредованные действием активирующих частиц, сопровождались

увеличением содержания дубль-позитивных лимфоцитов (CD45RA/RO) и клеток с фенотипом – CD45RO<sup>+</sup> (в среднем, в 2 раза), и напротив, снижением количества CD28- и CD127-экспрессирующих клеток в первичных культурах наивных лимфоцитов (по сравнению с интактной пробой) (таблицы 5 - 7).

Полагают, что переход к низко-молекулярным изоформам CD45 при активации, снижает фосфатазную активность рецептора CD45 и способствует ослаблению Т-клеточной сигнализации (Martinez M.N. et al., 2013): с Т-клетками, 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).

Молекула CD28 конститутивно экспрессируется на всех наивных Т-клетках и является первичным корецептором, опосредующим их позитивную костимуляцию (Ярилин А.А., 2010, Butte, J.M., 2012; Кудрявцев И.В., 2014). Тогда как молекула CD127 - является  $\alpha$ -цепью рецептора к IL-7 (IL-7R) (Surh C.D., Sprent J., 2008). В ходе первичного ответа, CD28 амплифицирует/усиливает сигнал через TCR, снижая тем самым, порог активации и увеличивая выживаемость Т-клеток с помощью позитивной регуляции таких антиапоптотических белков, как Bcl-XL и C-FLIP, защищая клетки от активационного апоптоза (Lumsden J.M. et al., 2000; Mittrucker H.-W. et al., 2001; Bertram E.M. et al., 2002; Halstead E.S. et al., 2002; Shedlock D.J. et al., 2003).

Рецепторы для большинства цитокинов  $\gamma$ -семейства индуцируются при активации Т-клеток, как антиген-зависимой, так и антиген-независимой (Сохоневич Н.А., 2015; Юрова К.А., 2015). Установлено быстрое увеличение экспрессии IL-2R $\alpha$ , IL-15R $\alpha$  и IL-2R $\beta$  на Т-клетках при TCR- активации, тогда как экспрессия IL-7R $\alpha$  на большинстве Т-клеток, напротив, снижается (Schluns K.S. et al., 2000; Kaech S.M. et al., 2003; Alves N.L. et al., 2007; Albareda M.C. et al., 2015). Известно, что лишь небольшая популяция активированных Т-клеток сохраняет экспрессию CD127 на должном уровне: в дальнейшем они дифференцируются в Т-клетки памяти (Schluns K.S. et al., 2000; Бойчук С.В., Дунаев П.Д., 2008; Osborne L.C., Abraham N., 2010; Carrette F., Surh C.D., 2012), а антиген-специфические

эффекторные клетки с фенотипом -  $IL-7R\alpha^{low}$ , подвергаются апоптозу в фазу сокращения иммунного ответа (Schluns K.S. et al., 2000; Kaech S.M. et al., 2003; Kondrack R.M. et al., 2003; Huster K.M. et al., 2004; Klonowski K.D. et al., 2006; Dooms H. et al., 2007). Возможно, выявленное нами увеличение числа мертвых клеток в популяции  $CD45RA^+CD62L^+$  Т-лимфоцитов, может быть связано с индуцированным активацией низким уровнем экспрессии  $IL-7R\alpha$  на наивных лимфоцитах (Kondrack R.M. et al., 2003; Huster K.M. et al., 2004; Klonowski K.D. et al., 2006; Dooms H. et al., 2007).

*Таким образом, процессам активации, дифференцировки и созревания наивных ( $CD45RA^+CD62L^+$ ) Т-клеток сопутствует потеря экспрессии поверхностных молекул костимуляции и активации, в частности,  $CD127$  и  $CD28$ , утрата экспрессии которых, по сути, означает частичное или полное отсутствие пролиферативной активности иммунокомпетентных клеток (Кудрявцев И.В., 2014; Сохоневич Н.А., 2015; Юрова К.А., 2015).*

Касаясь тематики, изучающей дифференцировку иммунокомпетентных клеток во время иммунного ответа, нельзя обойти вниманием фермент – теломеразу, который осуществляет функцию поддержания целостности хромосом (Shay J.W., Wright W.E., 2007; Gazzaniga F.S., Blackburn E.H., 2014). Постоянная теломеразная активность обнаруживается в эмбриональных, половых и стволовых клетках (Blasco M.A., 2005). Снижение активности теломеразы в одних клетках, либо абсолютное отсутствие экспрессии фермента, в других, приводят к тому, что длина теломер укорачивается при каждом клеточном делении, являясь, таким образом, детерминантой возраста клетки – определяя «репликативную историю» (Aubert G., Lansdorp P.M., 2008; Veirne C. et al., 2014; Paiva R.M., Calado R.T., 2014).

Т-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 V. et al., 2013). Самые *высокие уровни* теломеразной активности, сопоставимые с таковыми в трансформированных клеточных линиях, регистрируются у тимоцитов; *промежуточная* активность фермента присуща Т-клеткам вторичных лимфоидных органов, тогда как у периферических Т-лимфоцитов она детектируется *на низком уровне* (Weng et al., 1996; Benko A.L. et al., 2012).

Строгая регуляция экспрессии *TERT* способствует укорочению теломер и завершает репликативный потенциал антиген-специфических Т-клеток (Bodnar A.G. et al., 1996; Osterhage J.L., Friedman K.L., 2009). Ряд работ сообщают о тесной связи между индукцией активности теломеразы и стадией клеточного цикла Т-лимфоцитов (Cong Y.S. et al., 2002; Matsumura-Arioka Y.et.al., 2005; Королькова О.Ю. и соавт., 2007; Королькова О.Ю., 2011). Резкое увеличение активности фермента теломеразы (*TERT*) происходит при первичной стимуляции Т-лимфоцитов, последующие циклы активации вызывают меньшую экспрессию *TERT*, которая со временем становится трудно детектируемой как в клетках с прогрессирующим старением (Barsov E.V., 2011). В связи с тем, 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), в нашем исследовании мы предприняли попытку оценить влияние TCR-активатора и стероидных гормонов на экспрессию гена *hTERT*.

*Учитывая вышесказанное, значительное (в 78,6 раза) возрастание уровня относительной экспрессии мРНК гена hTERT (относительно интактной пробы) при активации CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-клеток анти-CD2/CD3/CD28-комплексом, наряду с усилением пролиферативной реакции, явилось вполне предсказуемым и описано в современной литературе (Weng et al., 1996; Benko A.L. et al., 2012). Основным механизмом выявленных изменений, предположительно, является IL-2 зависимая активация промотора гена hTERT (Matsumura-Arioka Y. et al., 2005; Кожевников В.С. и соавт., 2009). В то же время в исследованиях зарубежных авторов было показано, что индуцированная in vitro теломеразная активность ненадолго возникала после стимуляции, а затем снижалась со временем, даже если клетки продолжали интенсивно пролиферировать (Igarashi H., Sakaguchi N., 1996; 1997). Возникает закономерный вопрос, на который пока ответ не получен: всегда ли активация теломеразы in vivo сопряжена с пролиферативным процессом иммунокомпетентных клеток?*

Тем не менее, становится очевидным, что по мере дифференцировки клеток, наряду с утратой молекул костимуляции и пролиферации, происходит постепенное снижение активности теломеразы, и как следствие - укорочение длины теломер

(Ивашкин В.Т., 2008). Учитывая вышесказанное, мы предполагаем, что теломераза может опосредованно участвовать в процессах дифференцировки наивных Т-лимфоцитов, за счет регуляции механизма альтернативного сплайсинга гена *Ptprc*. Наше предположение подкреплено рядом найденных корреляционных зависимостей между изменением экспрессии исследуемых генов и фенотипическими проявлениями, характеризующими процессы дифференцировки и созревания Т-клеток. Интересно отметить тот факт, что эффективная конверсия фенотипа наивных ( $CD45RA^+CD62L^+$ ) Т-клеток, сопряженная с увеличением числа клеток с мембранной экспрессией дубль-позитивного ( $CD45RA/RO$ ) и только короткого варианта CD45 ( $CD45RO$ ), а также потеря поверхностных маркеров костимуляции/ активации ( $CD28$  и  $CD127$ ), происходили 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 заключении следует отметить, что в научной литературе факт неспецифической (антиген-независимой) активации и дифференцировки клонов Т-лимфоцитов активно обсуждается (Camargo 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.

Далее, согласно цели настоящего исследования, особый интерес для нас представляли данные о влиянии стероидных гормонов на молекулярно-генетические и иммуно-морфологические процессы дифференцировки и созревания наивных Т-клеток. Как уже подробно освещалось в обзоре литературы, стероидные гормоны оказывают разнонаправленные дозозависимые эффекты в отношении иммунных реакций (Феодоритова Е., 2002; Karagiannidis Y. et al., 2003; Sallusto F. et al., 2004; Fedor M.E. et al., 2006; Ярилин А.А., 2010; Литвинова Л.С. и соавт., 2011; van Mens S.P. et al., 2012), реализуемые через *геномные и негеномные* механизмы (Wherry E.J. et al., 2003; Fedor M.E. et al., 2010; Gruver-Yates A.L. et al., 2013; Ayroldi E. et al., 2014; Cheng Q. et al., 2014).

***Роль дексаметазона в дифференцировке наивных Т-лимфоцитов:  
молекулярно-генетический и иммуно-морфологический аспекты***

Глюкокортикоиды (ГК) относят к классу стероидных гормонов и проявляют себя как сильные иммуносупрессивные и противовоспалительные агенты, которые оказывают плеiotропное 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).

В нашей экспериментальной работе мы использовали дексаметазон, синтетический глюкокортикостероид — метилированное производное фторпреднизолона. Использование его в эксперименте оправдано тем фактом, что он, в отличие от кортизола и кортизона, устойчив в культуральной среде в течение длительного времени. Его действие, как и эффекты других ГК, в частности, на лимфоциты, опосредовано специфическими внутриклеточными рецепторами (GR), которые относятся к суперсемейству стероид/тиреоидных гормональных рецепторов и включают также рецепторы для половых стероидов, гормонов щитовидной железы, витамина D, минералокортикоидов и ретиноидов (Ashwell J.D. et al., 2000; Greenstein S., 2002; Калинина Н.М., Кетлинский С.А., 2008; Gruver-Yates A.L., Cidlowski J.A., 2013; Cheng Q. et al., 2014; Ayroldi E. et al., 2014), а также мембранными (GCRm) рецепторами (Distelhorst C.W., Dubyak G., 1998; Lowenberg M. et al., 2006; Stahn C., Buttgerit F., 2008; Gruver-Yates A.L., Cidlowski J.A., 2013; Mitre-Aguilar I.B. et al., 2015 ). В зависимости от плотности и разной

локализации своих рецепторов на всем многообразии типов клеток макроорганизма, ГК проявляют разнонаправленные эффекты: геномные или быстрые «негеномные» (Leussink V.I. et al., 2001; Dodiuk-Gad R.P. et al., 2015).

*При проведении сравнительного анализа действия дексаметазона на функциональную активность наивных Т-клеток, полученных у условно здоровых лиц, в зависимости от гендерных критериев, достоверных различий тестируемых параметров выявлено не было.*

Анализ действия дексаметазона на динамику уровней транскрипции мРНК генов *U2af114* и *Gfi1*, определяющих соотношение вариантов рецепторов CD45 в культурах TCR-активированных наивных Т-клеток позволил выявить значимые изменения. Так, инкубация TCR-активированных наивных Т-клеток с дексаметазоном приводила к снижению уровня относительной экспрессии мРНК гена *Gfi1*, по сравнению с пробой только с добавлением активирующих частиц (рисунок 22). Супрессивный эффект глюкокортикоида прослеживался во всем диапазоне физиологических концентраций ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  М). Противоположный эффект дексаметазон оказывал на уровень относительной экспрессии мРНК гена *U2af114* (рисунок 22). 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 приводило к достоверному росту числа переходных форм (CD45RA/RO) Т-клеток и клеток, экспрессирующих конечную изоформу рецептора - CD45RO (таблица 7). 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).

Интересной оказалась реакция TCR-активированных наивных Т-клеток на добавление дексаметазона, в отношении экспрессии гена *hTERT*. Так, инкубация TCR-активированных CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> клеток с дексаметазоном ( $10^{-7}$  -  $10^{-5}$  М), в целом, приводила к снижению относительного уровня экспрессии мРНК гена *hTERT* (рисунок 18).

Факт угнетения дексаметазоном экспрессии мРНК гена *hTERT* представляется вполне логичными и имеет следующее обоснование. Установлено, что дексаметазон обладает способностью подавлять продукцию IL-2

активированными Т-клетками (Baus E. et al., 1996; Arzt E. et al., 2000; Tang Q. et al., 2008; Creed T.J. et al., 2009; Гуцол А.А. и соавт., 2013), а также экспрессию гена IL-2Ra (Boumpas D.T. et al., 1991; Batuman O.A. et al., 1994), воздействуя на транскрипцию гена IL-2 (ингибируя транскрипционные факторы AP-1 и NF-kB, активирующие промотор гена IL-2) и на раннюю стадию каскада сигнальной трансдукции, инициированной TCR-активацией (Redondo J.M. et al., 1988; Arends M.J., Wyllie A.H., 1991; Paliogianni F. et al., 1993; Simon A.K. et al., 2001; Шуплецова В.В., 2015). В то же время, как мы уже описывали ранее, IL-2-зависимая активация промотора гена *hTERT* необходима для предотвращения репликативного старения клеток (Matsumura-Arioka Y. et al., 2005).

При выявленных изменениях уровней экспрессии изучаемых генов и конверсии фенотипа наивных клеток, дексаметазон (в диапазоне физиологических концентраций) не влиял значимо на пролиферацию TCR-активированных наивных Т-лимфоцитов (по сравнению с реакцией клеток, подвергшихся только влиянию активатора) (таблица 4). *Наряду с блокирующим влиянием дексаметазона на систему IL-2-IL-2Ra, этот факт можно интерпретировать способностью гормона вызывать модификацию кальциевого сигнала, за счет угнетения активности Lck-киназы, и соответственно, экспрессии IP3 рецептора, и, как следствие блокируется TCR-опосредованный сигнал и фаза пролиферации (клональной экспансии)* (Harr M.W. et al., 2009).

В то же время инкубация TCR-сенситивизированных Т-лимфоцитов с дексаметазоном ( $10^{-6}$  и  $10^{-5}$  М), сопровождалась значимым увеличением числа живых Т-лимфоцитов в первичных культурах, по сравнению с пробами только с добавлением активирующих частиц (таблица 4). В целом, согласно данным литературы, глюкокортикоиды являются сильными индукторами апоптоза во многих типах клеток и тканей. Чувствительными к действию ГК, в основном, являются гены, обеспечивающие переход G<sub>1</sub>-периода в S-фазу (Dowd D.R., Miesfeld R.L., 1992; Evan G., Littlewood T., 1998; Kofler R., 2000). Интересно, что некоторые типы клеток имеют антиапоптотический (цитопротекторный) ответ на глюкокортикоиды (Bjelaković G. et al., 2010; Gruver-Yates A.L., Cidlowski J.A., 2013; Cao Y. et al., 2013; Zen M. et al., 2011).

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  $\alpha$ -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). Интересным является тот факт, что угнетение экспрессии IL-7R $\alpha$  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). В то же время, формирование комплекса - IL-7-IL-7R приводит к усилению TCR-индуцированной передачи сигналов при прайминге активированных Т-клеток, стимулируя их к пролиферации и продукции IL-2 (Fry T.J., Mackall C.L., 2001).

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). *Следует отметить, что влияние дексаметазона на культуру активированных Т-клеток сопровождалось лишь тенденцией к увеличению числа CD127<sup>+</sup> Т-клеток по сравнению с действием только активатора, однако различия имели недостоверный характер* (таблица 5).

Дексаметазон ( $10^{-6}$  -  $10^{-5}$  М) в комбинации с активатором, приводил к достоверному снижению количества CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> клеток по сравнению с пробами только с добавлением активирующих частиц (таблица 6). Изменения экспрессии молекулы CD28<sup>+</sup> наивными клетками при добавлении в культуры

минимальной концентрации гормона ( $10^{-7}$  М) носили недостоверный характер и были сопоставимы со значениями, полученными при добавлении только активатора (таблица 6).

В этой связи, особого внимания заслуживают обнаруженные нами 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 дексаметазона в максимально допустимой физиологической концентрации ( $10^{-5}$  М). 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<sup>+</sup> 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.

*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/или CD45RO Т-клеток и, напротив, снижению содержания CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> Т-клеток, поддерживая при этом численное постоянство Т-клеток, экспрессирующих IL-7Ra (CD127<sup>+</sup>). Выявленные нами изменения могут свидетельствовать о глюкокортикоид-опосредованной дифференцировке и созревании наивных (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-лимфоцитов, на фоне TCR-активации.*

### ***Роль β-эстрадиола в дифференцировке наивных Т-лимфоцитов: молекулярно-генетический и иммуно-морфологический аспекты***

Половые гормоны, наряду с глюкокортикостероидами, являются одними из ключевых дирижеров иммунных реакций, влияя на способность зрелых эффекторных клеток к реализации иммунного ответа (Grossman et al., 1994; Селедцов и соавт., 2010; Litvinova L.S et al., 2013; Giefing-Kröll C. et al., 2015). Следует подчеркнуть, что 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; Furman D., 2015). Установлено, что самки по сравнению с самцами имеют сильный клеточно-опосредованный иммунный ответ с более значительной продукцией антител при антигенной стимуляции и обладают высокой склонностью к развитию аутоиммунных заболеваний (Roden A.C. et al., 2004; Lai J.J. et al., 2012; Zhao S. et al., 2014; Giefing-Kröll C. et al., 2015). В отличие от женщин, мужчины имеют более высокий риск развития сепсиса, острых респираторных заболеваний, нарушений функций внутренних органов вследствие травм мягких тканей, геморрагического и термического шока (Peterson M.P. et al., 2013; Furman D. et al., 2014; Zhao S. et al., 2014).

Женские половые гормоны - эстрогены, участвуют в регуляции процессов созревания, дифференциации, активации и пролиферации лимфоидных клеток (McMurray R.W. et al., 2001; Priyanka H.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, что предполагает зависимость функциональной активности Т-лимфоцитов от концентрации эстрогенов (Priyanka H.P. et al., 2013).

*При проведении сравнительного анализа действия  $\beta$ -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).*

*Следует немного остановиться на диапазоне концентраций  $\beta$ -эстрадиола (Sigma, USA), используемых в нашем *in vitro* эксперименте. Как уже упоминалось во 2 главе (Материалы и методы исследований), нами был взят диапазон концентраций  $\beta$ -эстрадиола -  $10^{-9}$  -  $10^{-5}$ М. Следует уточнить, что физиологический диапазон эстрогенов включает разброс концентрации  $10^{-9}$  -  $10^{-6}$ М (Кэтгайл В.М., Арки Р.А., 2001; Камкин А.Г., Каменский А.А., 2004; Кишкун, А.А., 2007; Зильбернагель С., Деспопулос А., 2013). При этом дозы  $10^{-7}$ -  $10^{-6}$ М соответствуют концентрациям  $\beta$ -эстрадиола в последнем триместре*

беременности, тогда как  $10^{-9}$ - $10^{-8}$ М - определенным фазам менструального цикла (лютеиновая, фолликулярная фазы). Используемая нами в эксперименте доза  $\beta$ -эстрадиола -  $10^{-5}$ М, значимо превышает физиологический диапазон и соответствует терапевтической концентрации эстрогенов, используемой в препаратах для лечения эстрогеновой недостаточности (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  $\beta$ -эстрадиола ( $10^{-9}$  -  $10^{-5}$  М) сопровождалось дозозависимым увеличением уровня относительной экспрессии мРНК гена *U2af114* ( $r^2=0,81$ ,  $p\leq 0,05$ ) в сравнении с показателями, полученными в культурах наивных клеток, инкубируемых только с активирующими частицами (рисунок 24). Эффекты женского полового гормона на экспрессию гена *Gfi1* носили равномерный супрессивный характер, независимо от действующей концентрации гормона (рисунок 24), что может быть связано, как уже упоминалось ранее, с временным фактором культивирования (Heyd F. et al., 2006; Litvinova L.S. et al., 2013; Юрова К.А., 2015).

$\beta$ -эстрадиол-опосредованное ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  М) повышение уровней экспрессии мРНК гена *U2af114* в TCR-активированных культурах наивных Т-клеток было ассоциировано с достоверным увеличением числа дубль-позитивных ( $CD45RA/RO$ ) клеток и содержанием  $CD45RO^+$ -клеток, по сравнению с пробами только с добавлением активатора ( $r=0,67$ ,  $r=0,75$ ,  $r=0,65$ , для концентраций гормона -  $10^{-7}$ - $10^{-5}$  М,  $p<0,05$  во всех случаях, соответственно) (таблица 7).

Следует отметить, что сочетанное добавление активатора и  $\beta$ -эстрадиола в концентрациях -  $10^{-6}$  и  $10^{-5}$ М в культуры  $CD45RA^+CD62L^+$  Т-лимфоцитов, сопровождалось резким снижением числа живых лимфоцитов (до 30,75 (28,34 - 34,24) и 10,54 (7,98 - 18,16)%, соответственно), на фоне усиления пролиферативной реакции Т-клеток (таблица 4). Вышеописанные изменения морфофункциональной реакции наивных Т-клеток на добавление женского полового гормона ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  М) 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 (таблицы 5, 6). Добавление максимальной концентрации женского полового гормона ( $10^{-5}$  М), соответствующей терапевтической дозе, используемой при лечении эстрогенной недостаточности, приводило к наиболее выраженному снижению исследуемых параметров: CD127-позитивных лимфоцитов - до 55,69 (45,19 - 61,66) и CD28<sup>+</sup> Т-клеток – до 44,32 (42,34 - 48,22) %, соответственно (таблицы 5, 6).

Мы предполагаем, что выявленное нами изменения экспрессионного профиля и фенотипических детерминант Т-клеток, опосредованные действием  $\beta$ -эстрадиола ( $10^{-7}$  -  $10^{-5}$ М), сопровождающееся снижением числа CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> и CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup> 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. *Данный тезис подтверждается фактами позитивной корреляции между уровнями относительной экспрессии мРНК гена U2af114 и числом дубль-позитивных (CD45RA/RO) Т-клеток ( $r=0,605$ ,  $r=0,620$ ,  $r=0,760$ ,  $p<0,05$  во всех случаях при действии  $\beta$ -эстрадиола -  $10^{-7}$ - $10^{-5}$  М, соответственно) и отрицательной между уровнем экспрессии мРНК гена U2af114 и содержанием CD28<sup>+</sup> ( $r=-0,650$ ,  $r=-0,870$ ,  $p<0,05$  во всех случаях при действии  $\beta$ -эстрадиола -  $10^{-6}$ - $10^{-5}$  М, соответственно). Кроме того, нами обнаружены отрицательные корреляции между уровнем экспрессии мРНК гена Gfi1 и числом CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток ( $r=-0,56$ ,  $r=-0,70$ ,  $p<0,05$  во всех случаях при действии  $\beta$ -эстрадиола -  $10^{-6}$ - $10^{-5}$  М, соответственно).*

*Возможно, снижение клеток, экспрессирующих молекулы активации и костимуляции (CD127<sup>+</sup> и CD28<sup>+</sup>), 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 и  $r=0,81$ ,  $r=0,73$  для  $10^{-5}$  М  $\beta$ -эстрадиола,  $p<0,05$  во всех случаях, соответственно). В литературе описано, что при гибели клеток происходит слищивание/потеря рецепторных структур (Кудрявцев И.В., 2014).*

Тогда как действие женского гормона в дозах, соответствующих *нижнему* диапазону физиологических ( $10^{-9}$ - $10^{-8}$  М), было противоположным: инкубация TCR-активированных CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> и CD28<sup>+</sup> - экспрессирующих Т-клеток по сравнению с пробами только при добавлении активатора (таблицы 4 - 6). 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<sup>+</sup> Т-клеток было сопоставимо с их содержанием при действии только активатора (таблица 7).

В контексте изучаемой тематики, касающейся аспектов дифференцировки наивных Т-клеток, вызывает интерес действие β-эстрадиола на активность теломеразы (Meeker A.K. et al., 1996; Kyo S. et al., 1997; Kyo S. et al., 1999; Misiti S. et al., 2000; Cong Y.S. et al., 2002; Sato R. et al., 2004). Выявлен предполагаемый функциональный элемент ответа на эстроген (ERE), который способен связывать *in vitro* человеческий рецептор эстрогена Era (но не Erβ). *In vivo* установили модификацию ERE-региона в Era-позитивных клетках после действия 17β-эстрадиола, что свидетельствует об эстроген-зависимом ремоделировании хроматина (Misiti S. et al., 2000; Xu D. et al., 2014).

Дозы женского полового гормона β-эстрадиола ( $10^{-7}$  -  $10^{-6}$  М), соответствующие верхнему физиологическому диапазону и  $10^{-5}$  М (терапевтическая доза, применяемая при лечении эстрогеновой недостаточности), оказывали *выраженное супрессивное действие* на транскрипцию мРНК гена *hTERT* в TCR-активированных CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-клетках, по сравнению с пробами только в присутствии клеточного активатора. Наиболее выраженный эффект β-эстрадиол оказывал в своей максимальной концентрации -  $10^{-5}$  М, снижая уровень экспрессии исследуемого гена в 235 раз в сравнении с контрольным уровнем. 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<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-клеток, в частности, при действии гормона в концентрациях -

$10^{-6}$  -  $10^{-5}$  М (таблица 4, рисунок 19).

Ингибирующий эффект высоких концентраций  $\beta$ -эстрадиола на экспрессию гена *hTERT*, возможно, ассоциирован с его супрессивным влиянием на этап ранней активации наивных Т-клеток, сопряжённый с системой IL-2/IL-2R $\alpha$  (Шуплецова В.В., 2015). Кроме того, согласно полученным нами ранее данным и сведениям современной литературы, для эстрадиола характерна активация IL-2-независимой пролиферации клеток, предполагаемые механизмы которой могут быть обеспечены негеномными быстрыми эффектами  $\beta$ -эстрадиола (Шуплецова В.В., 2015). Автор делает предположение об эстрадиол-индуцированном сокращении репликативного потенциала наивных клеток на фоне активирующих TCR-сигналов (Шуплецова В.В., 2015). В подтверждение этому тезису, нами были выявлены отрицательные взаимосвязи между уровнем экспрессии мРНК гена *hTERT* и общим числом клеток (в мл) при действии гормона в концентрациях  $10^{-6}$  -  $10^{-5}$  М ( $r=0,67$ ,  $r=0,83$ ,  $p<0,05$ , соответственно).

Данные литературы, освещающие такую реакцию иммунокомпетентных клеток на эстрогены, весьма немногочисленны. Чернышов В.П. и соавт. (2001) показали, что физиологических концентрациях эстрадиол стимулирует митоз в популяциях иммунокомпетентных клеток (Chernyshov V.P. et al., 2001). Эти данные были подтверждены Cutolo M. и соавт. (2004): они показали, что  $17\beta$ -эстрадиол усиливает экспрессию маркеров роста и пролиферации клеток, в то время как мужской половой гормон – тестостерон, опосредует увеличение молекул, указывающих на повреждение ДНК и развитие апоптоза (Cutolo M. et al., 2004).

Инкубация TCR-активированных CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-лимфоцитов с  $\beta$ -эстрадиолом в концентрациях ( $10^{-9}$  и  $10^{-8}$  М), соответствующим минимальному порогу физиологического диапазона, 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 ( $p<0,05$ ) (таблица 4, рисунок 19).

Попытки оценить эффекты эстрогенов на экспрессию теломеразы и ее активность в лимфоцитах человека были предприняты несколькими исследовательскими коллективами. Полученные данные оказались весьма противоречивыми (Effros R.B. et al., 2005; Choi J. et al., 2008; Calado R.T. et al.,

2009). Коллектив авторов не обнаружил доказательств прямого влияния физиологических концентраций эстрадиола на экспрессию мРНК гена *hTERT*, количество белка *hTERT* и ферментативную активность теломеразы в культуре мононуклеаров периферической крови человека. Высказано предположение, что эстрогены (в частности,  $\beta$ -эстрадиол) воздействуют на процесс развития Т-клеток, изменяя активность теломеразы в ответ на TCR-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  $\alpha$ -изоформой рецептора эстрогена (ER $\alpha$ ). 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 кроветворных 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  $\beta$ -эстрадиола ( $10^{-7}$  -  $10^{-5}$  М) ( $r=0,70$ ,  $r=0,65$ ,  $r=0,81$ ,  $p<0,05$  во всех случаях, соответственно), а также негативная, между экспрессией гена *hTERT* и числом CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток при действии  $\beta$ -эстрадиола ( $10^{-6}$  -  $10^{-5}$  М) ( $r=0,52$ ,  $r=0,76$ ,  $p<0,05$  во всех случаях, соответственно), 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  $\beta$ -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). Так, еще в прошлом столетии было 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 (Grossman C.J. et al, 1994; Anderson D.J., 2000; Kincade P.W. et al., 2000; Chernyshov V.P. et al., 2001; Karagiannidis C., Akdis M., 2004; 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). В костном мозге отмечено существование гормонально-чувствительной критической точки дифференциации лимфоцитов (Grossman C.J. et al., 1994; Kincade P.W. et al., 2000).

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).

Ядерные рецепторы к эстрадиолу (ERS)  $\alpha$  и  $\beta$  сверхэкспрессированы на иммунокомпетентных клетках (Cunningham M., Gilkeson G., 2011), включая лимфоциты человека и мыши (Danel L. et al., 1983; Cohen J.H. et al., 1983; Stimson W.H., 1988; Couse J.F. et al., 1997). ERs образуют комплексы в определенных участках ДНК с хроматин-модифицирующими корегуляторами и другими факторами транскрипции, что приводит к эпигенетическим модификациям хроматина, а также инициации транскрипции многих генов (Mann M. et al., 2011; Prossnitz E.R. et al., 2011). Относительно недавно, механизмы действия ERs на специфических сайтах ДНК были раскрыты в работе L. Magnani (2014) с использованием специфической линии эпигенетических меток (через пост-трансляционную модификацию гистонов) регуляторных элементов ДНК, которые активируют основные факторы (FOXA1, Pbx1, AP-2 $\gamma$ , TLE1, PBX1 и GATA3), реконструирующие уплотнение хроматина и увеличивая доступ к конкретным участкам ДНК для транскрипционных факторов, таких как ER $\alpha$  (Magnani L., Lupien

М., 2014). Основным эндогенным эстрогеном,  $17\beta$ -эстрадиол (E2), с одинаковой афинностью связывается с ER $\alpha$  и ER $\beta$ . Через ER $\alpha$  - эстрогены стимулируют пролиферацию, сигнализация через ER $\beta$  ингибирует пролиферацию, активируя апоптоз (Yakimchuk K. et al., 2013; Prossnitz E.R. et al., 2011; Priyanka H.P. et al., 2013). Экспрессия ERs на клетках иммунной системы дифференциальная: на CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках наблюдается сверхэкспрессия ER $\alpha$ , на В-клетках – ER $\beta$  (Cunningham M., Gilkeson G., 2011). Кроме того, перераспределение изоформ высокоаффинных эстрогенных рецепторов на мембранах «зрелых» лимфоцитов определяет специфичность их действия на разные субпопуляции Т-лимфоцитов (Anderson D.J., 2000; Chernyshov V.P. et al., 2001). Для эстрогенов характерны также быстрые (от секунд до минут) неядерные ("негеномные") эффекты - мембранно-иницированная стероидная сигнализация (MISS) (Kovats S., 2015), которые включают в себя мобилизацию внутриклеточного кальция, образование cAMP, модуляцию калиевых каналов, активацию фосфолипазы C, оксида азота и стимуляцию протеинкиназ PI3K / АКТ и ERK (Ueda K., Karas R.H., 2013).

*Таким образом, эффекты женского полового гормона -  $\beta$ -эстрадиола, оказываемые на параметры TCR-активированных CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> 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  $\beta$ -эстрадиола ( $10^{-7}$  -  $10^{-6}$  М), сопровождающиеся высокой гибелью CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> 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, 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 T-клеточный рецептор в премированном состоянии для распознавания антигена, препятствуя их поликлональной дифференцировке в T-клетки памяти и сохраняя их высокий репликативный потенциал.

### ***Роль тестостерона в дифференцировке наивных T-лимфоцитов: молекулярно-генетический и иммуно-морфологический аспекты***

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). В то же время 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, T - и B- лимфоциты (Viselli S.M. et al., 1997; Mantalaris A. et al., 2001; 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). Безусловно, следует учитывать противоречивость сведений о распространённости AR на клетках иммунной системы. Исследования Olsen N.J. и Kovacs W.J. (2001) свидетельствуют, что экспрессия AR зарегистрирована в лимфоидных и нелимфоидных клетках тимуса и костного мозга, но не в зрелых лимфоцитах периферической крови (Olsen N.J., Kovacs W.J., 2001). Другие ученые не обнаружили экспрессии AR на тимоцитах (Grossman C.J. et al., 1979; McCruden A.V. et al., 1984). Напротив, выявлена слабая экспрессия мРНК гена AR в периферических T-клетках (Bebo V.F. et al., 1999). Относительно недавно было установлено, что циркулирующие уровни половых гормонов могут влиять на выход T-клеток из тимуса (Olsen N.J., Kovacs W.J., 2011; Dumont-Lagacé M. et al., 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; Кишкун, А.А., 2007; Зильбернагель С., Деспопулос А., 2013).

При проведении сравнительного анализа действия тестостерона на функциональную активность наивных Т-клеток, полученных у условно здоровых лиц, в зависимости от гендерных критериев, достоверных различий тестируемых параметров выявлено не было.

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 23). 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 23). 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 7). В отношении числа клеток, экспрессирующих молекулы костимуляции (CD28) и активации (CD127), регистрировалось их увеличение, однако эти изменения носили недостоверный характер (таблицы 5, 6). 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 (таблицы 5 - 7; рисунок 23).

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, Шуплецов В.В. и соавт. (2015), было установлено, что тестостерон в широком диапазоне действующих концентраций снижал число живых клеток в культурах TCR-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. *In vitro*, лимфоциты кастрированных мышей пролиферируют более интенсивно, чем Т-клетки нормальных мужских особей, независимо от моделей активации (Roden A.C. et al., 2004; Lai J.J. et al., 2012). Предполагают, что один из механизмов его действия связан с ингибированием IL-2 – IL-2R системы на уровне транскрипции, за счет подавления экспрессии фактора NF- $\kappa$ 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). В экспериментальных моделях геморрагического шока и ожога, выполненных на мышах, при которых пролиферация Т-клеток и гиперчувствительность замедленного типа были подавлены, блокада AR восстанавливала Т-клеточную реакцию, которая сопровождалась увеличением продукции IL-2 и экспрессией IL-2R в Т-клетках (Angele M.K. et al., 2000; Messingham K.A. et al., 2001). Кроме того, установлено, что тестостерон дозозависимым образом подавляет фагоцитоз и продукцию нитритов, а также митоген-индуцированную пролиферацию лимфоцитов селезенки в модельной системе, выполненной на рептилиях (водяная змея *Natrix piscator*) (Tripathi M.K., Singh R., 2014). Авторы предполагают, что тестостерон-индуцированное подавление иммунных реакций может быть представлено как физиологический механизм, регулирующий относительную сумму энергии, которая инвестируется или в репродукцию или в реализацию иммунных реакций (Tripathi M.K., Singh R., 2014). 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).

Интересно, что в нашем 48ч эксперименте тестостерон, в использованных концентрациях ( $10^{-8}$  -  $10^{-6}$  М), приближенных к физиологическому диапазону, не влиял существенно на такие клеточные характеристики, как жизнеспособность и общее количество (в мл) CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-клеток (таблица 4).

Следует отметить, что добавление тестостерона в культуры активированных CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-клеток сопровождалось дозозависимым повышением экспрессии мРНК гена *hTERT* ( $r^2=0,89$ ,  $p<0,05$ ) (рисунок 19). Самый высокий уровень экспрессии каталитической субъединицы фермента теломеразы регистрировался при добавлении  $10^{-6}$  М гормона (рисунок 19).

Несколькими коллективами выявлено, что в условиях *in vivo* имеет место следующий механизм: андрогены ферментативно, 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). В серии экспериментов Calado R.T. и соавт. (2009) продемонстрировали стимулирующий эффект андрогенов на экспрессию гена теломеразы и ее ферментативную активность в нормальных и мутантных TERT-лимфоцитах периферической крови человека и в CD34-клетках костного мозга (Calado R.T. et al., 2009). Они доказали, что эффекты тестостерона могут быть предотвращены блокадой рецептора эстрогена (ER) или добавлением ингибитора ароматазы.

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 *U2af1l4* ( $r=-0,68$ ,  $r=-0,61$ , при действии  $10^{-7}$  и  $10^{-6}$  М тестостерона  $p<0,05$  во всех случаях, соответственно). Кроме того, нами выявлены ряд закономерностей между исследуемыми параметрами: отрицательная взаимосвязь между уровнем относительной экспрессии генов *hTERT* и *Gfi1* с числом CD45RO<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>

*CD127<sup>+</sup> - экспрессирующих T-клеток при действии 10<sup>-7</sup> - 10<sup>-6</sup> М тестостерона (r=0,65, r=0,58 при действии 10<sup>-7</sup> М тестостерона; r=0,72, r=0,64 при действии 10<sup>-6</sup> М тестостерона, p<0,05 во всех случаях, соответственно), а также между уровнем относительной экспрессии мРНК гена *Gfi1* и числом CD28<sup>+</sup> T-клеток при действии 10<sup>-6</sup> М гормона (r=0,68, p<0,05)*

*Таким образом, выявленные нами изменения, свидетельствуют о том, что тестостерон, во всем спектре физиологических концентраций (10<sup>-8</sup> - 10<sup>-6</sup> М), предотвращает дифференцировку и созревание зрелых наивных T-клеток периферической крови в T-клетки памяти. Его эффекты на дифференцировку TCR-активированных наивных T-клеток опосредованы влиянием на активность генов: угнетающим на уровень экспрессии мРНК гена *U2af114* и стимулирующим, на экспрессию генов *hTERT* и *Gfi1*. Выявленные изменения экспрессии исследуемых генов фенотипически проявляются достоверным снижением числа дубль-позитивных и CD45RO<sup>+</sup> T-клеток, при неизменном содержании T-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. Наше исследование позволило выявить, что индуцированные стероидными гормонами процессы дифференцировки и созревания наивных (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) 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<sup>+</sup> Т-клеток, при снижении числа Т-лимфоцитов, экспрессирующих молекулы костимуляции и активации (CD28 и CD127). Продемонстрирована однонаправленность изменений в отношении активности генов *Gfi1* и *hTERT*, и напротив, разнонаправленная динамика - *U2af114* и *hTERT*, в наивных (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-клетках (рисунок 25).

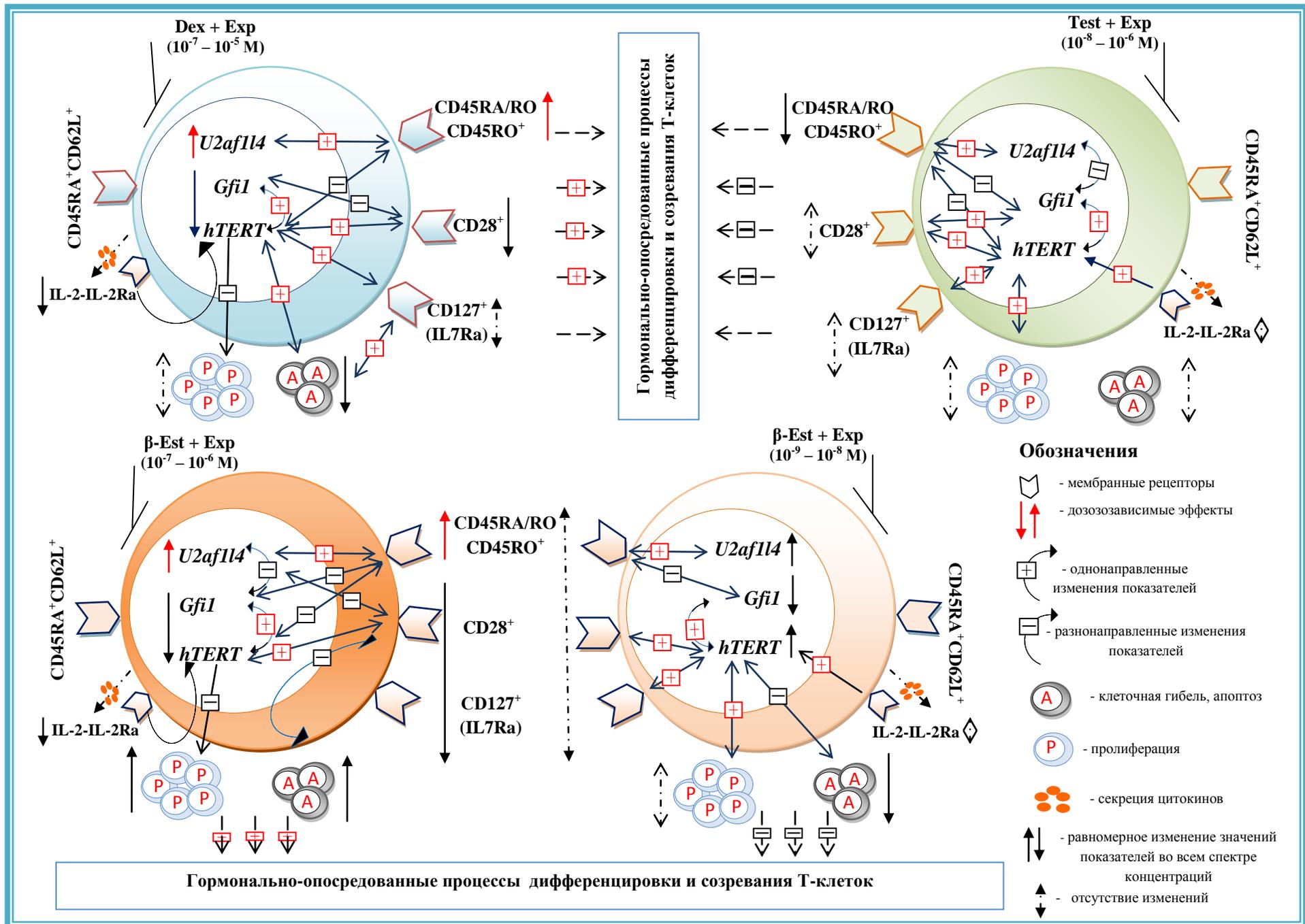
Установлено, что *in vitro* на фоне TCR-активации, глюкокортикоид дексаметазон, во всем спектре физиологических концентраций ( $10^{-7} - 10^{-5}$  М), увеличивая уровень экспрессии мРНК гена *U2af114* и угнетая экспрессию генов *Gfi1* и *hTERT*, способствует росту числа переходных форм Т-лимфоцитов (CD45RA/RO) и CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток и, напротив, снижению содержания CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, поддерживая при этом численное постоянство CD127<sup>+</sup>-экспрессирующих Т-клеток. Выявленные нами изменения свидетельствуют о глюкокортикоид-опосредованной дифференцировке и созревании наивных (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-лимфоцитов, на фоне TCR-активации (рисунок 25).

Эффекты женского полового гормона - β-эстрадиола, оказываемые на параметры TCR-активированных CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-клеток, определяющие процессы их активации, пролиферации, дифференцировки и гибели, имеют четкую зависимость от концентрации гормона. Показано, что β-эстрадиол в физиологических концентрациях  $10^{-7} - 10^{-6}$  М, соответствующих III триместру беременности, при действии *in vitro* на TCR-активированные наивные (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-лимфоциты, наряду с параллельно протекающими процессами – пролиферацией и апоптозом, способствует их дифференцировке и созреванию за счет активации гена *U2af114* и, напротив, супрессии - *Gfi1* и *hTERT*,

что находит свое подтверждение в конверсии фенотипических детерминант Т-клеток: регистрируется снижение числа CD28<sup>+</sup>, CD127<sup>+</sup> Т-клеток и увеличение CD45RO<sup>+</sup> и дубль-позитивных (CD45RA/RO) Т-лимфоцитов.  $\beta$ -эстрадиол, используемый в дозах -  $10^{-9}$  –  $10^{-8}$  М, соответствующих фазам нормального менструального цикла, напротив, предотвращает поликлональную дифференцировку наивных Т-клеток в эффекторы и Т-клетки памяти, индуцированную TCR-активацией, сохраняя на наивных клетках экспрессию изоформы рецептора CD45 - CD45RA с высокой фосфатазной активностью, а также экспрессию молекул костимуляции и активации Т-клеток (CD28; CD127).

*Тестостерон*, во всем спектре физиологических концентраций ( $10^{-8}$  -  $10^{-6}$  М), предотвращает дифференцировку и созревание наивных Т-клеток периферической крови. Его эффекты опосредованы влиянием на активность генов: супрессивным на уровень экспрессии мРНК гена *U2af114* и стимулирующим - на экспрессию генов *hTERT* и *Gfi1*. Выявленные изменения экспрессии исследуемых генов фенотипически проявляются достоверным снижением числа дубль-позитивных (CD45RA/RO) и CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток, при неизменном содержании Т-лимфоцитов, экспрессирующих молекулы костимуляции/активации (CD28 и CD127) (рисунок 25).

Полученные нами результаты, безусловно, нуждаются в дальнейшем изучении. 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. В целом, установление тонких молекулярно-клеточных механизмов влияния стероидных гормонов на процессы активации, пролиферации, дифференцировки и созревания Т-клеток позволит расширить представления о регулирующих механизмах адаптивного иммунитета на разных этапах его реализации.



**Рисунок 25.** 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.

## 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 генов мРНК *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  $\beta$ -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  $\beta$ -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 гормонозависимом ограничении дифференцировки наивных Т-клеток.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Альтернативный сплайсинг молекулы CD45 в механизмах молекулярно-генетического контроля дифференцировки Т-клеток / Юрова К.А., Сохоневич Н.А., Хазиахматова О.Г. и соавт. // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9, №9(18). – С. 186-193.
2. Берштейн, Л.М. Феноменальный эстроген и эстрогенный феномен / Берштейн Л.М.// Природа. – 2003. – № 9. – С. 24-29.
3. Влияние дексаметазона на активацию и пролиферацию Т-клеток иммунной памяти / Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Селедцов В.И. и соавт. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 155, № 4. – С. 468-470.
4. Галактионов, В.Т. Иммунология: Учебник / Галактионов В.Г. – М.: МГУ, 1998. – 480 с.
5. Гуцол, А.А. Влияние дексаметазона на активацию Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов / Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Литвинова Л.С. // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2012. – Т. 4, №41. – С. 29.
6. Заболевания иммунной системы. Диагностика и фармакотерапия / Калинина Н.М., Кетлинский С.А., Оковитый С.В. и соавт. // М.: Эксмо, 2008. – 496 с.
7. Зверева, М.Э. Теломераза: структура, функции и пути регуляции активности / Зверева М.Э., Щербакова Д.М., Донцова О.А. // Успехи биологической химии. – 2010. – Т. 50. – Р. 155-202.
8. Зильбернагель, С. Наглядная физиология / Зильбернагель С., Деспопулос А. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2013. – 408 с.
9. Ивашкин, В.Т. Основные понятия и положения фундаментальной иммунологии / Ивашкин В.Т. // РЖГГК. – 2008. – № 4. – С. 4-14.
10. Камкин, А. Фундаментальная и клиническая физиология / Камкин А., Каменский А. – М.: Academia, 2004. – 1072 с.
11. Кишкун, А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики / Кишкун, А.А. – М.: ГЭОТАР-медиа, 2007. – 800 с.
12. Клеточные механизмы генерации иммунологической памяти / Селедцов В.И., Литвинова Л.С., Гончаров А.Г. и соавт. // Цитокины и воспаление. – 2010. – V. 4. – Р. 9-15.

13. Кожевников, В.С. Экспрессия эрготоп-ассоциированных маркеров активированными Т-лимфоцитами / Кожевников В.С., Сенюков В.В., Королькова О.Ю. // Медицинская иммунология. – 2009. – V. 2-3. – С. 255-260.
14. Королькова, О. Ю. Экспрессия теломеразы в иммунокомпетентных клетках человека в норме и при иммунопатологических состояниях. Автореферат диссертации кандидата биологических наук / Королькова О. Ю. – Новосибирск, 2011. – 28 с.
15. Королькова, О.Ю. Динамика экспрессии мРНК каталитической субъединицы теломеразы (hTERT) в лимфоцитах периферической крови / Королькова О.Ю., Борисов В.И., Кожевников В.С. // Российский аллергологический журнал. – 2007. – №3, Приложение 1. – С. 25.
16. Кремер, Н.Ш. Теория вероятностей и математическая статистика / Кремер Н.Ш. – М.: ЮНИТИ-ДАНА, 2004. – 573 с.
17. Кудрявцев, И.В. Многоцветный анализ основных субпопуляций Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток методом проточной цитофлуориметрии / Кудрявцев И.В., Савицкий В.П. // Российский иммунологический журнал. – 2012. – Т. 6(14), № 3(1). – С. 94-97.
18. Кудрявцев, И.В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки / И.В. Кудрявцев // Российский иммунологический журнал. – 2014. – Т. 6(17), №4. – С. 947-964.
19. Кэттайл, В.М. Патология эндокринной системы / Кэттайл В.М., Арки Р.А. – М.: Бином, 2001. – 336 с.
20. Льюин, Б. Гены. / Льюин Б. — Бином. Лаборатория знаний, 2011. — 896 с.
21. Оловников, А.М. Принцип маргинотомии в матричном синтезе полинуклеотидов / Оловников А.М. // Докл. Акад. Наук. – 1971. – Т. 201 – С. 1496-1499.
22. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов / Литвинова Л.С., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А. и соавт. // Медицинская иммунология. – 2014. – Т. 6, № 1. – С. 7-26.
23. Полевщиков, А.В. Методологические аспекты современной иммунологии [Электронный ресурс] / Полевщиков А.В. // Рос. биомед. журн. – 2006. – URL: <http://www.medline.ru/public/histm/bioarticles/polevsh.phtml>
24. Розен, В.Б. Основы эндокринологии / Розен В.Б. – М.: Изд. МГУ, 1994. – 384 с.

25. Ройт, А. Иммунология / Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. – М.: Мир, 2000. – 592 с.
26. Самуилов, В.Д. Программируемая клеточная смерть / Самуилов В.Д., Олескин А.В., Лагунова Е.М. // Биохимия. – 2000. – Т. 65, №8. – С. 1029-1046.
27. Сохоневич, Н.А. Роль цитокинов, имеющих общую  $\gamma$ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15), в регуляции функциональной активности Т-лимфоцитов. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Сохоневич Н.А. – Томск, 2015. – 23 с.
28. Стероидная регуляция иммунной памяти / Литвинова Л.С., Селедцов В.И., Шуплецова В.В. и соавт. // Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. – 2011. – № 1. – С. 77-87.
29. Татарчук, Т.Ф. Эндокринная гинекология / Татарчук Т.Ф., Сольский Я.П. . – К.: Заповгг, 2003. – 300 с.
30. Феодоритова, Е. Защитные силы человеческого организма / Феодоритова Е. – М.: Медицина, 2002. – 235 с.
31. Феодоритова, Е. Защитные силы человеческого организма / Феодоритова Е. – М.: Медицина, 2002. – 235 с.
32. Хайдуков, С.В. Многоцветный анализ в проточной цитометрии для медико-биологических исследований. Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук / С.В. Хайдуков. - Санкт-Петербург, 2008. – 55 с.
33. Хаитов, Р.М. Иммунология: учебник для студентов медицинских вузов / Хаитов Р.М. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 311 с.
34. Хаитов, Р.М. Роль паттернраспознающих рецепторов во врожденном и адаптивном иммунитете / Хаитов Р.М., Пашенков М.В., Пинегин Б.В. // Иммунология. – 2009. – № 1. – С. 66-74.
35. Хоченков, Д.А. Роль дендритных клеток в иммунном ответе на Т-независимые антигены типа 2. / Хоченков Д.А. // Биологические мембраны. – 2010. – Т. 27, № 4. – С. 307-313.
36. Черешнев, В.А. Иммунология : учебник для вузов / Черешнев В.А., Шмагель К.В. – М. : Изд. Дом "МАГИСТР-ПРЕСС", 2014. – 520 с.
37. Чиркин, А.А. Практикум по биохимии / Чиркин А.А. – Мн.: Новое знание, 2002. – 512 с.

38. Шуплецова, В.В. Стероидная регуляция функциональной активности Т-клеток разной степени дифференцировки. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / 35. Шуплецова, В.В. – Томск, 2015. – 23 с.
39. Юрова, К.А. Роль цитокинов, имеющих общую  $\gamma$ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15), в регуляции механизмов молекулярно-генетического контроля дифференцировки Т-клеток. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Юрова К.А. – Томск, 2015. – 23 с.
40. Ярилин А.А. Иммунология. Учебник / Ярилин А.А. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 752 с.
41. Ярилин, А.А. Апоптоз и его место в иммунных процессах / Ярилин А.А. // Иммунология. – 1996. – № 3. – С. 6-9.
42. Ярилин, А.А. Система цитокинов и принципы ее функционирования в норме и при патологии / Ярилин А.А. // Иммунология. – 1997. – №5. – С. 7-14.
43. A disease-associated polymorphism alters splicing of the human CD45 phosphatase gene by disrupting combinatorial repression by heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) / Motta-Mena L.B., Smith S.A., Mallory M.J. et al. // J Biol Chem. – 2011. – V. 286, №22. – P. 20043-20053.
44. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence / d'Adda di Fagagna F., Reaper P.M., Clay-Farrace L. et al. // Nature. – 2003. – V. 426, №6963. – P. 194-198.
45. Adoptively transferable tolerance induced by CD45RB monoclonal antibody / Gao Z., Zhong R., Jiang J. et al. // Nephrol. — 1999. – V. 10, №2. — P. 374-381.
46. Age-related declines and disease-associated variation in immune cell telomere length in a wild mammal [Electronic resource] / Beirne C., Delahay R., Hares M. et al. // PLoS One. – 2014. – V. 9, № 9. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Age-related+declines+and+disease-associated+variation+in+immune+cell+telomere+length+in+a+wild+mammal+%2F+C.+Beirne%2C++R.+Delahay%2C++M.+Hares+et.>
47. Akbar, A.N. Memory T cell homeostasis and senescence during aging / Akbar A.N., Fletcher J.M. // Curr Opin Immunol. – 2005. – V. 17, №5. – P. 480-485.

48. Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit / Kang S.S., Kwon T., Kwon D.Y. et al. // *J Biol Chem.* – 1999. – V. 274, №19. – P. 13085-13090.
49. Alexander, D.R. The CD45 tyrosine phosphatase: a positive and negative regulator of immune cell function / Alexander D.R. // *Semin. Immunol.* – 2000. – V. 12. – P. 349-359.
50. Alkemade, A. Thyroid hormone and the developing hypothalamus / Alkemade A. // *Front Neuroanat.* – 2015. – V. 9, №15. – Mode of access: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnana.2015.00015/abstract>
51. Altemus, M. Immune function in PTSD / Altemus M., Dhabhar F.S., Yang R. // *Ann N Y Acad Sci.* – 2006. – V. 1071. – P. 167-183.
52. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes / Wang E.T., Sandberg R., Luo S. et al. // *Nature.* — 2008. – V. 456, №7221. — P. 470-476.
53. Alternative splicing in multiple sclerosis and other autoimmune diseases / Evsyukova I., Somarelli A.J., Gregory G.S. et al. // *RNA Biology.* – 2010. – V. 7, №4. – P. 462-473.
54. Alves, N.L. Common  $\gamma$  chain cytokines: dissidence in the details / Alves N.L., Arosa F.A., van Lier R.A.W. // *Immunology Letters.* – 2007. – V. 108, № 2. – P. 113-120.
55. Anabolic-androgenic Steroid use and Psychopathology in Athletes / Piacentino D., Kotzalidis G.D., Del Casale A. et al. // *A Systematic Review. Curr Neuropharmacol.* – 2015. – V. 13, № 1. – P. 101-121.
56. Anderson, D. J. Immunologic aspects of menopause. Menopause / Anderson J.D., Lobo R. A., Kelsey J., Marcus R. // *Biology and Pathology* – San Diego, Tokyo: Acad. Press, 2000. – P. 353-356.
57. Androgen receptor (AR) pathophysiological roles in androgen-related diseases in skin, bone/muscle, metabolic syndrome and neuron/immune systems: lessons learned from mice lacking AR in specific cells [Electronic resource] / Chang C., Yeh S., Lee S. et al. // *Nucl Recept Signal.* – 2013. – V. 11. – Mode of access: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Androgen+receptor+\(AR\)+pathophysiological+roles+in+androgen-related+diseases+in+skin%2C+bone%2Fmuscle%2C+metabolic+syndrome+and+neuron%2Fimmune+systems%3A+lessons+learned+from+mice+lacking+AR+in+specific+cells](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Androgen+receptor+(AR)+pathophysiological+roles+in+androgen-related+diseases+in+skin%2C+bone%2Fmuscle%2C+metabolic+syndrome+and+neuron%2Fimmune+systems%3A+lessons+learned+from+mice+lacking+AR+in+specific+cells)

58. Androgen receptor influences on body defense system via modulation of innate and adaptive immune systems: lessons from conditional AR knockout mice / Lai J.J., Lai K.P., Zeng W. et al. // *Am J Pathol.* – 2012. – V. 181, № 5. – P. 1504-1512.
59. Androgens alter B cell development in normal male mice / Viselli S.M., Reese K.R., Fan J. et al. // *Cell Immunol.* – 1997. – V. 182, № 2. – P. 99-104.
60. Androgens alter the cytokine profile and reduce encephalitogenicity of myelin-reactive T cells / Bebo Jr B.F., Schuster J.C., Vandenbark A.A. et al. // *J Immunol.* – 1999. – Vol. 162, № 1. – P. 35-40.
61. Anti-CD(45)RB monoclonal antibody induces immunologic toleration by suppressing dendritic cells / Xia X., Zhang X., Huang X. et al. // *Transpl Immunol.* — 2009. – V. 21, №3. — P. 136-139.
62. Arends, M. J. Apoptosis: Mechanism and role in pathology / Arends M.J., Wyllie A.H. // *Int. Rev. Exp. Pathol.* – 1991. – V. 32. – P. 223-254.
63. Ashwell, J.D. Glucocorticoids in T Cell Development and Function / Ashwell J.D., Lu F.W., Vacchio M.S. // *Annual Review of Immunology.* – 2000. – V. 18, № 1. – P. 309-345.
64. Aubert, G. Telomeres and aging / Aubert G., Lansdorp P.M. // *Physiol Rev.* – 2008. – V. 88, № 2. – P. 557-579.
65. Augmentation of T cell levels and responses induced by androgen deprivation / Roden A.C., Moser M.T., Tri S.D. et al. // *J Immunol.* – 2004. – V. 173, № 10. – P. 6098-6108.
66. Auricchio, F. Sex-steroid hormones and EGF signalling in breast and prostate cancer cells: targeting the association of Src with steroid receptors / Auricchio F., Migliaccio A., Castoria G. // *Steroids.* – 2008. – V. 73, №9-10. – P. 880-884.
67. Ayroldi, E. Targeting glucocorticoid side effects: selective glucocorticoid receptor modulator or glucocorticoid-induced leucine zipper? A perspective / Ayroldi E., Macchiarulo A., Riccardi C. // *FASEB J.* – 2014. – V. 28, №12. – P. 5055-50570.
68. Barsov, E.V. Telomerase and primary T cells: biology and immortalization for adoptive immunotherapy / Barsov E.V. // *Immunotherapy.* – 2011. – V. 3, № 3. –P. 407-421.
69. Baschant, U. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity / Baschant U., Tuckermann J. // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2010. – V. 120, № 2-3. – P. 69-75.

70. Beato, M. Steroid hormone receptors: an update / Beato M., Klug J. // *Hum Reprod Update*. – 2000. – V. 6. – P. 225-236.
71. Bel, S. Immunology: A bacterial nudge to T-cell function / Bel S., Hooper L.V. // *Nature*. — 2015. — V. 526, №7573. — P. 328-330.
72. Benbijja, M. Sensitivity of leukemic T-cell lines to arsenic trioxide cytotoxicity is dependent on the induction of phosphatase B220/CD45R expression at the cell surface [Electronic resource] / Benbijja M., Mellouk A., Bobé P. // *Mol Cancer*. – 2014. – V. 13, №1. — Mode of access: <http://molecular-cancer.biomedcentral.com/>
73. Benko, A.L. Estrogen and telomerase in human peripheral blood mononuclear cells / Benko A.L., Olsen N.J., Kovacs W.J. // *Mol Cell Endocrinol*. – 2012. – V. 364, № 1-2. – P. 83-88.
74. Benten, W.P. B cells express intracellular but not surface receptors for testosterone and estradiol / Benten W.P., Stephan C., Wunderlich F. // *Steroids*. – 2011. – V. 67, №7. – P. 647-654.
75. Bertram, E.M. Temporal segregation of 4-1BB versus CD28-mediated costimulation: 4-1BB ligand influences T cell numbers late in the primary response and regulates the size of the T cell memory response following influenza infection / Bertram E.M., Lau P., Watts T.H. // *J. Immunol*. – 2002. – V. 168. – P. 3777-3785.
76. Biochemical association of CD45 with the T cell receptor complex: regulation by CD45 isoform and during T cell activation / Leitenberg D., Boutin Y., Lu D.D. et al. // *Immunity*. — 1999. – V. 10, №6. — P. 701-711.
77. Black, D.L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing / Black D.L. // *Epub*. – 2003. – V. 72. – P. 291-336.
78. Blasco, M.A. Telomeres and human disease: aging, cancer and beyond / Blasco M.A. // *Nat.Rev. Genet*. – 2005. – V. 6, № 8. – P. 611-622.
79. Bouillet, P. CD95, BIM and T cell homeostasis / Bouillet P., O'Reilly L.A. // *Nat Rev Immunol*. – 2009. – V. 9, № 7. – P. 514-519.
80. Bouman, A. Sex hormones and the immune response in humans / Bouman A., Heineman M.J., Faas M.M. // *Hum Reprod Update*. – 2005. – V. 11, №4. – P. 411-423.
81. Brierre, S. The endocrine system during sepsis / Brierre S., Kumari R., Deboisblanc B.P. // *Am. J. Med*. – 2004. – V. 328. – P. 238-247.

82. Buchkovich, K.J. Telomerase regulation during entry into the cell cycle in normal human T cells / Buchkovich K.J., Greider C.W. // *Mol Biol Cell*. – 1996. – V. 7, №9. – P. 1443-1454.
83. Butte, J.M. CD28 costimulation regulates genome-wide effects on alternative splicing [Electronic resource] / Butte J.M., Lee J.S., Jesneck J. // *PLoS One*. – 2012. – V. 7, №6. – Mode of access: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0040032>
84. Campana, A. Reproductive health: steroid hormone metabolism / Campana A. // *Reproductive Health*. Eds. – 2014. – V. 2. – Mode of access: [http://www.gfmer.ch/Books/Reproductive\\_health/Steroid\\_hormone\\_metabolism.html](http://www.gfmer.ch/Books/Reproductive_health/Steroid_hormone_metabolism.html)
85. Cancer-associated TERT promoter mutations abrogate telomerase silencing [Electronic resource] / Chiba K., Johnson J.Z., Vogan J.M. et al. // *Elife*. – 2015. – V. 96, №9. – Mode of access: <http://elifesciences.org/content/4/e07918>
86. Cao, Y. Increased copy number of the TERT and TERC telomerase subunit genes in cancer cells / Cao Y., Bryan T.M., Reddel R.R. // *Cancer Sci*. – 2008. – V. 99, №6. – P. 1092-1092.
87. Carrette, F. IL-7 signaling and CD127 receptor regulation in the control of T cell homeostasis / Carrette F., Surh C.D. // *Semin Immunol*. – 2012. – V. 24, № 3. – P. 209-217.
88. CCR5 expression levels influence NFAT translocation, IL-2 production, and subsequent signaling events during T lymphocyte activation / Camargo J.F., Quinones M.P., Mummidi S. et al. // *J Immunol*. – 2005. – V. 182, № 1. – P. 171-182.
89. CD27 deficiency is associated with combined immunodeficiency and persistent symptomatic EBV viremia / van Montfrans J.M., Hoepelman A.I., Otto S. et al. // *J Allergy Clin Immunol*. – 2012. – V. 129, №3. – P. 787-793.
90. CD45 ectodomain controls interaction with GEMs and Lck activity for optimal TCR signaling / Irls C., Symons A., Michel F. et al. // *Nat Immunol*. — 2003. – V. 4, №2. — P. 189-197.
91. CD45 isoform RB as a molecular target to oppose lipopolysaccharide-induced microglial activation in mice / Townsend K.P., Vendrame M., Ehrhart J. et al. // *Neurosci Lett*. — 2004. – V. 362, №1. — P. 26-30.

92. CD45 isoforms in T cell signalling and development / McNeill L., Cassady R.L., Sarkardei S. et al. // *Immunol Lett.* — 2004. — V. 92, №1-2. — P. 125-134.
93. CD45 negatively regulates lyn activity by dephosphorylating both positive and negative regulatory tyrosine residues in immature B cells / Katagiri T., Ogimoto M., Hasegawa K. et al. // *J Immunol.* — 1999. — V. 163, №3. — P. 1321-1326.
94. CD45 regulates Src family member kinase activity associated with macrophage integrin-mediated adhesion / Roach T., Slater S., Koval M. et al. // *Curr Biol.* — 1997. — V. 7, №6. — P. 408-417.
95. CD45 regulates TLR-induced proinflammatory cytokine and IFN-beta secretion in dendritic cells / Cross J.L., Kott K., Miletic T. et al. // *J. Immunol.* — 2008. — V. 180, №12. — P. 8020-8029.
96. CD45: new jobs for an old acquaintance / Penninger J.M., Irie-Sasaki J., Sasaki T. et al. // *Nature Immunology.* — 2001. — V. 2. — P. 389-396.
97. Cellular and molecular mechanisms of memory T-cell survival / Tanel A., Fonseca S.G., Yassine-Diab B. et al. // *Expert Rev. Vaccines.* — 2009. — V. 8. — P. 299-312.
98. Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction / Tang Q., Adams J.Y., Penaranda C. et al. // *Immunity.* — 2008. — V. 28, № 5. — P. 687-697.
99. Characterization of U2AF(6), a splicing factor related to U2AF(35) / Shepard J., Reick M., Olson S. et al. // *Mol Cell Biol.* — 2002. — V. 22, №1. — P. 221-230.
100. Chen, M. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches / Chen M., Manley J.L. // *Nat Rev Mol Cell Biol.* — 2009. — V. 10, №11. — P. 741-754.
101. Cheng, Q. Development of novel treatment strategies for inflammatory diseases—similarities and divergence between glucocorticoids and GILZ / Cheng Q., Morand E., Yang Y.H. // *Front Pharmacol.* — 2014. — V. 5. — P. 169.
102. Cheng, Z. RNA splicing and debranching viewed through analysis of RNA lariats / Cheng Z., Menees T.M. // *Mol Genet Genomics.* — 2011. — V. 286, №5-6. — P. 395-410.
103. Choi, J. Reduced telomerase activity in human T lymphocytes exposed to cortisol / Choi J., Fauce S.R., Effros R.B. // *Brain Behav. Immun.* — 2008. — V. 22, № 4. — P. 600-605.

104. Clancy, S. RNA splicing: introns, exons and spliceosome / Clancy S. // Nature Education. – 2008. – V. 1, №1. – P. 31.
105. Clark, M.C. T cells modulate glycans on CD43 and CD45 during development and activation, signal regulation, and survival / Clark M.C., Baum L.G. // Ann N Y Acad Sci. — 2012. — V. 1253 — P. 58-67.
106. Collins, K. The biogenesis and regulation of telomerase holoenzymes / Collins K. // Nat. Rev. Mol. – 2006. – V. 7. – P. 484-494.
107. Combinatorial control of signal-induced exon repression by hnRNP L and PSF / Melton A.A., Jackson J., Wang J. et al. // Molecular and cellular biology. – 2007. – V. 27, №19. – P. 6972-6984.
108. Cong, Y.S. Human telomerase and its regulation / Cong Y.S., Wright W.E., Shay J.W. // Microbiol Mol Biol Rev. – 2002. – V. 66, № 3. – P. 407-425.
109. Consequences of increased CD45RA and RC isoforms for TCR signaling and peripheral T cell deficiency resulting from heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like mutation / Wu Z., Yates A.L., Hoyne G.F. et al. // J Immunol . — 2010. – V. 185, №1. — P. 231-238.
110. Constitutive and regulated expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human lymphocytes / Liu K., Schoonmaker M.M., Levine B.L. et al. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1999. – V. 96, №9. – P. 5147-5152.
111. Cooper, T.A. RNA and Disease / Cooper T.A., Wan L., Dreyfuss G. // Cell. – 2009. – V. 136, №4. – P. 777-793.
112. Coordinate expression of beta 1 and beta 2 integrin "activation" epitopes during T cell responses in secondary lymphoid tissue / Picker L.J., Treer J.R., Nguyen M. et al. // Eur J Immunol. – 1993. – V. 23, №11. – P. 2751-2757.
113. Coordination of IL-7 receptor and T-cell receptor signaling by cell-division cycle 42 in T-cell homeostasis / Guo F., Hildeman D., Tripathi P. et al. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2010. – V. 107, №43. – P. 18505-18510.
114. Crotty, S. Immunological memory in humans / Crotty S., Ahmed R. // Seminars in Immunology. – 2004. – V. 16, № 3. – P. 197-203.
115. Cunningham, M. Estrogen receptors in immunity and autoimmunity / Cunningham M., Gilkeson G. // Clin Rev Allergy Immunol. – 2011. – V. 40, № 1. – P. 66-73.

116. Cutting edge: IL-7-independent regulation of IL-7 receptor alpha expression and memory CD8 T cell development / Klonowski K.D., Williams K.J., Marzo A.L. et al. // *J Immunol.* – 2006. – V. 177, № 7. – P. 4247-4251.
117. Cytomegalovirus infection induces the accumulation of short-lived, multifunctional CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> T cells: the potential involvement of interleukin-7 in this process / Libri V., Azevedo R.I., Jackson S.E. et al. // *Immunology.* – 2011. – V. 132. – P. 326-339.
118. Cytomegalovirus-specific CD4<sup>+</sup> T cells in healthy carriers are continuously driven to replicative exhaustion / Fletcher J.M., Vukmanovic-Stejic M., Dunne P.J. et al. // *J Immunol.* – 2005. – V. 175, №12. – P. 8218-8225.
119. Da Silva, JA. Sex hormones and glucocorticoids: interactions with the immune system / Da Silva J.A. // *Ann N Y Acad Sci.* – 1999. – V. 876. – P. 102-117.
120. De Arras, L. Limiting of the innate immune response by SF3A-dependent control of MyD88 alternative mRNA splicing [Electronic resource] / De Arras L., Alper S. // *PLoS Genet.* — 2015. — V. 9, №10. — Mode of access: <http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1003855>.
121. Deep sequencing of subcellular RNA fractions shows splicing to be predominantly co-transcriptional in the human genome but inefficient for lncRNAs / Tilgner H., Knowles D.G., Johnson R. et al. // *Genome Res.* – 2012. – V. 22, №9. – P. 1616-1625.
122. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing / Pan Q., Shai O., Lee L.J. et al. // *Nat Genet.* — 2008. – V. 40, №12. — P. 1413-1415.
123. Deficiency of naive T cells in patients with sudden deafness / García-Berrocal J.R., Vargas J.A., Ramírez-Camacho R.A. et al. // *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* – 1997. – V. 123, № 7. – P. 712-714.
124. Design of potent and selective 2-aminobenzimidazole-based p38alpha MAP kinase inhibitors with excellent in vivo efficacy / de Dios A., Shih C., López de Uralde B. et al. // *J Med Chem.* — 2005. – V. 48, №7. — P. 2270-2273.
125. Dexamethasone inhibits human interleukin 2 but not interleukin 2 receptor gene expression in vitro at the level of nuclear transcription / Boumpas D.T., Anastassiou E.D., Older S.A. et al. // *J. Clin. Invest.* – 1991. – V. 87, № 5. – P. 1739-1747.

126. Dexamethasone inhibits the early steps of antigen receptor signaling in activated T lymphocytes / Baus E., Andris F., Dubois P.M. et al. // *J. Immunol.* - 1996. – Vol. 156, № 12. – P. 4555-4561.
127. Dexamethasone treatment has no effect on the formation of pneumococcal antibodies during community-acquired pneumonia / van Mens S.P., Meijvis S.C., Grutters J.C. et al. // *Clin Vaccine Immunol.* – 2012. – V. 19, №5. – P. 811-813.
128. Different associations of CD45 isoforms with STAT3, PKC and ERK regulate IL-6-induced proliferation in myeloma [Electronic resource] / Zheng X., Li A.S., Zheng H. et al. // *PLoS One.* – 2015. – V. 10, №3. – Mode of access: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0119780>
129. Differential association of CD45 isoforms with CD4 and CD8 regulates the actions of specific pools of p56lck tyrosine kinase in T cell antigen receptor signal transduction / Dornan S., Sebestyen Z., Gamble J. et al. // *J Biol Chem.* — 2002. – V. 227, №3. — P. 1912-1918.
130. Differential effects of sex steroids on T and B cells: modulation of cell cycle phase distribution, apoptosis and bcl-2 protein levels / McMurray R.W., Suwannaroj S., Ndebele K. et al. // *Pathobiology.* – 2001. – V. 69, № 1. – P. 44-58.
131. Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations / Phiel K.L., Henderson R.A., Adelman S.J. et al. // *Immunol. Lett.* – 2005. – V. 97, № 1. – P. 107–113.
132. Differential impact of the transcriptional repressor Gfi1 on mature CD4+ and CD8+ T lymphocyte function / Pargmann D., Yücel R., Kosan C. et al. // *Eur J Immunol.* – 2007. – V. 37, №12. – P. 3551-3563.
133. Differential requirement for CD80 and CD80/CD86-dependent costimulation in the lung immune response to an influenza virus infection / Lumsden J.M., Roberts J.M., Harris N.L. et al. // *J. Immunol.* – 2000. – V. 164. – P. 79-85.
134. Dimerization-induced inhibition of receptor protein tyrosine phosphatase function through an inhibitory wedge / Majeti R., Bilwes A.M., Noel J.P. et al. // *Science.* — 1998. – V. 279, №5347. — P. 88-91.
135. Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo / Callan M.F., Tan L., Annels N. et al. // *J Exp Med.* — 1998. – V. 187, №9. — P. 1395-1402.

136. Distelhorst, C. W. Role of Calcium in Glucocorticosteroid-Induced Apoptosis of Thymocytes and Lymphoma Cells: Resurrection of Old Theories by New Findings / Distelhorst C.W., Dubyak G. // *Blood*. – 1998. – V. 91, № 3. – P. 731-734.
137. Distinct functions of autoreactive memory and effector CD4<sup>+</sup> T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis / Elyaman W., Kivisäkk P., Reddy J. et al. // *Am J Pathol*. – 2008. – V. 173, № 2. – P. 411-422.
138. Dodiuk-Gad R.P. Systemic glucocorticoids: important issues and practical guidelines for the dermatologist / Dodiuk-Gad R.P., Ish-Shalom S., Shear N.H. // *Int J Dermatol*. – 2015. – V. 54, № 6. – P. 723-729.
139. Doses-response effect of steroid hormones on Gfi1 and U2af114 gene expression in T lymphocytes at different stages of differentiation / Litvinova L.S., Mazunin I.O., Gutsol A.A. et al. // *Molecular Biology*. – 2013. – V. 47, №4. – P. 656-666.
140. Double-blind assessment of azelastine in the treatment of perennial allergic rhinitis / Grossman J., Halverson P.C., Meltzer E.O. et.al. // *Ann Allergy*. – 1994. – V. 73, № 2. – P. 141-146.
141. Dowd, D.R. Evidence that glucocorticoid- and cyclic AMP-induced apoptotic pathways in lymphocytes share distal events / Dowd D.R., Miesfeld R.L. // *Mol. Cell. Biol*. – 1992. – V. 12, № 8. – P. 3600-3608.
142. Duarte-Guterman, P. Mechanisms of crosstalk between endocrine systems: regulation of sex steroid hormone synthesis and action by thyroid hormones / Duarte-Guterman P., Navarro-Martín L., Trudeau V.L. // *Gen Comp Endocrinol*. – 2014. – V. 203. – P. 69-85.
143. Dumont-Lagacé, M. Sex hormones have pervasive effects on thymic epithelial cells [Electronic resource] / Dumont-Lagacé M., St-Pierre C., Perreault C. // *Sci Rep*. – 2015. – V. 5, № 12859. – Mode of access: <http://www.nature.com/articles/srep12895>
144. Dupéré-Minier, G. Involvement of tyrosine phosphatase CD45 in apoptosis / Dupéré-Minier G., Desharnais P., Bernier J. // *Apoptosis*. – 2010. – V. 15, №1. — P. 1-13.
145. Dynamic regulation of Src-family kinases by CD45 in B cells / Shrivastava P., Katagiri T., Ogimoto M. et al. // *Blood*. — 2004. – V. 103, №4. — P. 1425-1432.
146. Earl, L.A. CD45 glycosylation controls T-cell life and death / Earl L.A., Baum L.G. // *Immunol Cell Biol*. — 2008. — V. 86, №7. — P. 608-615.

147. Earl, L.A. N- and O-glycans modulate galectin-1 binding, CD45 signaling, and T cell death / Earl L.A., Bi S., Baum L.G. // *J Biol Chem.* – 2010. – V. 285, №4. — P. 2232-2244.
148. Ectopic human telomerase catalytic subunit expression maintains telomere length but is not sufficient for CD8+ T lymphocyte immortalization / Migliaccio M., Amacker M., Just T. et al. // *J Immunol.* – 2000. – V. 165, №9. – P. 4978-4984.
149. Edmonds S.D. Dynamic association of CD45 with detergent-insoluble microdomains in T lymphocytes / Edmonds S.D., Ostergaard H.L. // *J Immunol.* — 2002. — V. 169, №1. — P. 5036-5042.
150. Effect of gender and sex hormones on immune responses following shock / Angele M.K., Schwacha M.G., Ayala A. et al. // *Shock.* – 2000. – V. 14, № 2. – P. 81-90.
151. Effects of anabolic-androgens on brain reward function [Electronic resource] / Mhillaj E., Morgese M.G., Tucci P. et al. // *Front Neurosci.* – 2015. – V. 9. – Mode of access: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2015.00295/abstract>
152. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death / Elmore S. // *Toxicol Pathol.* – 2007. – V. 35. – P. 495-516.
153. Endocrine control of canine mammary neoplasms: serum reproductive hormone levels and tissue expression of steroid hormone, prolactin and growth hormone receptors [Electronic resource] / Spoerri M., Guscetti F., Hartnack S. et al. // *BMC Vet Res.* — 2015. – V. 11, №235. — Mode of access: <http://www.biomedcentral.com/1746-235>
154. Engel, P. The SAP and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease / Engel P., Eck M.J., Terhorst C. // *Nat Rev Immunol.* – 2003.– V. 3, №10. – P. 813-821.
155. Epidemiologic evidence for a role of telomere dysfunction in cancer etiology / Prescott J., Wentzensen I.M., Savage S.A. et. al. // *Mutat Res.* – 2012. – V. 730, №1-2. – P. 75-84.
156. Epigenetic regulation of hematopoietic differentiation by Gfi-1 and Gfi-1b is mediated by the cofactors CoREST and LSD1 / Saleque S., Wright J., Rooke H.M. et al. // *Mol Cell.* – 2007. – V. 27, №4. – P. 562-572.
157. ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions / Razandi M., Oh P., Pedram A. et al. // *Mol. Endocrinol.* – 2002. – V. 16, № 1. – P. 100-115.

158. Estradiol activates group I and II metabotropic glutamate receptor signaling, leading to opposing influences on cAMP response element-binding protein / Boulware M.I., Weick J.P., Becklund B.R. et al. // *J. Neurosci.* – 2005. – V. 25, №20. – P. 5066-5078.
159. Estrogen activates telomerase / Kyo S., Takakura M., Kanaya T. et al. // *Cancer Res.* – 1999. – V. 59, № 23. – P. 5917-5921.
160. Estrogen modulates in vitro T cell responses in a concentration- and receptor-dependent manner: effects on intracellular molecular targets and antioxidant enzymes / Priyanka H.P., Krishnan H.C., Singh R.V. et al. // *Mol Immunol.* – 2013. – V. 56, № 4. – P. 328-339.
161. Evan, G. A matter of life and cell death / Evan G., Littlewood T. // *Science.* – 1998. – V. 281, № 5381. – P. 1317-1322.
162. Evidence for changes in adrenal and testicular steroids during HIV infection / Christeff N., Gharakhanian S., Thobie N. et al. // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* – 1992. – V. 5. – P. 841-846.
163. Evolution of steroid- 5alpha-reductases and comparison of their function with 5beta-reductase / Langlois V.S., Zhang D., Cooke G.M. et al. // *Gen.Comp. Endocrinol.* – 2009. – V. 166, №3. – P. 489-497.
164. Ex vivo homeostatic proliferation of CD4+T cells in rheumatoid arthritis is dysregulated and driven by membrane-anchored TNF $\alpha$ 1 / Wagner U., Pierer M., Wahle M. et al. // *The Journal of Immunology.* – 2004. – V. 173, №4. – P. 2825-2833.
165. Ex vivo stimulation of cord blood mononuclear cells by dexamethasone and interleukin-7 results in the maturation of interferon-gamma-secreting effector memory T cells / Talayev V.Y., Zaichenko I.Y., Babaykina O.N. et al. // *Clin Exp Immunol.* – 2005. – V. 141, № 3. – P. 440-448.
166. Expression of CD45 alters phosphorylation of the lck-encoded tyrosine protein kinase in murine lymphoma T-cell lines / Ostergaard H.L., Shackelford D.A., Hurley T.R. et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 1989. – V. 86, №22. — P. 8959-8963.
167. Expression of CD45 isoforms correlates with differential proliferative responses of peripheral CD4+ and CD8+ T cells / Seki I., Suzuki M., Miyasaka N. et al. // *Immunol Lett.* – 2010. – V. 129, №1. – P. 39-46.

168. Expression of membrane progesterone receptors on human T lymphocytes and Jurkat cells and activation of G-proteins by progesterone / Dosiou C., Hamilton A.E., Pang Y. et al. // *J. Endocrinol.* – 2008. – V. 196, №1. – P. 67-77.
169. Expression of variable exon A-, B-, and C-specific CD45 determinants on peripheral and thymic T cell populations / Hathcock K.S., Laszlo G., Dickler H.B. et al. // *J Immunol.* — 1992. – V. 148, №1. — P. 19-28.
170. Falahati, R. Changes in the role of the CD45 protein tyrosine phosphatase in regulating Lck tyrosine phosphorylation during thymic development / Falahati R., Leitenberg D. // *J Immunol.* — 2007. — V. 178, №4. — P. 2056-2064.
171. Fedor, M.E. Effects of long-term low-dose corticosteroid therapy on humoral immunity / Fedor M.E., Rubinstein A. // *Ann Allergy Asthma Immunol.* – 2006. – V. 97, №1. – P. 113-116.
172. Filipp, D. Lck, membrane microdomains, and TCR triggering machinery: defining the new rules of engagement [Electronic resource] / Filipp D., Ballek O., Manning J. // *Front Immunol.* – 2012. – V. 3, №155. – Mode of access: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2012.00155/abstract>
173. Finlay-Schultz, J. Steroid Hormones, Steroid Receptors, and Breast Cancer Stem Cells / Finlay-Schultz J., Sartorius C.A. // *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* — 2015. — V. 20, №1-2. — P. 39-50.
174. Foradori, C.D. Non-genomic actions of androgens / Foradori C.D., Weiser M.J., Handa R.J. // *Front Neuroendocrinol.* – 2008. – V. 29, № 2. – P. 169-181.
175. Formation of IL-7R $\alpha$ hi and IL-7R $\alpha$ lo CD8 T cells during infection is regulated by the opposing functions of GABP $\alpha$  and Gfi-1 / Chandele A., Joshi N.S., Zhu J. et al. // *J Immunol.* – 2008. – V. 180, №8. – P. 5309-5319.
176. Fry, T.J., Interleukin-7: master regulator of peripheral T-cell homeostasis? / Fry T.J., Mackall C.L. // *Trends Immunol.* – 2001. – V. 22. – P. 564-571.
177. Fu, X.D. Towards a splicing code / Fu X.D. // *Cell.* – 2004. – V. 119, №6. – P. 736-738.
178. Function of CD27 in helper T cell differentiation / Libregts S., van Olfen R.W., van der Sluijs K.F. et al. // *Immunol Lett.* – 2011. – V. 136, №2. – P. 177-186.
179. Functional assessment of pharmacological telomerase activators in human T cells / Molgora B., Bateman R., Sweeney G. et al. // *Cells.* – 2013. – V. 2, № 1. – P. 57-66.

180. Functional cross-talk among cytokines, T-cell receptor, and glucocorticoid receptor transcriptional activity and action / Arzt E., Kovalovsky D., Igaz L.M. et al. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2000. – V. 917. – P. 672-677.
181. Functional dissection of an enhancer-like element located within the second intron of the human U2AF1L4 gene / Didych D.A., Smirnov N.A., Kotova E.S. et al. // *Biochemistry (Mosc).* – 2011. – V. 76, №8. – P. 951-957.
182. Functional recognition of the 3' splice site AG by the splicing factor U2AF35 / Wu S., Romfo C.M., Nilsen T.W. et al. // *Nature.* – 1999. – V. 402, №6763. – P. 832-835.
183. Furman, D. Sexual dimorphism in immunity: improving our understanding of vaccine immune responses in men / Furman D. // *Expert Rev Vaccines.* – 2015. – V. 14, №3. – P. 461-471.
184. Gazzaniga, F.S. An anti-apoptotic role for telomerase RNA in human immune cells independent of telomere integrity or telomerase enzymatic activity [Electronic resource] / Gazzaniga F.S., Blackburn E.H. // *Blood.* – 2014. – Mode of access <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25320237>.
185. Geginat, J. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells / Geginat J., Sallusto F., Lanzavecchia A. // *J Exp Med.* – 2001. – V. 194, №12. — P. 1711-1719.
186. Generation of memory T cells for adoptive transfer using clinical-grade anti-CD62L magnetic beads / Verfuert S., Sousa P.S., Beloki L. et al. // *Bone Marrow Transplant.* — 2015. – V. 50, №10. — P. 1358-1364.
187. Genome-wide analysis of immune activation in human T and B cells reveals distinct classes of alternatively spliced genes [Electronic resource] / Grigoryev Y.A., Kurian S.M., Nakorchevskiy A.A. et al. // *PLoS ONE.* – 2009. – V. 4, №11. – Mode of access: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0007906>
188. Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes / Modrek B., Resch A., Grasso C. et al. // *Nucleic Acids Res.* — 2001. – V. 29, №13. — P. 2850-2859.
189. Gerbi, S.A. Beginning at the end: DNA replication within the telomere / Gerbi S.A. // *J Cell Biol.* – 2015. – V. 210, №2. – P. 177-179.

190. Geyer, H. Anabolic agents: recent strategies for their detection and protection from inadvertent doping / Geyer H., Schänzer W., Thevis M. // *Br J Sports Med.* – 2014. – V. 48, № 10. – P. 820-682.
191. Gfi1 coordinates epigenetic repression of p21Cip/WAF1 by recruitment of histone lysine methyltransferase G9a and histone deacetylase 1 / Duan Z., Zarebski A., Montoya-Durango D. et al. // *Mol Cell Biol.* – 2005. – V. 25, №23. – P. 10338-10351.
192. Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor / Zweidler-Mckay P.A., Grimes H.L., Flubacher M.M. et al. // *Mol Cell Biol.* – 1996. – V. 16, №8. – P. 4024-4034.
193. Glucocorticoid mediated inhibition of interleukin-2 receptor-a and -b subunit expression by human T cells / Batuman O.A., Ferrero A.P., Diaz A. et al. // *Immunopharmacology.* – 1994. – V. 27, № 1. – P. 43-55.
194. Glucocorticoid receptor translational isoforms underlie maturational stage-specific glucocorticoid sensitivities of dendritic cells in mice and humans / Cao Y., Bender I.K., Konstantinidis A.K. et al. // *Blood.* — 2015. – V. 121, №9. — P. 1553-1562.
195. Glucocorticoid-induced apoptosis in early B cells from human bone marrow / Lill-Elghanian D., Schwartz K., King L. et al. // *Exp Biol Med (Maywood).* – 2002. – V. 227, № 9. – P. 763-770.
196. Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1 / Ayroldi E., Zollo O., Macchiarulo A. et al. // *Mol Cell Biol.* – 2002. – V. 22, № 22. – P. 7929-7941.
197. Glucocorticoid-mediated inhibition of Lck modulates the pattern of T cell receptor-induced calcium signals by down-regulating inositol 1,4,5-trisphosphate receptors / Harr M.W., Rong Y., Bootman M.D. et al. // *J Biol Chem.* – 2009. – V. 284, № 46. – P. 31860-31871.
198. Glucocorticoids cause rapid dissociation of a T-cell-receptor-associated protein complex containing LCK and FYN / Löwenberg M., Verhaar A.P., Bilderbeek J. et al. // *EMBO Rep.* – 2006. – V. 7, №10. – P. 1023-1029.
199. Glucocorticoids inhibit activation-induced cell death (AICD) via direct DNA-dependent repression of the CD95 ligand gene by a glucocorticoid receptor dimer / Baumann S., Dostert A., Novac N. et al. // *Blood.* – 2005. – V. 106, № 2. – P. 617-625.

200. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma / Karagiannidis C., Akdis M., Holopainen P. et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2004. – V. 114, №6. – P. 1425-1433.
201. Graveley, B.R. The role of U2AF35 and U2AF65 in enhancer-dependent splicing / Graveley B.R., Hertel K.J., Maniatis T. // *RNA.* – 2001. – V. 7, №6. – P. 806–818.
202. Greider, C.W. Identification of specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts / Greider C.W., Blackburn E.H. // *Cell.* – 1985. – V. 43, №5. – P. 405-413.
203. Gruver-Yates, A.L. Tissue-specific actions of glucocorticoids on apoptosis: a double-edged sword / Gruver-Yates A.L., Cidlowski J.A. // *Cells.* – 2013. – V. 2, №2. – P. 202-223.
204. Guth, S. Kinetic role for mammalian SF1/BBP in spliceosome assembly and function after polypyrimidine tract recognition by U2AF / Guth S., Valcárcel J. // *J Biol Chem.* — 2000. — V. 275, №48. — P. 38059-38066.
205. Hammes, S.R. Overlapping nongenomic and genomic actions of thyroid hormone and steroids / Hammes S.R., Davis P.J. // *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* — 2015. — V. 29, №4. — P. 581-593.
206. Harris, N. Immunology: Chronic effects of acute infections / Harris N. // *Nature.* – 2015. – V. 526, №7574. – P. 509-510.
207. Hartgens, F. Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes / Hartgens F, Kuipers H. // *Sports Med.* – 2004. – V. 34, № 8. – P. 513-554.
208. Heinlein, C.A. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions / Heinlein C.A., Chang C. // *Mol Endocrinol.* – 2002. – V. 16, № 10. – P. 2181-2187.
209. Hematopoietic stem cell-derived cancer-associated fibroblasts are novel contributors to the pro-tumorigenic microenvironment / McDonald L.T., Russell D.L., Kelly R.R. et al. // *Neoplasia.* — 2015. – V. 17, №5. — P. 434-448.
210. Hermiston, M.L. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells / Hermiston M.L., Xu Z., Weiss A. // *Annu Rev Immunol.* – 2003. - №21. – P. 107-137.
211. Heyd, F. Auxiliary splice factor U2AF26 and transcription factor Gfi1 cooperate directly in regulating CD45 alternative splicing / Heyd F., ten Dam G., Möröy T. // *Nat. Immunol.* – 2006. – V. 7, №8. – P. 859-867.

212. Heyd, F. Phosphorylation-Dependent Regulation of PSF by GSK3 Controls CD45 Alternative Splicing / Heyd F., Lynch W.K. // *Molecular Cell*. – 2010. – V. 40. – P. 126-137.
213. High-dose methylprednisolone therapy in multiple sclerosis induces apoptosis in peripheral blood leukocytes / Leussink V.I., Jung S., Merschdorf U. et al. // *Arch Neurol*. – 2001. – V. 58, № 1. – P. 91-97.
214. Holmes, N. CD45: all is not yet crystal clear / Holmes N. // *Immunology*. – 2006. – V. 117, № 2. – P. 145-155.
215. Homeostasis of memory T cells / Surh C.D., Boyman O., Purton J.F. et al. // *Immunol Rev*. – 2006. – V. 211. – P. 154-163.
216. Homeostasis of naive and memory CD4+ T cells: IL-2 and IL-7 differentially regulate the balance between proliferation and Fas-mediated apoptosis / Jaleco S., Swainson L., Dardalhon V. et al. // *J Immunol*. – 2003. – V. 171, №1. – P. 61–68.
217. How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination / Giefing-Kröll C., Berger P., Lepperdinger G. et al. // *Aging Cell*. — 2015. – V. 14, №3. — P. 309-321.
218. Huang, W. The signaling symphony: T cell receptor tunes cytokine-mediated T cell differentiation / Huang W., August A. // *J Leukoc Biol*. – 2015. – V. 97, №3. – P. 477-485.
219. Human virus-specific CD8+ CTL clones revert from CD45RO<sup>high</sup> to CD45RA<sup>high</sup> in vivo: CD45RA<sup>high</sup>CD8+ T cells comprise both naive and memory cells / Wills M.R., Carmichael A.J., Weekes M.P. et al. // *Immunol*. — 1999. – V. 162, №12. — P. 7080-7087.
220. Hurley, T.R. Differential effects of expression of the CD45 tyrosine protein phosphatase on the tyrosine phosphorylation of the lck, fyn, and c-src tyrosine protein kinases / Hurley T.R., Hyman R., Sefton B.M. // *Mol Cell Biol*. – 1993. – V. 13, №3. — P. 1651-1656.
221. Identification of amino acids at the junction of exons 3 and 7 that are used for the generation of glycosylation-related human CD45RO and CD45RO-like antigen specificities / Pulido R., Schlossman S.F., Saito H. et al. // *J Exp Med*. — 1994. – V. 179, №3. — P. 1035-1040.

222. Identification of two distinct elements mediating activation of telomerase (hTERT) gene expression in association with cell growth in human T cells / Matsumura-Arioka Y., Ohtani K., Hara T. et al. // *Int Immunol.* – 2005. – V. 17, № 2. – P. 207-215.
223. Igarashi, H. Telomerase activity is induced by the stimulation to antigen receptor in human peripheral lymphocytes / Igarashi H., Sakaguchi N. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1996 – № 19. – P. 649-655.
224. Igarashi, H. Telomerase activity is induced in human peripheral B lymphocytes by the stimulation to antigen receptor / Igarashi H., Sakaguchi N. // *Blood* – 1997 – № 89. – P. 1299-1307.
225. Iida, N. Mapping the fodrin binding domain in CD45, a leukocyte membrane-associated tyrosine phosphatase / Iida N., Lokeshwar V.B., Bourguignon L.Y. // *J Biol Chem.* – 1994. – V. 269, №46. — P. 28576-28583.
226. IL-12, STAT4-dependent up-regulation of CD4(+) T cell core 2 beta-1,6-n-acetylglucosaminyltransferase, an enzyme essential for biosynthesis of P-selectin ligands / Lim Y.C., Xie H., Come C.E. et al. // *J Immunol.* — 2001. – V. 167, №8. — P. 4476-4484.
227. IL-15 activates telomerase and minimizes telomere loss and may preserve the replicative life span of memory CD8+ T cells in vitro / Li Y., Zhi W., Wareski P. et al. // *J. Immunol.* – 2005. – V. 174, №7. – P. 4019-4024.
228. Immortalization of human CD8+ T cell clones by ectopic expression of telomerase reverse transcriptase / Hooijberg E., Ruizendaal J.J., Snijders P.J. et al. // *J Immunol.* – 2000. – V. 165, №8. – P. 4239-4245.
229. Immune disorders in Women with premature ovarian failure in initial period / Chernyshov V.P., Radysh T.V., Gura I.V. et al. // *Am. J. of Reprod. Immunology.* – 2001. – V. 46. – P. 220-225.
230. In vivo stimulation of CD137 broadens primary antiviral CD8+ T cell responses / Halstead E.S., Mueller Y.M., Altman J.D. et al. // *Nat. Immunol.* – 2002. – V. 3. – P. 536-541.
231. Induction of hTERT expression and telomerase activity by estrogens in human ovary epithelium cells / Misiti S., Nanni S., Fontemaggi G. et al. // *Mol Cell Biol.* – 2000. – V. 20, № 11. – P. 3764-3771.

232. Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells / Kondrack R.M. , Harbertson J., Tan J.T. et al. // *J Exp Med.* – 2003. – V. 198, № 12. – P. 1797-1806.
233. Interleukin-2 enhances CD4+ T cell memory by promoting the generation of IL-7R alpha-expressing cells / Dooms H., Wolslegel K., Lin P. et al. // *J Exp Med.* – 2007. – V. 204, № 3. – P. 547-557.
234. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo / Schluns K.S., Kieper W.C., Jameson S.C. et al. // *Nat Immunol.* – 2000. – V. 1, № 5. – P. 426-432.
235. Involvement of transcription repressor Snail in the regulation of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) by transforming growth factor- $\beta$  / Yoo Y.S., Park S., Gwak J. et al. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2015. – V. 465, №1. – P. 131-136.
236. Isoforms of the transmembrane tyrosine phosphatase CD45 differentially affect T cell recognition / Novak T.J., Farber D., Leitenberg D. et al. // *Immunity.* — 1994. – V. 1, №2. — P. 109-119.
237. Iwata, M. Rescue of thymocytes and T cell hybridomas from glucocorticoid-induced apoptosis by stimulation via the T cell receptor/CD3 complex: a possible in vitro model for positive selection of the T cell repertoire/ Iwata M., Hanaoka S., Sato K. // *Eur J Immunol.* – 1991. – V. 21, №3. – P. 643-648.
238. Jackson, D. I. The extra segments of sequence in rat leucocyte common antigen (L-CA) are derived by alternative splicing of only three exons and show extensive O-linked glycosylation / Jackson D.I., Barclay A.N. // *Immunogenetics.* — 1989. — V. 29, №5. — P. 281-287.
239. Kincade, P.W. Estrogen regulates lymphopoiesis / Kincade P.W., Medina K.L., Payne K.J. // *Menopause at the Millennium.* – 2000. – V. 2. – P.171-174.
240. Kinetic assessment of general gene expression changes during human naive CD4+ T cell activation / Hess K., Yang Y., Golech S. et al. // *International Immunology.* – 2004. – V. 16, № 12. – P. 1711-1721.
241. Kofler, R. The molecular basis of glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoblastic leukemia cells / Kofler R. // *Histochem. Cell Biol.* – 2000. – V. 114, № 1. – P. 1-7.
242. Koolman, J. *Color Atlas of Biochemistry* / Koolman J., Roehm K.H. – Thieme, 2006. – 480 p.

243. Krawczyk, C.M. Functional plasticity in memory T helper cell responses / Krawczyk C.M., Shen H., Pearce E.J. // *J Immunol.* –2007. –V.178. –P.4080-4088.
244. Learning the Sequence Determinants of Alternative Splicing from Millions of Random Sequences / Rosenberg A.B., Patwardhan R.P., Shendure J. et al. // *Cell.* — 2015. – V. 163, №3. — P. 698-711.
245. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms / Michie C.A., McLean A., Alcock C. et al. // *Nature.* — 1992. – V. 360, №6401. — P. 264-265.
246. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets / Wherry E. J., Teichgraber V., Becker V. et al. // *Nat. Immunol.* – 2003. – V. 4. – P. 225-234.
247. Lipopolysaccharide induces intestinal glucocorticoid synthesis in a TNFalpha-dependent manner / Noti M., Corazza N., Tuffin G. et al. // *J Exp Med.* – 2010. – V. 24, №5. – P. 1340-1346.
248. Liu, X. Regulation of Estrogen Receptor  $\alpha$  Expression in the Hypothalamus by Sex Steroids: Implication in the Regulation of Energy Homeostasis [Electronic resource] / Liu X., Shi H. // *Int J Endocrinol.* — 2015. — Mode of access: <http://www.hindawi.com/journals/ije/2015/949085/>
249. Localization of androgen receptor expression in human bone marrow / Mantalaris A., Panoskaltsis N., Sakai Y. et al. // *J Pathol.* – 2001. – V. 193, № 3. – P. 361-366.
250. Lokeshwar, V.B. Tyrosine phosphatase activity of lymphoma CD45 (GP180) is regulated by a direct interaction with the cytoskeleton / Lokeshwar V.B., Bourguignon L.Y. // *J Biol Chem.* — 1992. — V. 267, №30. — P. 21551-21557.
251. Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells / Akbar A.N., Terry L., Timms A. et al. // *J Immunol.* — 1988. – V. 140, №7. — P. 2171-2178.
252. Lymphocyte specific heterogeneity in the rat leucocyte common antigen (T200) is due to differences in polypeptide sequences near the NH2-terminus / Barclay A.N., Jackson D.I., Willis A.C. et al. // *EMBO J.* — 1987. – V. 6, №5. — P. 1259-1264.
253. Lynch, K.W. A model system for activation-induced alternative splicing of CD45 pre-mRNA in T cells implicates protein kinase C and Ras / Lynch K.W., Weiss A. // *Molecular and cellular biology.* – 2000. – V. 20, № 1. – P. 70-80.
254. Lynch, K.W. Consequences of regulated pre-mRNA splicing in the immune system / Lynch K.W. // *Nat. Rev. Immunol.* – 2004. – V. 12. – P. 931-940.

255. Magnani, L. Chromatin and epigenetic determinants of estrogen receptor alpha (ESR1) signaling / Magnani L., Lupien M. // *Nature Reviews Endocrinology*. – 2011. – V. 7, № 12. – P. 715-726.
256. Mann, M. Epigenetics of estrogen receptor signaling: role in hormonal cancer progression and therapy / Mann M., Cortez V., Vadlamudi R.K. // *Cancers (Basel)*. – 2011. – V. 3, № 3. – P. 1691-1707.
257. Martinez, M.N. Control of alternative splicing in immune responses: many regulators, many predictions, much still to learn / Martinez M.N., Lynch W.K. // *Immunological Reviews*. – 2013. – V. 253. – P. 216-236.
258. Matera, A.G. A day in the life of the spliceosome / Matera A.G., Wang Z. // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. — 2014. — V. 15. — P. 108-121.
259. Matlin, A.J. Understanding alternative splicing: towards a cellular code / Matlin A.J., Clark F., Smith C.W. // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2005. – V. 6, №5. – P. 386–398.
260. McCrudden, A.B. Androgen receptor in the human thymus / McCrudden A.B., Stimson W.H. // *Immunol Lett*. – 1984. – V. 8, № 1. – P. 49-53.
261. Mechanisms of Glucocorticoid-mediated Apoptosis in Hematological Malignancies / Greenstein S., Ghias K., Krett N.L. et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2002. – V. 8, № 7. – P. 1681-1694.
262. Meeker, A.K. Telomerase is activated in the prostate and seminal vesicles of the castrated rat / Meeker A.K., Sommerfeld H.J., Coffey D.S. // *Endocrinology*. – 1996. – V. 137, № 12. – P. 5743-5746.
263. Merckenschlager M. Evidence for differential expression of CD45 isoforms by precursors for memory-dependent and independent cytotoxic responses: human CD8 memory CTLp selectively express CD45RO (UCHL1) / Merckenschlager M., Beverley P.C. // *Int Immunol*. — 1989. — V. 1, №4. — P. 450-459.
264. Miller, W.L. Steroid hormone synthesis in mitochondria / Miller W.L. // *Mol Cell Endocrinol*. – 2013. – V. 379, №1-2. – P. 62-73.
265. Miller, W.L. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders / Miller W.L., Auchus R.J. // *Endocr. Rev.* – 2011. – V. 32. – P. 81-151.
266. Miller, W.L. Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking / Miller W.L., Bose H.S. // *J Lipid Res*. – 2011. – V. 52, №12. – P. 2111-2135.

267. Mitre-Aguilar, I.B. Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids: implications for breast cancer / Mitre-Aguilar I.B., Cabrera-Quintero A.J., Zentella-Dehesa A. // *Int J Clin Exp Pathol.* – 2015. – V. 8. – P. 1-10.
268. Mockenhaupt, S. Non-coding functions of alternative pre-mRNA splicing in development [Electronic resource] / Mockenhaupt S, Makeyev E.V. // *Semin Cell Dev Biol.* — 2015. — V. 15. — Mode of access: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952115002153>
269. Möröy, T. Growth factor independence 1 (Gfi1) as a regulator of lymphocyte development and activation / Möröy T., Khandanpour C. // *Semin Immunol.* – 2011. – V. 23, №5. – P. 368-378.
270. Mosmann, T.R. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties / Mosmann T.R., Coffman R.L. // *Annu Rev Immunol.* — 1989. — V. 7. — P. 145-173.
271. Motta-Mena, B.L. Context-dependent regulatory mechanism of the splicing factor hnRNP LL / Motta-Mena B.L., Heyd F., Lynch W.K. // *Mol. Cell.* – 2010. – V. 37, № 2. – P. 223-234.
272. Muñoz-Cruz S. Non-reproductive effects of sex steroids: their immunoregulatory role / Muñoz-Cruz S., Togno-Pierce C., Morales-Montor J. // *Curr Top Med Chem.* – 2011. – V. 11, №13. – P. 1714-1727.
273. Mustelin, T. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases / Mustelin T., Tasken K. // *Biochem. J.* – 2003. – V. 371. – P. 15–27.
274. Mutual dependence of *Candida albicans* Est1p and Est3p in telomerase assembly and activation / Hsu M., Yu E.Y., Singh S.M. et al. // *Eukaryot Cell.* – 2007. – V. 6, №8. – P. 1330-1338.
275. Naive T-cells in myelodysplastic syndrome display intrinsic human telomerase reverse transcriptase (hTERT) deficiency / Yang L., Mailloux A., Rollison D.E. et al. // *Leukemia.* – 2013. – V. 27, №4. – P. 897-906.
276. Nieschlag, E. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Medical consequences of doping with anabolic androgenic steroids: effects on reproductive functions / Nieschlag E., Vorona E. // *Eur J Endocrinol.* – 2015. – V. 173, № 2. – P. R47-58.

277. Nilsen, T.W. Control of alternative splicing in immune responses: many regulators, many predictions, much still to learn / Nilsen T.W., Graveley B.R. // *Nature*. – 2010. – V. 463, №7280. – P. 457-463.
278. Novel mechanism for inhibition of human T cells by glucocorticoids. Glucocorticoids inhibit signal transduction through IL-2 receptor. / Paliogianni F., Ahuja S.S., Balow J.P. et al. // *J. Immunol.* – 1993. – V. 151, № 8. – P. 4081-4089.
279. Olsen, N.J. Effects of androgens on T and B lymphocyte development / Olsen N.J., Kovacs W.J. // *Immunol Res.* – 2001. – V. 23, № 2-3. – P. 281-288.
280. Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes / Meagher L.C., Cousin J.M., Seckl J.R. et al. // *J Immunol.* – 1996. – V. 156, № 11. – P. 4422-4428.
281. Osborne, L.C. Regulation of memory T cells by  $\gamma$ c cytokines / Osborne L.C., Abraham N. // *Cytokine*. – 2010. – V. 50, № 2. – P. 105-113.
282. Osterhage, J.L. Stimulation of Yeast Telomerase Activity by the Ever Shorter Telomere 3 (Est3) Subunit Is Dependent on Direct Interaction with the Catalytic Protein Est2 / Osterhage J.L., Talley J.M., Friedman K.L. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2006. – V. 13. – P. 720-728.
283. Osterhage, J.L. Chromosome end maintenance by telomerase / Osterhage J.L., Friedman K.L. // *J Biol Chem.* – 2009. – V. 284, № 24. – P. 16061-16065.
284. Overexpression of Telomerase Protects Human and Murine Lung Epithelial Cells from Fas- and Bleomycin-Induced Apoptosis via FLIP Upregulation [Electronic resource] / Arish N., Cohen P.Y., Golan-Gerstl R. et al. // *PLoS One*. – 2015. – V. 10, №5. – Mode of access: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0126730>
285. Paiva, R.M. Telomere dysfunction and hematologic disorders / Paiva R.M., Calado R.T. // *Prog Mol Biol Transl Sci.* – 2014. – V. 125. – P. 133-157.
286. Pao L.I. 3. Syk, but not Lyn, recruitment to B cell antigen receptor and activation following stimulation of CD45- B cells / Pao L.I., Cambier J.C. // *J Immunol.* – 1997. – V. 158, №6. – P. 2663–2669.
287. Perturbed T Cell IL-7 Receptor Signaling in Chronic Chagas Disease / Albareda M.C., Perez-Mazliah D., Natale M.A. et al. // *J Immunol.* – 2015. – V. 194, № 8. – P. 3883-3889.

288. Picker, L.J. Regulation of tissue-selective T-lymphocyte homing receptors during the virgin to memory/effector cell transition in human secondary lymphoid tissues / Picker L.J. // *Am Rev Respir Dis.* – 1993. – V. 148, №6 Pt 2. – P. 47-54.
289. Poole, J.C. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT) / Poole J.C., Andrews L.G., Tollefsbol T.O. // *Gene.* – 2001. – V. 269, № 1-2. – P. 1-12.
290. Pradhan, D. The spectrin-ankyrin skeleton controls CD45 surface display and interleukin-2 production / Pradhan D., Morrow J. // *Immunity.* — 2002. — V. 17, №3. — P. 303-315.
291. Premature senescence of T lymphocytes from patients with  $\beta$ -thalassemia major / Gharagozloo M., Bagherpour B., Tahanian M. et al. // *Immunol Lett.* – 2009. – Vol. 122, № 1. – P. 84-88.
292. Prevention and reversal of renal allograft rejection by antibody against CD45RB / Lazarovits A.I., Poppema S., Zhang Z. et al. // *Nature.* — 1996. – V. 380, №6576. — P. 717-720.
293. Prevention of critical telomere shortening by oestradiol in human normal hepatic cultured cells and carbon tetrachloride induced rat liver fibrosis / Sato R., Maesawa C., Fujisawa K. et al. // *Gut.* – 2004. – V. 53, № 7. – P. 1001-1009.
294. Prolonged exposure of naïve CD8<sup>+</sup> T cells to interleukin-7 or interleukin-15 stimulates proliferation without differentiation or loss of telomere length / Wallace D.L., Bérard M., Soares M.V. et al. // *Immunology.* – 2006. – V. 119, №2. – P. 243-253.
295. Prossnitz, E.R. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease / Prossnitz E.R., Barton M. // *Nature Reviews Endocrinology.* – 2011. –V. 7, № 12. –P. 715-726.
296. Protein tyrosine phosphatases as potential therapeutic targets / He R.J., Yu Z.H., Zhang R.Y. et al. // *Acta Pharmacol Sin.* — 2014. – V. 35, №10. — P. 1227-1246.
297. Pulido, R. Glycosylation of CD45: carbohydrate processing through Golgi apparatus is required for cell surface expression and protein stability / Pulido R., Sánchez-Madrid F. // *Eur J Immunol.* — 1992. — V. 22, №2. — P. 463-468.
298. Quiescence and functional reprogramming of Epstein-Barr virus (EBV)-specific CD8<sup>+</sup> T cells during persistent infection / Dunne P.J., Belaramani L., Fletcher J.M. et al. // *Blood.* — 2005. – V. 106, №2. — P. 558-865.

299. Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through Lck and Fyn / Löwenberg M., Tuynman J., Bilderbeek J. et al. // *Blood*. – 2005. – V. 106, №5. – P. 1703-1710.
300. Rat thymic dihydrotestosterone receptor: preparation, location and physiochemical properties / Grossman C.J., Nathan P., Taylor B.B. et al. // *Steroids*. – 1979. – V. 34, № 5. – P. 539-553.
301. Redondo, J.M. Inhibition of interleukin 2-induced proliferation of cloned murine T cells by glucocorticoids. Possible involvement of an inhibitory protein / Redondo J.M., Fresno M., López-Rivas A. // *Eur J Immunol*. – 1988. – V. 18, № 10. – P. 1555-1559.
302. Regulated expression of telomerase activity in human T lymphocyte development and activation / Weng N.P., Levine B.L., June C.H. et al. // *J Exp Med*. – 1996. – V. 183, №6. – P. 2471-2479.
303. Regulation of T cell subsets from naive to memory / Carter L.L., Zhang X., Dubey C. et al. // *J Immunother*. – 1998. – V. 21, № 3. – P. 181-187.
304. Regulatory interactions between CD45RB<sup>high</sup> and CD45RB<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup> T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity / Powrie F., Correa-Oliveira R., Mauze S. et al. // *J Exp Med*. — 1994. – V. 179, №2. — P. 589-600.
305. Repression of farnesoid X receptor during the acute phase response / Kim M.S., Shigenaga J., Moser A. et al. // *J. Biol. Chem*. – 2003. – V. 278. – P. 8988-8995.
306. Ribeiro, S.T. Five Layers of Receptor Signaling in  $\gamma\delta$  T-Cell Differentiation and Activation [Electronic resource] / Ribeiro S.T., Ribot J.C., Silva-Santos B. // *Front Immunol*. – 2015. – V. 26. - Mode of access: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2015.00015/abstract>.
307. Role of CD28 for the generation and expansion of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes during infection with *Listeria monocytogenes* / Mittrucker H.W., Kursar M., Kohler A. et al. // *J. Immunol*. – 2001. – V. 167. – P. 5620-5627.
308. Role of CD4 T cell help and costimulation in CD8 T cell responses during *Listeria monocytogenes* infection / Shedlock D.J., Whitmire J.K., Tan J. et al. // *J. Immunol*. – 2003. – V. 170. – P. 2053-2063.
309. Role of CD45 signaling pathway in galactoxylomannan-induced T cell damage [Electronic resource] / Pericolini E., Gabrielli E., Bistoni G. et al. // *PLoS One*. — 2010.

– V. 5, №9. — Mode of access:  
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0012720>

310. Role of cytokines in the pathogenesis of the euthyroid sick syndrome / Bartalena L., Bogazzi F., Brogioni S. et al. // *Eur. J. Endocrinol.* – 1998. – V. 138. – P. 603-614.
311. Sallusto, F. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance / Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A. // *Annu. Rev. Immunol.* – 2004. – V. 22. – P. 745-763.
312. Sanders, M.E. Human naive and memory T cells: reinterpretation of helper-inducer and suppressor-inducer subsets / Sanders M.E., Makgoba M.W., Shaw S. // *Immunol. Today.* – 1988. – V. 9. – P. 195-199.
313. Saunders, A.E. Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45 / Saunders A.E., Johnson P. // *Cell Signal.* — 2010. — V. 3. — P. 339-348.
314. Schäcke, H. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids / Schäcke H., Docke W-D., Asadullah K. // *Pharmacol Ther.* – 2002. – V. 96. – P. 23-43.
315. Schluns, K.S. Cytokine control of memory T-cell development and survival / Schluns K.S., Lefrancois L. // *Nat Rev Immunol.* – 2003. – V. 3, № 4. – P. 269-279.
316. Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8+ memory T cell subsets / Huster K.M., Busch V., Schiemann M. et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2004. – V. 101, № 15. – P. 5610-5615.
317. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells / Kaech S.M., Tan J.T., Wherry E.J. et al. // *Nat Immunol.* – 2003. – V. 4, № 12. – P. 1191-1198.
318. Selective regulation of Lyn tyrosine kinase by CD45 in immature B cells / Katagiri T., Ogimoto M., Hasegawa K. et al. // *J Biol Chem.* — 1995. – V. 270. — P. 27987-27990.
319. Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity / Cutolo M., Sulli A., Capellino S. et al. // *Lupus.* – 2004. – V. 13, № 9. – P. 635-638.
320. Sex hormones, acting on the Tert gene, increase telomerase activity in human primary hematopoietic cells / Calado R.T., Yewdell W.T., Wilkerson K.L. et al. // *Blood.* – 2009. – V. 114, № 11. – P. 2236-2243.

321. Sex steroid receptors in peripheral T cells: absence of androgen receptors and restriction of estrogen receptors to OKT8-positive cells / Cohen J.H., Danel L., Cordier G. et al. // *J Immunol.* – 1983. – V. 131, № 6. – P. 2767-2771.
322. Sex steroids, immune system, and parasitic infections: facts and hypotheses / Nava-Castro K., Hernández-Bello R., Muñoz-Hernández S. et al. // *Ann N Y Acad Sci.* – 2012. – V. 1262. – P. 16-26.
323. Shay, J.W. A survey of telomerase activity in human cancer / Shay J.W., Bacchetti S. // *Eur J Cancer.* – 1997. – V. 33, №5. – P. 787-791.
324. Shay, J.W. Hallmarks of telomeres in ageing research / Shay J.W., Wright W.E. // *J Pathol.* – 2007. – V. 211, № 2. – P. 114-123.
325. Shipkova, M. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation / Shipkova M., Wieland E. // *Clin Chim Acta.* – 2012. – V. 413, № 17-18. – P. 1338-1349.
326. Shortened telomeres in the expanded CD28-CD8+ cell subset in HIV disease implicate replicative senescence in HIV pathogenesis / Effros R.B., Allsopp R., Chiu C.P. et al. // *Biochemistry (Mosc).* – 2011. – V. 76, №8. – P. 951-957.
327. Sick euthyroid syndrome is associated with decreased TR expression and DNA binding in mouse liver / Beigneux A.P., Moser A.H., Shigenaga J.K. et al. // *Am. J. Physiol.* – 2003. – V. 284. – P. E228-E236.
328. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer / Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R. et al. // *Science.* – 1994. – V. 266, №5193. – P. 2011-2018.
329. Splicing factors SF1 and U2AF associate in extraspliceosomal complexes / Rino J., Desterro J.M., Pacheco T.R. et al. // *Mol Cell Biol.* – 2008. – V. 28, №9. – P. 3045-3057.
330. Splicing of designer exons reveals unexpected complexity in pre-mRNA splicing / Zhang X.H., Arias M.A., Ke S. et al. // *RNA.* – 2009. – V. 15, №3. – P. 367-376.
331. Stahn, C. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids / Stahn C., Buttgerit F. // *Nat Clin Pract Rheumatol.* – 2008. – V. 4, № 10. – P. 525-533.
332. Stamm, S. Signals and their transduction pathways regulating alternative splicing: a new dimension of the human genome / Stamm S. // *Human Molecular Genetics.* – 2002. – V. 11, №20. – P. 2409-2416.

333. Stepwise differentiation of CD4 memory T cells defined by expression of CCR7 and CD27 / Fritsch R.D., Shen X., Sims G.P. et al. // *J Immunol.* – 2005. – V. 175, №10. – P. 6489-6497.
334. Stimson, W.H. Oestrogen and human T lymphocytes: presence of specific receptors in the T-suppressor/cytotoxic subset / Stimson W.H. // *Scand J Immunol.* – 1988. – V. 28, № 3. – P. 345-350.
335. Subdomain X of the kinase domain of Lck binds CD45 and facilitates dephosphorylation / Felberg J., Lefebvre D.C., Lam M. et al. // *J Biol Chem.* — 2004. – V. 279, №5. — P. 3455-3462.
336. Suppression of IL7Ralpha transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival / Park J.H., Yu Q., Erman B. et al. // *Immunity.* – 2004. – V. 21, № 2. – P. 289-302.
337. Surh, C.D. Homeostasis of Naive and Memory T Cells / Surh C.D., Sprent J. // *Immunity.* – 2008. – V. 29, №6. – P. 848-862.
338. Surh, C.D. Regulation of mature T cell homeostasis / Surh C.D., Sprent J. // *Semin Immunol.* – 2005. – V. 17, №3. – P.183-191.
339. Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for testosterone in the response to influenza vaccination / Furman D., Hejblum B.P., Simon N. et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2014. – V. 111, № 2 – P. 869-874.
340. T cell development in mice expressing splice variants of the protein tyrosine phosphatase CD45 / Kozieradzki I., Kündig T., Kishihara K. et al. // *J Immunol.* — 1997. – V. 158, №7. — P. 3130-3139.
341. Taves, M.D. Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function / Taves M.D., Gomez-Sanchez C.E., Soma K.K. // *Am J Physiol Endocrinol Metab.* – 2011. – V. 301, №1. – P. 11-24.
342. T-cell receptor proximal signaling via the Src-family kinases, Lck and Fyn, influences T-cell activation, differentiation, and tolerance / Salmond R.J., Filby A., Qureshi I. et al. // *Immunol Rev.* — 2009. – V. 228, №1. — P. 9-22.
343. Tchilian, E.Z. Altered CD45 expression and disease / Tchilian E.Z., Beverley P.C. // *Trends Immunol.* — 2006. — V. 27, №3. — P. 146-153.

344. TCR-independent proliferation and differentiation of human CD4+ T cell subsets induced by cytokines / Geginat J., Campagnaro S., Sallusto F. et al. // *Adv Exp Med Biol.* – 2002. – V. 512. – P. 107-112.
345. TCR-mediated activation promotes GITR upregulation in T cells and resistance to glucocorticoid-induced death / Zhan Y., Funda D.P., Every A.L. et al. // *Int Immunol.* – 2004. – V. 16, № 9. – P. 1315-1321.
346. Telomerase activity in human endometrium / Kyo S., Takakura M., Kohama T. et al. // *Cancer Res.* – 1997. – V. 57, № 4. – P. 610-614.
347. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells / Wright W.E., Piatyszek M.A., Rainey W.E. et al. // *Dev Genet.* – 1996. – V. 18, №2. – P. 173-179.
348. Telomerase regulates MYC-driven oncogenesis independent of its reverse transcriptase activity / Koh C.M., Khattar E., Leow S.C. et al. // *J Clin Invest.* – 2015. – V. 125, №5. – P. 2109-2122.
349. Telomere end-replication problem and cell aging / Levy M.Z., Allsopp R.C., Futcher A.B. et al. // *J Mol Biol.* – 1992. – V. 225, №4. – P. 951-960.
350. Telomere length and common disease: study design and analytical challenges / Barrett J.H., Iles M.M., Dunning A.M. et al. // *Hum Genet.* – 2015. – V. 134, №7. – P. 679-689.
351. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts / Allsopp R.C., Vaziri H., Patterson C. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. – V. 89. – P. 10114-10118.
352. Telomere loss, senescence, and genetic instability in CD4+ T lymphocytes overexpressing hTERT / Roth A., Baerlocher G.M., Schertzer M.E. et al. // *Blood.* – 2005. – V. 106. – P. 43-50.
353. TERC identified as a probable target within the 3q26 amplicon that is detected frequently in non-small cell lung cancers / Yokoi S., Yasui K., Iizasa T. et al. // *Clin Cancer Res.* – 2003. – V. 9, №13. – P. 4705-4713.
354. Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity / Zhao S., Zhu W., Xue S. et al. // *Cell Mol Immunol.* – 2014. – V. 11, № 5. – P. 428-437.
355. Testosterone affects neural gene expression differently in male and female juncos: a role for hormones in mediating sexual dimorphism and conflict [Electronic resource] / Peterson M.P., Rosvall K.A., Choi J.H. et al. // *PLoS One.* – 2013. – V. 8, № 4 – Mode of access: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0061784>

356. Testosterone receptor blockade restores cellular immunity in male mice after burn injury / Messingham K.A., Shirazi M., Duffner L.A. et al. // *J Endocrinol.* – 2001. – V. 169, № 2. – P. 299-308.
357. The acute phase response is associated with retinoid X receptor repression in rodent liver / Beigneux A.P., Moser A.H., Shigenaga J.K. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – P. 16390-16399.
358. The differential regulation of Lck kinase phosphorylation sites by CD45 is critical for T cell receptor signaling responses / McNeill L., Salmond R.J., Cooper J.C. et al. // *Immunity.* — 2007. – V. 27, №3. — P. 425-437.
359. The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4<sup>+</sup> T cells in the periphery / Akbar A.N., Vukmanovic-Stejic M., Taams L.S. et al. // *Nat Rev Immunol.* – 2007. – V. 7, №3. – P. 231-237.
360. The effects of cytokines on suppression of lymphocyte proliferation by Dexamethasone / Creed T.J., Lee R.W., Newcomb P.V. et al. // *J. Immunol.* – 2009. – V. 183, № 1. – P. 164-171.
361. The flow cytometric analysis of telomere length in antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells during acute Epstein-Barr virus infection / Plunkett F.J., Soares M.V., Annels N. et al. // *Blood.* – 2001. – V. 97, №3. – P. 700-707.
362. The human cytomegalovirus UL11 protein interacts with the receptor tyrosine phosphatase CD45, resulting in functional paralysis of T cells [Electronic resource] / Gabaev I., Steinbrück L., Pokoyski C. et al. // *PLoS Pathog.* — 2011. – V. 7, №12. — Mode of access: <http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1002432>
363. The impact of telomere erosion on memory CD8<sup>+</sup> T cells in patients with X-linked lymphoproliferative syndrome / Plunkett F.J., Franzese O. Belaramani L.L. et al. // *Mech Ageing Dev.* – 2005. – V. 126, №8. – P. 855-865.
364. The kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system / Zen M., Canova M., Campana C. et al. // *Autoimmun Rev.* – 2011. – V. 10, № 6. – P. 305-310.
365. The loss of telomerase activity in highly differentiated CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> T cells is associated with decreased Akt (Ser473) phosphorylation / Plunkett F.J., Franzese O., Finney H.M. et al. // *J Immunol.* – 2007. – V. 178, №12. – P. 7710-7719.

366. The mechanisms underlying sexual differentiation of behavior and physiology in mammals and birds: relative contributions of sex steroids and sex chromosomes [Electronic resource] / Maekawa M., Tsukahara S., Kawashima T. et al. // *Front Neurosci.* – 2014. – V. 4, №242. – Mode of access: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2014.00242/abstract>
367. The noncatalytic domains of Lck regulate its dephosphorylation by CD45/ Lefebvre D.C., Felberg J., Cross J.L. et al. // *Biochim Biophys Acta.* — 2003. – V. 1650, №1-2. — P. 40-49.
368. The role of Cd8+ T-cell replicative senescence in human aging / Effros R.B., Dagarag M., Spaulding C. et al. // *Immunol. Rev.* – 2005. – V. 205. – P. 147-157.
369. The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis / Krueger A., Fas S.C., Baumann S. et al. // *Immunol Rev.* – 2003. – V. 193. – P. 58-69.
370. The role of sex steroids and gonadectomy in the control of thymic involution / Hince M., Sakkal S., Vlahos K. et al. // *Cell Immunol.* – 2008. – V. 252, № 1-2. – P. 122-138.
371. The transcriptional repressor Gfi1 affects development of early, uncommitted c-Kit+ T cell progenitors and CD4/CD8 lineage decision in the thymus / Yücel R., Karsunky H., Klein-Hitpass L. et al. // *J Exp Med.* – 2010. – V. 197, №7. – P. 831-844.
372. The wedelolactone derivative inhibits estrogen receptor-mediated breast, endometrial, and ovarian cancer cells growth [Electronic resource] / Xu D., Lin T.H., Yeh C.R. et al. // *Biomed Res Int.* – 2014. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25221777>.
373. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets / Mahnke Y.D., Brodie T.M., Sallusto F. et al. // *Eur J Immunol.* – 2013. – V. 43, №11. – P. 2797-2809.
374. The CD27 and CD70 costimulatory pathway inhibits effector function of T helper 17 cells and attenuates associated autoimmunity / Coquet J.M., Middendorp S., van der Horst G. et al. // *Immunity.* – 2013. – V. 38, №1. – P. 53-65.
375. Thomas, J.A. The role of innate immunity in spontaneous regression of cancer / Thomas J.A., Badini M. // *Indian J Cancer.* — 2011. — V. 48, №2. — P. 246-251.
376. Thomas, M.L. The leukocyte common antigen family / Thomas M.L. // *Annu Rev Immunol.* – 1989. – № 7. – P. 339-369.
377. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and

- ERalpha-knockout mouse / Couse J.F., Lindzey J., Grandien K. et al. // *Endocrinology*. – 1997. – V. 138, № 11. – P. 4613-621.
378. TLR-stimulated CD34 stemcell-derived human skin-like and monocyte-derived dendritic cells fail to induce Th17 polarization of naive T cells but do stimulate Th1 and Th17 memory responses / Duraisingam S.S., Hornig J., Gotch F., et al. // *J Immunol*. – 2009. – V. 183, № 4. – P. 2242-2251.
379. TNF suppresses acute intestinal inflammation by inducing local glucocorticoid synthesis / Noti M., Corazza N., Mueller C. et al. // *J Exp Med*. – 2010. – V. 207, №5. – P. 1057-1066.
380. Tong, A. Differential expression of CD45 isoforms is controlled by the combined activity of basal and inducible splicing-regulatory elements in each of the variable exons / Tong A., Nguyen J., Lynch K.W. // *The journal of biological chemistry*. – 2005. – V. 280, №46. – P. 38297–38304.
381. Transfer of the human telomerase reverse transcriptase (TERT) gene into T lymphocytes results in extension of replicative potential / Rufer N., Migliaccio M., Antonchuk J. et al. // *Blood*. – 2001. – V. 98, №3. – P. 597-603.
382. Trowbridge, I.S. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development / Trowbridge I.S., Thomas M.L. // *Annu Rev Immunol*. — 1994. — V. 12. — P. 85-116.
383. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in T cell development: sensitivity of human thymocytes / Simon A.K., Williams O., Mongkolsapaya J. et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2001. – V. 98, № 9. – P. 5158-5163.
384. Tumor-derived microvesicles promote regulatory T cell expansion and induce apoptosis in tumor-reactive activated CD8+ T lymphocytes / Wieckowski E.U., Visus C., Szajnik M. et al. // *J Immunol*. – 2009. – V. 183, № 6. – P. 3720-3730.
385. Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood / Kimmig S., Przybylski G.K., Schmidt C.A. et al. // *J Exp. Med*. – 2002. – V. 195, № 6. – P. 789-794.
386. Ueda, K. Emerging evidence of the importance of rapid, non-nuclear estrogen receptor signaling in the cardiovascular system / Ueda K., Karas R.H. // *Steroids*. – 2013. – V. 78. – P. 589-596.

387. Vacchio, M.S. Steroid production in the thymus: implications for thymocyte selection / Vacchio M.S., Papadopoulos V., Ashwell J.D. // *J Exp Med.* – 1994. – V. 179, №6. – P. 1835-1846.
388. Viral interference with functions of the cellular receptor tyrosine phosphatase CD45 / Thiel N., Zischke J., Elbasani E. et al. // *Viruses.* — 2015. – V. 7, №3. — P. 1540-1557.
389. von Zglinicki, T. Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence / von Zglinicki T. // *Ann N Y Acad Sci.* – 2000. – V. 908. – P. 99-110.
390. Wang, Y. Expression of CD45 lacking the catalytic protein tyrosine phosphatase domain modulates Lck phosphorylation and T cell activation / Wang Y., Johnson P. // *J Biol Chem.* — 2005. — V. 280, №14. — P. 14318-14324.
391. Watson, J.D. Origin of concatameric T4 DNA / Watson J.D. // *Nature.* – 1971. – V. 239. – P. 197-201.
392. Weng, N.P. Regulation of telomerase expression in human lymphocytes / Weng N.P. // *Springer Semin Immunopathol.* – 2002. – V. 24, №1. – P. 23-33.
393. Weng, N.P. Telomere and adaptive immunity / Weng N.P. // *Mech Ageing Dev.* – 2008. – V. 129, № 1-2. – P. 60-66.
394. X-chromosome complement and estrogen receptor signaling independently contribute to the enhanced TLR7-mediated IFN-alpha production of plasmacytoid dendritic cells from women / Laffont S., Rouquie N., Azar P. et al. // *J. Immunol.* – 2014. – V. 193, № 11. – P. 107-113.
395. Xu, Z. Negative regulation of CD45 by differential homodimerization of the alternatively spliced isoforms / Xu Z., Weiss A. // *Nat. Immunol.* – 2002. – V. 3, № 8. – P. 764-771.
396. Yakimchuk, K. Estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in the normal immune system and in lymphoid malignancies / Yakimchuk K., Jondal M., Okret S. // *Mol Cell Endocrinol.* – 2013. – V. 375, № 1-2. – P. 121-129.