

Шуплецова Валерия Владимировна

**СТЕРОИДНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ
Т-КЛЕТОК РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ**

03.03.01 – физиология

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Томск- 2015

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

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Литвинова Лариса Сергеевна

Официальные оппоненты:

Колобовникова Юлия
Владимировна

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

Кудрявцев Игорь Владимирович

кандидат биологических наук, старший научный
сотрудник отдела иммунологии ФГБУ "НИИ
экспериментальной медицины"

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение
Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии
(г. Новосибирск)

Защита состоится: «__» _____ 2015 г. в _____ на заседании диссертационного
совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете
(634050, г. Томск, Московский тракт, 2)

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

Автореферат разослан «__» _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Петрова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Согласно современным представлениям, эффективность иммунного ответа на антигены различной природы (бактериальные, вирусные, опухолевые и т.д.), определяется генерацией антигенспецифических клеток иммунологической памяти (Janeway Ch. et al., 2004; Хайдуков С.В., 2008; Elyaman et., al., 2008; Селедцов В.И. и др., 2010; Farber D.L., 2010; Ярилин А.А., 2010). Оценка экспрессии поверхностных маркеров и анализ структурно-функциональных свойств этих клеток позволяют выделять «наивные» (CD45RA⁺) лимфоциты и «примированные» (CD45RO⁺) Т-клетки памяти; последние появляются в результате дифференцировки активированных антигеном «наивных» предшественников в ходе нормального развития первичного иммунного ответа *in vivo*. В свою очередь, быстрый и усиленный ответ клеток памяти на специфический антиген является их важнейшим функциональным отличием от их «наивных» предшественников (Elyaman et., al., 2008; Селедцов В.И. и др., 2010; Farber D.L., 2010). Феномен генерации и длительного существования клеток памяти в организме, лежит в основе всех известных на сегодняшний день методов эффективной вакцинации (Janeway Ch. et al., 2004; Селедцов В.И. и др., 2010). Нарушения формирования иммунной памяти, опосредованные гипер- или гипоактивацией Т-клеток, лежат в основе патогенеза целого ряда заболеваний (Radbruch A., Thiel A., 2004; Селедцова Г.В. и соавт., 2008; Elyaman W. et al., 2008).

Степень разработанности темы. Стероидные гормоны играют важнейшую роль в регуляции адаптивных иммунных процессов (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). Уровень стероидных гормонов в организме подвержен значительным изменениям, которые имеют важное значение в адаптации организма к разного рода воздействиям, включая антигенные (Gruver-Yates A.L. et al., 2013; Ayroldi E. et al., 2014; Cheng Q. et al., 2014). В современной литературе основное внимание уделено глюкокортикостероидам (ГК), в связи с их широким применением в клинической практике. Являясь мощными противовоспалительными агентами, ГК оказывают комплексное воздействие на клетки иммунной системы: регулируют апоптоз, ингибируют высвобождение провоспалительных медиаторов, стимулируют продукцию противовоспалительных цитокинов, оказывают влияние на клеточную миграцию, регулируют пролиферативную и функциональную активность клеток (Wherry E.J. et al., 2003; Müller M. et al., 2003; Fedor M.E. et al., 2006; Zhou Q. et al., 2009). Многочисленные исследования последнего десятилетия свидетельствуют, что наряду с ГК, половые гормоны являются одними из ключевых регуляторов иммунных реакций, участвуя в процессах созревания, дифференциации, активации и пролиферации лимфоидных клеток (McMurray R.W. et al., 2001; Yeh S. et al., 2002; Hu Y.C. et al., 2004; Palacios S., 2007; Селедцов В.И. и соавт., 2010; Priyanka H.P. et al., 2013). На сегодняшний день выявлены четкие гендерные различия в реализации иммунного ответа. Так, системная иммунная толерантность, наряду с местной иммуносупрессивной средой у представителей мужского пола, эволюционно направлены на поддержание статуса «иммунной привилегии» органов репродуктивной системы (Татарчук, Т.Ф., Сольский Я.П., 2003; Leposavić G., Perisić M., 2008; Hince M. et al., 2008; Roden A.C. et al., 2004; Lai J.-J. et al., 2012; Chang C. et al., 2013; Zhao S. et al., 2014). Женщины, по сравнению с мужчинами имеют сильный клеточно-опосредованный иммунный ответ с более высокой продукцией антител при антигенной стимуляции (Chang C. et al., 2013). В то же время встречаются данные, указывающие на взаимосвязь между структурной и

функциональной атрофией тимуса и секрецией половых гормонов (Hince M. et al., 2008; Chang C. et al., 2013). Становится очевидным, что все краткосрочные и долговременные эффекты гормонов на иммунитет прямо или косвенно связаны с их влиянием на генерацию, жизнеспособность и функциональную активность Т-клеток.

Целью исследования явилась комплексная оценка дозозависимых эффектов стероидных гормонов (дексаметазона, тестостерона и β -эстрадиола) на функциональную активность Т-лимфоцитов разной степени дифференцировки (наивных - CD45RA⁺ и примированных - CD45RO⁺).

Задачи исследования:

1. Оценить эффекты стероидных гормонов (дексаметазон, β -эстрадиол, тестостерон) на ранние (IL-2-зависимые / ассоциированные с экспрессией молекулы CD25 и продукцией IL-2) и поздние (IL-2-независимые / ассоциированные с экспрессией молекулы пролиферации CD71 и апоптоза CD95) этапы активации Т-клеток разной степени дифференцировки, на фоне CD2/CD3/CD28-антигеннезависимой стимуляции.

2. Исследовать влияние стероидных гормонов (дексаметазон, β -эстрадиол, тестостерон) на взаимосвязь между активацией Т-клеток и экспрессией мРНК гена каталитической субъединицы теломеразы – hTERT Т-клетками разной степени дифференцировки, на фоне CD2/CD3/CD28-антигеннезависимой стимуляции.

3. Дать комплексную оценку влияния стероидных гормонов (дексаметазон, β -эстрадиол, тестостерон) на продукцию про- (IL-2, IFN- γ) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) молекул Т-лимфоцитами разной степени дифференцировки, на фоне CD2/CD3/CD28-антигеннезависимой стимуляции.

4. Установить общие закономерности и особенности стероидной регуляции функциональной активности Т-клеток, в зависимости от степени дифференцировки, на фоне CD2/CD3/CD28-антигеннезависимой активации

Научная новизна

Впервые показано, что эффекты стероидных гормонов: глюкокортикоида – дексаметазона и половых: тестостерона и β -эстрадиола на функциональную активность Т-клеток, подвергшихся антигеннезависимой CD2/CD3/CD28-стимуляции, носят дозозависимый характер; их разнонаправленное действие определяется стадией дифференцировки Т-лимфоцитов.

Приоритетными являются сведения, свидетельствующие о том, что в популяции наивных (CD45RA⁺) Т-клеток дексаметазон оказывает более выраженный подавляющий эффект на ранние (IL-2-зависимые / ассоциированные с экспрессией молекулы CD25 и продукцией IL-2) этапы активации; в культурах примированных Т-клеток памяти (CD45RO⁺) – на более поздние (IL-2-независимые / ассоциированные с экспрессией молекулы пролиферации CD71).

Приведены новые данные, указывающие, что супрессивное действие β -эстрадиола (на фоне CD2/CD3/CD28-стимуляции) на этап ранней активации Т-клеток разной степени дифференцировки, ассоциированный с системой IL-2/IL-2R α , носит однонаправленный характер и имеет четкую зависимость от концентрации гормона. Установлено, что проапоптогенный эффект супрафизиологических доз β -эстрадиола (10^{-7} - 10^{-5} М) у наивных (CD45RA⁺) Т-клеток, но не у примированных (CD45RO⁺), ассоциирован со стимуляцией IL-2-независимой стадии активации. Приоритетными являются данные о том, что тестостерон-индуцированное изменение параметров системы IL-2/IL-2R α активированными Т-клетками разной степени дифференцировки, носит однонаправленный характер и не зависит от концентрации гормона. Супрессивные эффекты тестостерона, в большей степени, затрагивают наивные (CD45RA⁺) Т-клетки. Приоритетными являются данные, свидетельствующие

о том, что разнонаправленные эффекты стероидных гормонов (дексаметазона, тестостерона, β -эстрадиола) на экспрессию мРНК гена каталитической субъединицы фермента теломеразы (hTERT), на фоне антигеннезависимой активации, в целом, носят дозозависимый характер и в совокупности с исследованием параметров функциональной активности, позволяют дать оценку репликативного потенциала Т-клеток разной степени дифференцировки. В экспериментальных условиях *in vitro* продемонстрировано, что разнонаправленное, разной степени выраженности действие стероидных гормонов (дексаметазона, тестостерона, β -эстрадиола) на баланс продукции Th1/Th2 цитокинов (в условиях CD2/CD3/CD28-активации) определяется стадией дифференцировки Т-лимфоцитов.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные данные фундаментального характера раскрывают новые аспекты стероидной регуляции функциональной активности Т-клеток разной степени дифференцировки, которые лежат в основе формирования первичных и вторичных иммунных реакций. Практическая значимость полученных данных о роли стероидных гормонов в контроле функциональной активности Т-клеток памяти в условиях антигеннезависимой стимуляции, может представлять интерес для расшифровки механизмов, ассоциированных с формированием хронического иммунного и гормонального дисбаланса. Результаты исследования могут быть положены в основу разработки патогенетически обоснованных технологий коррекции иммунных нарушений, ассоциированных с формированием гормонального дисбаланса.

Результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе на кафедрах фундаментальной медицины медицинского института БФУ им. И. Канта и кафедре 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 ($CD45RA^+CD62L^+$) и примированных ($CD45RO^+$) Т-лимфоцитов, полученные (методом иммуномагнитной сепарации) из взвеси мононуклеарных клеток периферической венозной крови здоровых доноров.

Основные методы исследования:

1. Иммуномагнитная сепарация (получение монокультур $CD45RA^+$ и $CD45RO^+$ Т-лимфоцитов из взвеси мононуклеарных клеток здоровых доноров);
2. Культуральные методы исследования;
3. Оценка жизнеспособности $CD45RA^+$ и $CD45RO^+$ Т-клеточных культур; определение поверхностных молекул - CD25, CD71, CD95 на Т-клетках разной степени дифференцировки методом проточной цитометрии;
4. Определение концентрации про- (IL-2, IFN- γ) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов в супернатантах клеточных культур $CD45RA^+$ и $CD45RO^+$ Т-клеток методом иммуноферментного анализа;
5. Определение относительного уровня экспрессии мРНК гена каталитической субъединицы фермента теломеразы – hTERT методом полимеразной цепной реакции.
6. Статистический анализ результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Эффекты стероидных гормонов: глюкокортикоида - дексаметазона и половых: тестостерона и β -эстрадиола на функциональную активность Т-клеток,

ассоциированную с мембранной экспрессией молекул CD25/IL-2R α , CD71, CD95, а также с продукцией IL-2, подвергшихся антигеннезависимой CD2/CD3/CD28-стимуляции, носят дозозависимый характер; их разнонаправленное действие определяется стадией дифференцировки Т-лимфоцитов.

2. Оценка взаимосвязи между активацией Т-клеток (IL-2-зависимыми и IL-2-независимыми этапами активации) и экспрессией мРНК гена каталитической субъединицы теломеразы – hTERT, на фоне CD2/CD3/CD28-антигеннезависимой стимуляции, позволяет оценить состояние репликативного потенциала Т-клеток разной степени дифференцировки.

3. Стадия дифференцировки Т-клеток определяет разнонаправленное, разной степени выраженности действие стероидных гормонов (дексаметазона, тестостерона, β -эстрадиола) на баланс продукции Th1/Th2 цитокинов в условиях их CD2/CD3/CD28-активации *in vitro*.

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, полимеразно-цепная реакция) и методических подходов, высокотехнологичного оборудования, а также адекватных критериев для статистической обработки результатов.

Результаты проведенных исследований докладывались и обсуждались на XVI-ой Межгородской научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2010); Первой международной научно-практической конференции "Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине" (Санкт-Петербург, 2010); XVII-ой Межгородской научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2011); заочной международной научно-практической конференции «Современные проблемы и пути их решения в науке, транспорте, производстве и образовании '2011» (Одесса: Черноморье, 2011); II международной конференции "Биотехнология. Взгляд в будущее" (Казань, 2013); III Европейской конференции по биологии и медицинским наукам (III European Conference on Biology and Medical Sciences) (Вена, Австрия); международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы образования и науки» (Тамбов, 2014).

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.); «Исследование эндокринных механизмов регуляции иммунологической памяти» (Аналитическая ведомственная целевая программа «Развитие научного потенциала высшей школы», РНП № 2.1.1/13062); "Стероидная регуляция иммунной памяти» (Грант Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых - докторов наук (Конкурс - МД-2012), МД-4999.2012.7); «Разработка технологии дозозависимого управления процессами клеточного гомеостаза и функциональным состоянием Т-клеток памяти с применением биомолекул (цитокинов)» (Соглашение 14.132.21.1778 от 01.10.12 г.); «Роль стероидных гормонов в дифференцировке Т-клеток памяти: молекулярно-генетический и иммуно-морфологический аспекты» (Соглашение № 14.А18.21.1121 от 14.09.2012 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 18 печатных работ, из них 9 статей в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, определенных ВАК РФ и 9 статей и тезисов в материалах конференций и симпозиумов.

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 146 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырёх глав, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 14 рисунками и 11 таблицами. Библиографический указатель включает 353 источника (41 – отечественный и 312 – иностранных).

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

В основу работы положены результаты комплексного обследования 52 здоровых доноров (26 мужчин и 26 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; эндокринные, инфекционные, онкологические, аутоиммунные, наследственные и психические болезни; алкогольная и наркотическая зависимости. Материалом для исследования явились первичные культуры Т-лимфоцитов (n=104), имеющие разную степень дифференцировки (наивные – CD45RA⁺CD62L⁺, n=52; примированные – CD45RO⁺, n=52), полученные из взвеси мононуклеарных лейкоцитов (МНК) 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 Инновационного парка БФУ им. И.Канта (зав. лабораторией – д-р мед. наук, Л.С. Литвинова).

Дизайн исследования схематично представлен на рисунке 1.

В работе была использована *активационная модель*, которая отражает процесс взаимодействия Т-лимфоцитов разной степени дифференцировки с антиген-презентирующими клетками (АПК) (активация Т-клеток через CD2, CD3 и CD28).

Выделение мононуклеарных лейкоцитов из периферической крови осуществляли стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографин («Pharmacia», Швеция) ($\rho=1,077$ г/см³). Получение монокультур «наивных» (CD45RA⁺CD62L⁺) и «примированных» (CD45RO⁺) Т-лимфоцитов из фракции мононуклеарных лейкоцитов осуществляли методом иммуномагнитной сепарации, в основе которого лежит технология MACS® («Miltenyi Biotec», Германия).

Подсчёт клеточности в культурах Т-клеток разной степени дифференцировки проводили с помощью автоматического счётчика клеток (CountessTM Automated Cell Counter, «Invitrogen», США) с использованием красителя Trypan blue 0,4% («Invitrogen», США). Жизнеспособность составляла не менее 95-98% от общего числа клеток.

В эксперименте использовали клеточные культуры, содержание CD3⁺CD45RA⁺CD62L⁺CD14⁻CD19⁻ и CD3⁺CD45RO⁺CD14⁻CD19⁻ клеток в которых, составляло, в среднем $97,5 \pm 2,12\%$.

Полученные клетки с фенотипом наивных (CD45RA⁺CD62L⁺) и примированных (CD45RO⁺) (1×10^6 кл/мл) культивировали в 48-луночных планшетах в бессывороточной среде Искова («Sigma-Aldrich», США), содержащей 0.5% сывороточного альбумина

человека («Микроген», Россия), 5×10^{-5} М β -меркаптоэтанола («Acros Organics», США) и 30 мкг/мл гентамицина в течение 48 ч при 37°C , во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2 .

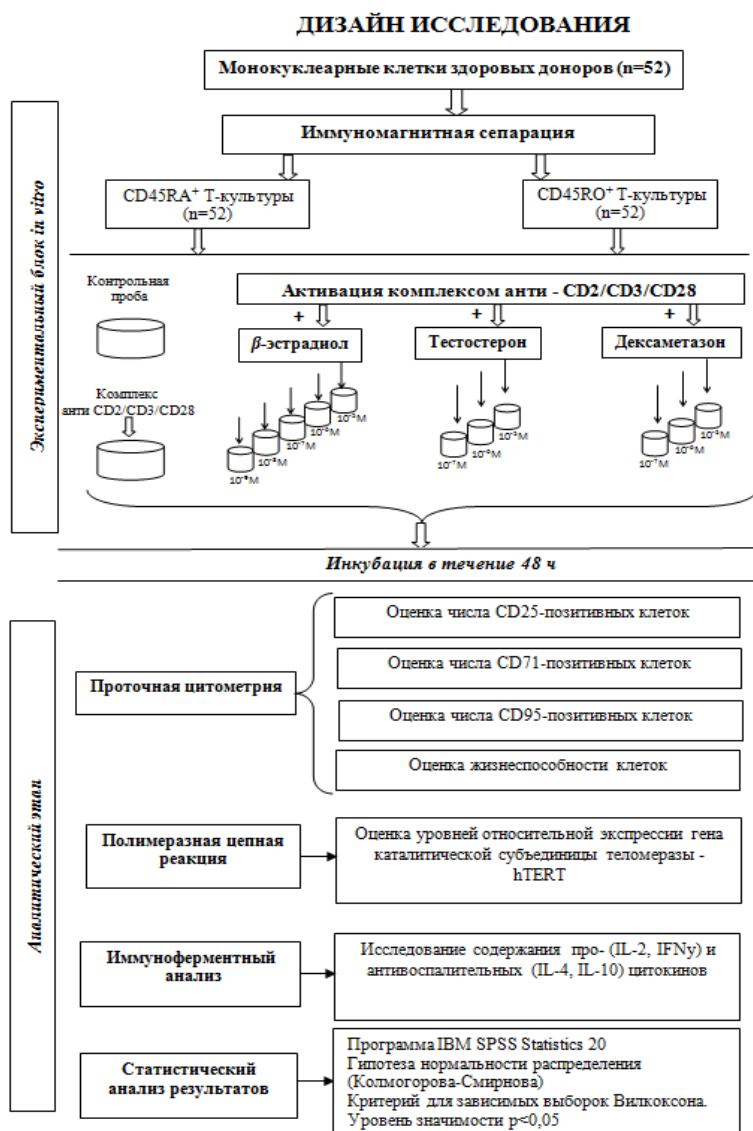


Рисунок 1 - Схема дизайна исследования.

В эксперименте были использованы разные концентрации стероидных гормонов: дексаметазон («KRKA», Словения), тестостерон (Sigma, США) и β -эстрадиол (Sigma, США). В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали реагент T-Cell Activation/Expansion Kit human (Ac/Exp) («Miltenyi Biotec», Германия), который представляет собой анти-биотиновые MACSiBead™ частицы с биотинилированными антителами против CD2^+ , CD3^+ , CD28^+ . Реагент Ac/Exp добавляли в пробы в количестве 5 мкл, которые содержали - $0,5 \times 10^6$ анти-биотиновых MACSiBead™ частиц. Соотношение клеток и активирующих частиц составило 1:2

Для выполнения исследования были использованы следующие варианты культивирования: 1) интактная проба; 2) проба с добавлением CD2/CD3/CD28 - комплекса (Ac/Exp); 3) пробы с добавлением Ac/Exp и дексаметазона (10^{-7} - 10^{-5} М); 4) пробы с добавлением Ac/Exp и тестостерона (10^{-7} - 10^{-5} М); 5) пробы с добавлением Ac/Exp и β -эстрадиола (10^{-9} - 10^{-5} М).

Через 48 ч инкубации проводили регистрацию жизнеспособности и подсчёт числа клеток в исследуемых клеточных культурах с использованием программы «Guava ViaCount» (Millipore, США), методом проточной лазерной цитометрии на проточном цитометре «Guava EasyCite Plus» (Millipore, США), согласно

протоколу производителя. Определение поверхностных маркеров CD25, CD71, CD95 на Т-клетках разной степени дифференцировки осуществляли методом проточной цитометрии с использованием коктейля моноклональных антител к CD45(ViaBlue); CD25(FITC), CD71(APC), CD95(PE) («Bioscience», США), приготовленного *ex temporo*. Измерение образцов клеточных суспензий проводили на проточном цитофлуориметре MACS Quant (“Miltenyi Biotec”, Германия). Результаты цитометрического анализа были проанализированы с помощью программы «KALUZA Analysis Software» (Beckman Coulter, США). Вычисляли процентное число CD3⁺CD25⁺ и CD3⁺CD71⁺ и CD3⁺CD95⁺ Т-лимфоцитов от общего числа CD45 – позитивных клеток в гейте (в культурах CD45RA⁺CD62L⁺ и CD45RO⁺ Т-клеток).

Концентрацию Th1/Th2 (IL-2; IFN-γ; IL-4 и IL-10) цитокинов в супернатантах клеточных культур Т-клеток измеряли с помощью твердофазного иммуноферментного «сэндвич» метода (ELISA) (наборы «Вектор Бест», Россия) на автоматическом иммуноферментном анализаторе Lasurit (Dy nex Technologies, США).

Тотальную РНК из клеток выделяли с использованием водного раствора фенола и гуанидин-изотиоцианата (ExtractRNA kit «Евроген», Россия), согласно протоколу производителя. Концентрацию полученной РНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoVue Plus («GE Healthcare», США). Степень очистки препаратов РНК определяли по соотношению A260/A280. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора реагентов MMLV RT kit («Евроген», Россия), согласно протоколу производителя. В качестве затравки использовали олигонуклеотидный праймер (oligo(dT), 20 мкМ) («Евроген», Россия). Для определения уровня относительной экспрессии *hTERT* проводили ПЦР в режиме реального времени с использованием специфичных гидролизуемых проб. ПЦР проводили с применением реагентов qPCRMixHS («Евроген», Россия). Концентрация праймеров составляла 900 нМ, гидролизуемых проб – 250 нМ. В качестве референсного гена использовали *RPLPO*, кодирующий рибосомальный белок Р0 (таблица 1).

Таблица 1 - Нуклеотидная последовательность праймеров и проб

TERT_for	5'-TGACACCTCACCTCACCCAC-3'
TERT_rev	5'-CACTGTCTTCCGCAAGTTCAC-3'
RPLPO_for	5'-GGCGACCTGGAAGTCCAACT-3'
RPLPO_rev	5'-CCATCAGCACCACAGCCTTC-3'
TERT_probe	FAM-5'-ACCCTGGTCCGAGGTGTCCCTGAG-3'-BHQ-1
RPLPO_probe	HEX-5'-ATCTGCTGCATCTGCTTGGAGCCCA-3'-BHQ-1

ПЦР-реакция была проведена в трех повторах с использованием амплификатора LightCycler 480 Real-Time PCR («Roche», Швейцария) в следующем режиме: 95°C, 5 мин; 95°C, 20 с; 60°C, 30 с; 72°C, 60 с – 45 циклов, 72°C, 5 мин.

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

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

Относительный уровень экспрессии исследуемого гена вычислялся, исходя из его эффективности ПЦР в реальном времени (E) и разности (Δ) точек пересечения (CP) неизвестного образца по сравнению с контрольным (ΔCP=CP контрольного образца – CP исследуемого образца).

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences). Рассчитывали среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (σ). Достоверность различий оценивали с использованием критерия Вилкоксона для зависимых выборок. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0.05$. Связь между исследуемыми показателями оценивали с использованием регрессионного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении сравнительного анализа действия дексаметазона, тестостерона и β -эстрадиола на функциональную активность наивных и примированных Т-клеток в периферической крови у условно здоровых лиц в зависимости от гендерных критериев достоверных различий тестируемых параметров выявлено не было.

В ходе активационного процесса на поверхности лимфоцитов последовательно экспрессируются молекулы активации, пролиферации и апоптоза (Shipkova M., Wieland E., 2012; Литвинова Л.С. и соавт., 2014). Ранний этап активации Т-клеток является ИЛ-2 зависимым и тесно ассоциирован с продукцией ИЛ-2 и мембранной экспрессией молекулы CD25/ИЛ-2R α (Lin J., Weiss A., 2001; Литвинова Л.С. и соавт., 2014). Добавление CD2/CD3/CD28-комплекса способствовало значительному увеличению концентрации ИЛ-2 в среде культивирования: в популяции наивных лимфоцитов – в 53 раза ($p < 0,05$), а в культуре Т-клеток памяти – в 8,6 раза ($p < 0,05$). В интактных пробах CD45RA $^+$ Т-лимфоцитов, содержание ИЛ-2 в супернатантах клеточных культур было в 6,5 раз меньше, чем в популяции CD45RO $^+$ Т-клеток (**таблица 2**). Закономерным явилось увеличение числа CD45RA $^+$ и CD45RO $^+$ Т-клеток, несущих на своей мембране молекулу CD25 ($p < 0,05$) (**рисунок 2а**).

Глюкокортикоиды (ГК) относятся к классу стероидных гормонов и являются мощными иммуносупрессивными и противовоспалительными агентами, 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; Cheng Q., Morand E., Yang Y.H., 2014; Ayroldi E. et al., 2014). Добавление дексаметазона в максимальной концентрации (10^{-5} М) способствовало снижению продукции ИЛ-2 в культурах активируемых наивных (CD45RA $^+$) и примированных (CD45RO $^+$) клеток на 52 и 32%, соответственно (**таблица 2**). Логичным явилось уменьшение числа CD45RA $^+$ CD25 $^+$ и CD45RO $^+$ CD25 $^+$ Т-лимфоцитов под действием гормона ($p < 0,05$).

Наши результаты частично согласуются с данными мировой литературы. Установлено, что дексаметазон способен подавлять продукцию ИЛ-2 активированными Т-клетками за счет действия на транскрипцию гена ИЛ-2 (ингибируя транскрипционные факторы AP-1 и NF- κ B), а также на раннюю стадию каскада сигнальной трансдукции, инициированной TCR-активацией (Simon A.K. et al., 2001; Tang Q. et al., 2008; Creed T.J. et al., 2009; Гуцол А.А. и соавт., 2013). В то же время, снижение экспрессии ИЛ-2R α является вторичным эффектом, реализуемым за счет угнетения продукции ИЛ-2. Экзогенный ИЛ-2 предотвращает данный эффект (Boumpas D.T. et al., 1991; Goleva E. et al., 2002; Nelson B.H. 2004; Malek T.R., Bayer A.L. 2004; Pandolfi J. et al., 2013).

Ключевая функция ИЛ-2 заключается в обеспечении перехода антиген-активированных CD4 $^+$ и CD8 $^+$ - лимфоцитов из G1 в S-фазу клеточного цикла, что, в конечном итоге, приводит к их пролиферации (Yamamoto M. et al., 2013; Литвинова Л.С. и соавт., 2014). Эта стадия ассоциирована с экспрессией молекулы CD71 (рецептор к трансферрину) (Хайтов Р.М., 2009; Литвинова Л.С. и соавт., 2013, 2014). Активация CD45RA $^+$ и CD45RO $^+$ Т-лимфоцитов комплексом анти-CD2/CD3/CD28 приводила к увеличению CD71 $^+$ Т-клеток (в среднем, в 1,5 раза в обеих популяциях)

($p < 0,05$). Добавление дексаметазона на фоне активации способствовало снижению числа CD71⁺-лимфоцитов в обеих популяциях, в среднем, на 30% ($p < 0,05$) (**рисунок 2b**). В культурах наивных CD45RA⁺ Т-клеток эффект наблюдался только при добавлении высокой концентрации гормона 10^{-5} М ($p < 0,05$), а в популяциях CD45RO⁺ - во всем исследуемом диапазоне концентраций - 10^{-7} - 10^{-5} М ($p < 0,05$). В литературе имеются данные, что дексаметазон способен ингибировать пролиферацию эффекторных и регуляторных Т-клеток после TCR-активации (Pandolfi J. et al., 2013). Наблюдаемое нами снижение числа CD71⁺ Т-клеток может быть обусловлено способностью дексаметазона ингибировать пролиферацию Т-клеток за счет подавления продукции цитокинов, в частности, IL-2 (Arzt E. et al., 2000; Tang Q. et al., 2008; Creed T.J. et al., 2009).

Т-лимфоциты представляют особый интерес в отношении исследования регуляции теломеразной активности (Shay J.W., Wright W.E., 2007; Gazzaniga F.S., Weng N.P., 2008; Gharagozloo M. et al., 2009; Molgora B. et al., 2013; Blackburn E.H., 2014), поскольку они являются высоко пролиферирующей популяцией (Elyaman W. et al., 2008; Gharagozloo M. et al., 2009; Benko A.L. et al., 2012). 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). Согласно данным литературы, уровень экспрессии мРНК гена каталитической единицы фермента теломеразы - hTERT эквивалентна активности фермента (Matsumura-Arioka Y. et al., 2005; Королькова О.Ю. и соавт., 2007; Benko A.L. et al., 2012).

Как показало наше исследование, CD2/CD3/CD28-активация наивных (CD45RA⁺) Т-клеток приводила к значительному (в 68,6 раза) возрастанию экспрессии hTERT относительно интактной пробы. Экспрессия мРНК гена hTERT в пробах CD45RO⁺ Т-лимфоцитов с добавлением активатора была в 3,2 раза ниже, чем в интактных образцах. При инкубации активируемых CD45RA⁺ клеток с дексаметазоном (10^{-7} - 10^{-5} М), уровень экспрессии hTERT, в целом, снижался. Наиболее выраженный эффект наблюдался в активированных образцах с добавлением минимальной концентрации (10^{-7} М) гормона. Эффекты дексаметазона на культуры активированных CD45RO⁺ Т-клеток были противоположны (**рисунок 3**).

IL-2-зависимая активация промотора гена hTERT необходима для предотвращения репликативного старения в результате интенсификации пролиферативной активности клеток (Matsumura-Arioka Y. et al., 2005; Кожевников В.С. и соавт., 2009). Наблюдаемое снижение экспрессии hTERT в культурах наивных (CD45RA⁺) Т-клеток могло явиться следствием вышеописанной способности дексаметазона подавлять продукцию IL-2 в культурах (CD45RA⁺) лимфоцитов, а значит, снижать их репликативный потенциал. Поскольку примированные Т-лимфоциты (CD45RO⁺) менее зависимы от IL-2 (Дейл М.М., Формен Д. 1998), то, вероятнее всего, дексаметазон в популяции активированных клеток способствовал повышению экспрессии hTERT и сохранению репликативного потенциала клеток посредством подавления более поздних (IL-2-независимых) этапов активации клеток, ассоциированных с экспрессией молекулы пролиферации – CD71.

CD95 (APO-1, Fas) является одним из наиболее значимых маркеров, определяющих готовность лимфоцитов к запуску активационного апоптоза (Curtin J.F., Cotter T.G., 2003; Жукова О.Б., 2006). Экспрессия молекулы CD95 слабо выражена на мембранах покоящихся Т-клеток и увеличивается примерно в 10 раз после их активации (Drappa J. et al., 1993).

Результаты нашего исследования позволили констатировать, что CD2/CD3/CD28-активация приводила к повышению числа мёртвых лимфоцитов и CD95⁺ Т-клеток в обеих популяциях CD45RA⁺ и CD45RO⁺ ($p < 0,05$) (**рисунок 2с**).

Глюкокортикоидам принадлежит ключевая роль в регуляции иммунных реакций, в частности, в ограничении их чрезмерных проявлений (Ashwell J.D. et al., 2000; Krueger A. et al., 2003). Чувствительность лимфоидных клеток к проапоптотическому действию ГК зависит от стадии их дифференцировки и их функционального предназначения (Müller M. et al., 2003; Zhou Q. et al., 2009; Литвинова Л.С. и соавт., 2011). Добавление дексаметазона к активированным культурам наивных (10^{-6} и 10^{-5} М) и примированных (10^{-5} М) Т-лимфоцитов снижало негативный эффект активации, способствуя уменьшению числа мертвых и CD95-позитивных клеток ($p < 0,05$).

Полученные нами данные указывают на способность дексаметазона подавлять развитие активационного апоптоза, что находит своё подтверждение в опубликованных данных. В частности, в экспериментах *in vivo* и *in vitro* на мышах, 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; Tuckermann J., 2010).

Согласно механизмам их действия, ГК/GR сигналинг, лимитируя транскрипцию (транс-репрессию) воспалительных генов, включая и провоспалительные цитокины, способен оказывать влияние на баланс Th1/Th2, сдвигая его в сторону Th2 (Liu Z. et al., 2009; Spiesa C.M. et al., 2010). Как уже упоминалось ранее, дексаметазон в максимальной концентрации (10^{-5} М) снижал продукцию IL-2 активируемыми CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-клетками на 52 и 32%, соответственно. Нами выявлено угнетающее дозозависимое действие дексаметазона на продукцию IFN- γ CD45RA⁺ Т-клетками. Активированные CD45RO⁺ Т-клетки были чувствительны только к действию максимальной концентрации гормона (10^{-5} М) ($p < 0,05$) (**таблица 2**).

Одним из механизмов снижения содержания IFN- γ в супернатантах клеточных культур Т-клеток под действием дексаметазона, может быть его супрессивное действие дексаметазона на продукцию IL-2. Последний обладает способностью усиливать выработку IFN- γ , в частности, через активацию CD4⁺-лимфоцитов (Ehlers S., Smith K.A., 1991; Letourneau S. et al., 2009).

Эффект дексаметазона на продукцию IL-4 и IL-10 CD45RO⁺ Т-клетками имел супрессивный характер и зависел от концентрации гормона (коэффициент линейной регрессии $r = -0,95$, $p < 0,0023$ для IL-4; $r = -0,89$, $p < 0,0021$ для IL-10). Активированные CD45RA⁺ Т-клетки (в отношении продукции IL-4 и IL-10) были чувствительны только к максимальной дозе дексаметазона (10^{-6} и 10^{-5} М) ($p < 0,05$) (**таблица 2, рисунок 4**).

Таким образом, в наших экспериментах четко проявилась тенденция разнонаправленного влияния дексаметазона на баланс продукции Th1/Th2 цитокинов Т-клетками разной степени дифференцировки. На фоне активации, дексаметазон в большей степени обладает способностью угнетать продукцию наивными Т-клетками памяти Th1-молекул (IFN- γ). Супрессорные эффекты дексаметазона на примированные Т-клетки затрагивают, в основном, секрецию Th2-цитокинов (IL-4, IL-10) (**таблица 2, рисунок 4**).

Эффекты мужского полового гормона (тестостерона) на функциональную активность Т-лимфоцитов разной степени дифференцировки

Участие андрогенов и их рецепторов в регуляции развития и функционирования иммунной системы на сегодняшний день является доказанным, поскольку экспрессия андрогеновых рецепторов (AR) помимо клеток гормон-зависимых органов и тканей, обнаружена в различных иммунных клетках, включая нейтрофилы, тучные клетки,

макрофаги, Т- и В- клетки (Mantalaris A. et al., 2001; Lai J.-J. et al., 2012). Андрогены, как и другие стероиды, реализуют свои эффекты за счет геномных и негеномных механизмов (Foradori C.D. et al., 2008; Chang C. et al., 2013).

Тестостерон в использованных концентрациях (10^{-7} - 10^{-5}) не влиял существенно на жизнеспособность активируемых CD45RA⁺-лимфоцитов. Напротив, тестостерон (10^{-7} - 10^{-5}) снижал количество живых клеток и повышал число CD95⁺ Т-лимфоцитов в культурах CD45RO⁺ Т-клеток по сравнению с пробами только с добавлением активатора (**рисунок 2с**). В литературе имеются сведения, касающиеся разнонаправленного действия мужских половых гормонов на активацию программированной гибели клеток-мишеней в зависимости от их типа и стадии дифференцировки (Hince M. et al., 2008; Литвинова Л.С. и соавт., 2011; 2013).

Проапоптогенный эффект тестостерона, на наш взгляд, может быть обусловлен его прямым действием на примированные Т-клетки, опосредованным через негеномные механизмы. Андрогены способны вызывать быструю активацию киназ-сигнальных каскадов и модулировать внутриклеточные уровни кальция. Поскольку эти эффекты могут осуществляться в клеточных типах, которые не имеют функционального AP, в частности, речь идет о зрелых Т-лимфоцитах (Olsen N.J. и Kovacs W.J., 2001) и в присутствии ингибиторов транскрипции и трансляции, это позволяет предположить негеномные механизмы действия андрогенов (Chang C. et al., 2013).

Тестостерон, независимо от концентрации (10^{-7} - 10^{-5} М), равномерно (в среднем, в 1,4 раза) подавлял продукцию IL-2 ($p < 0,05$) CD45RA⁺ Т-лимфоцитами. Одновременно с этим снижалось число CD25-позитивных CD45RA⁺ лимфоцитов (**рисунок 2а**). Добавление мужского полового гормона в пробы CD45RO⁺ Т-лимфоцитов приводило к достоверному снижению концентрации IL-2 в супернатантах клеточных культур и числа CD45RO⁺CD25⁺ Т-клеток лишь при действии концентрации - 10^{-5} М ($p_1 < 0,05$) (**таблица 2**). Закономерным явилось выявленное нами снижение числа CD71⁺ Т-клеток в культурах наивных и примированных лимфоцитов. CD45RA⁺ Т-клетки обладали наибольшей чувствительностью к супрессивным эффектам гормона (**рисунок 2b**).

Угнетающее влияние тестостерона на систему IL-2–IL-2R в культурах Т-лимфоцитов может быть связано как с его прямым проапоптогенным и антипролиферативным эффектом на Т-клетки (Roden A.C. et al., 2004; Lai J.-J. et al., 2012), так и его ингибирующим влиянием на продукцию цитокинов (подавление экспрессии NF-κB) (Li S. et al., 2013). Поскольку CD45RO⁺ Т-лимфоциты менее зависимы от IL-2 (Дейл М.М., Формен Д. 1998), то вполне логичным представляется тот факт, что действие тестостерона на CD45RO⁺ Т-клетки проявлялось только в его высокой концентрации (10^{-5} М). Кроме того, как уже упоминалось – на зрелых периферических Т-клетках экспрессия андрогеновых рецепторов менее выражена, чем на наивных лимфоцитах (Bebo B.F. et al., 1999; Olsen N.J. и Kovacs W.J., 2001).

Добавление тестостерона в культуры активированных CD45RA⁺ Т-клеток сопровождалось, в целом, повышением экспрессии мРНК гена hTERT. Интересно, что самый высокий уровень экспрессии hTERT регистрировался при добавлении супрафизиологической концентрации (10^{-5} М) тестостерона и, наряду с угнетением IL-2-зависимых ранних этапов активации и пролиферации, сочетался с отсутствием проапоптогенного эффекта гормона. Мы предполагаем, что вышесказанное может свидетельствовать о протективном влиянии высоких концентраций тестостерона на репликативный потенциал CD2/CD3/CD28-стимулированных наивных (CD45RA⁺) Т-клеток (**рисунок 3**).

При инкубации CD45RO⁺ клеток с тестостероном были получены следующие данные: в концентрациях 10^{-6} и 10^{-5} М экспрессия гена hTERT снижалась в 3,5 и 10,3

раза соответственно, тогда как добавление минимальной дозы гормона (10^{-7} М) увеличивало экспрессию hTERT в 13 раз, относительно пробы с добавлением только активатора. Вышесказанное позволяет предположить, что наряду с угнетением раннего и IL-2-независимого этапов активации, тестостерон подавляет репликативный потенциал примированных Т-клеток. Более низкие концентрации снижают негативные эффекты гормона на CD4RO⁺ Т-клетки (**рисунок 3**).

В серии экспериментов был продемонстрирован 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). Авторы установили, что эффекты тестостерона могут быть предотвращены блокадой рецептора эстрогена (ER) или добавлением ингибитора ароматазы (Calado R.T. et al., 2009).

Как упоминалось ранее, тестостерон обладает супрессивными эффектами на иммунную систему (Roden A.C. et al., 2004; Zhao S. et al., 2014). В литературе имеются сведения, что тестостерон регулирует дифференцировку Th1-хелперов через механизм подавления IL-12-индуцированного фосфорилирования STAT4 (Kissick H.T. et al., 2014). Ранее нами было описано влияние тестостерона на продукцию IL-2 Т-лимфоцитами разной степени дифференцировки. В нашем исследовании мы не выявили супрессивного эффекта тестостерона на продукцию Т-клетками разной степени дифференцировки основного провоспалительного цитокина IFN- γ ($p > 0,05$).

Angele M.K. и соавт. (2001) выявлено, что андрогенная сигнализация подавляет экспрессию IFN- γ и IL-2 спленоцитами у мышей-самцов, в то время как самки мышей сохраняют высокую экспрессию этих медиаторов при геморрагическом шоке (Angele M.K. et al., 2001). Freeman V.M. и соавт. (2014) обнаружена взаимосвязь между низкими концентрациями тестостерона и продукцией провоспалительных цитокинов (Freeman V.M. et al., 2014).

Наше исследование позволило выявить снижение продукции IL-4 Т-лимфоцитами с фенотипом CD45RA⁺ и CD45RO⁺ в присутствии тестостерона (10^{-5} М) (**таблица 2**). Напротив, тестостерон оказывал стимулирующее действие на продукцию IL-10 CD45RO⁺ Т-клетками ($p < 0,05$) (**таблица 2, рисунок 4**). CD45RA⁺ Т-клетки были нечувствительны к его действию.

Полученные нами результаты частично находят отражение в мировой литературе. Fijak M. et al. (2011) доказали, что добавление тестостерона *in vitro* к наивным клеткам приводило к их дифференцировке в регуляторные Т-клетки с приобретением супрессивной активности, что сопровождалось уменьшением MCP-1-стимулированного хемотаксиса Т-лимфоцитов (Fijak M. et al., 2011). Другие исследования показывают, что тестостерон подавляет продукцию Th2 цитокинов (в частности, IL-4) (Burger D. et al., 2002).

Таким образом, в условиях CD2/CD3/CD28-активации *in vitro*, тестостерон в большей степени обладал способностью угнетать продукцию наивными Т-клетками основного ростового фактора IL-2. На примированные Т-клетки были выявлены его стимулирующие эффекты в отношении продукции супрессорного медиатора - IL-10. Т-клетки разной степени дифференцировки оказались нечувствительны к тестостерону в отношении продукции основных медиаторов Th1/Th2 ответа – IL-4 и IFN- γ (**таблица 2, рисунок 4**).

Эффекты женского полового гормона (β -эстрадиола) на функциональную активность Т-лимфоцитов разной степени дифференцировки

Эстрогены участвуют в регуляции процессов созревания, дифференциации, активации и пролиферации лимфоидных клеток (McMurray R.W. et al., 2001; Priyanka N.P. et al., 2013). Нами был выявлен четкий проапоптогенный эффект высоких

концентраций β -эстрадиола (10^{-7} - 10^{-5} М) на активированные Т-клетки разной степени дифференцировки: в культурах $CD45RA^+$ и $CD45RO^+$ Т-клеток количество $CD95^+$ позитивных клеток увеличивалось (в среднем, в 4,5 и 3,5 раз соответственно) и было ассоциировано с ростом числа мертвых клеток (**рисунок 2с**). Наиболее чувствительными к проапоптогенному действию гормона оказались $CD45RA^+$ Т-клетки. Существенное увеличение общего числа $CD45RA^+$ Т-клеток, регистрируемое на фоне их значительной гибели при инкубации с β -эстрадиолом (в диапазоне концентраций 10^{-7} - 10^{-5}), было связано с усилением пролиферативной активности, ассоциированной с мембранной экспрессией CD71-молекулы. Более низкие концентрации гормона (10^{-9} - 10^{-8} М) не обладали проапоптогенным эффектом на Т-клетки. Выявленные нами изменения могут быть связаны с дозовой зависимостью влияния эстрогенов на иммунную систему в целом (Grossman C.J. et al., 1991; Cunningham M, Gilkeson G., 2011). Неоднозначность действия эстрогенов в разных тканях-мишенях (в одних случаях - стимуляция клеточный рост, в других - апоптоз) связана, безусловно, с передачей сигнала внутрь клетки (геномные и негеномные эффекты эстрогенов) (Razandi M. et al., 2002; (Cunningham M, Gilkeson G., 2011).

В то же время высокое содержание мертвых клеток в культурах активированных $CD45RO^+$ -лимфоцитов, подвергнутых воздействию β -эстрадиола (10^{-6} и 10^{-5} М), в сочетании с отсутствием пролиферативных процессов (общее число клеток (в мл) и содержание $CD71$ -позитивных $CD45RO^+$ Т-лимфоцитов в образцах не изменялось) может быть обусловлено как меньшей экспрессией изоформы рецептора- $ER\alpha$ на Т-клетках памяти (Yakimchuk K. et al., 2013), так и способностью молекулы $CD45RO$, с высокой плотностью представленной на примированных Т-клетках, снижать сигнализацию TCR и, как правило – ограничивать пролиферацию Т-лимфоцитов (Xu Z., Weiss A., 2002).

Учитывая вышесказанное, особый интерес для нас представляло исследование влияния β -эстрадиола на процессы функциональной активности Т-лимфоцитов, связанные с этапом ранней активации (система $IL-2/IL-2R\alpha$). В нашем исследовании β -эстрадиол в концентрациях 10^{-7} - 10^{-5} М оказывал выраженное супрессивное действие на уровень продукции $IL-2$ в обеих популяциях Т-лимфоцитов (коэффициент линейной регрессии $r = - 0,80$, $p < 0,004$ для $CD45RA^+$; $r = - 0,90$, $p < 0,0001$ для $CD45RO^+$). (**таблица 2**). Интересным оказался тот факт, что β -эстрадиол равномерно (независимо от концентрации) подавлял экспрессию молекулы активации $CD25$ как в популяции $CD45RA^+$ Т-клеток, так и в культурах Т-клеток памяти (**рисунок 2а**). Более выраженным эффект был в случае $CD45RO^+$ Т-клеток. Продемонстрировано, что эстроген-ассоциированное угнетение продукции $IL-2$ и экспрессии $IL-2$ рецептора ($IL-2R$) в $CD4^+$ Т-клетках линии Jurkat было связано с ингибированием факторов транскрипции: $NF-\kappa B$ и $AP-1$ на фоне увеличения уровня белка I κ B α , ингибитора ядерной транслокации фактора $NF-\kappa B$ (McMurry R.W. et al., 2001). В более низких концентрациях (10^{-9} - 10^{-8} М) β -эстрадиол не оказывал влияния на секрецию $IL-2$ наивными и примированными Т-лимфоцитами. Согласно данным литературы, низкие дозы эстрогенов обеспечивают так называемое иммуномодулирующее действие, т.е. способствуют восстановлению дисиммунных нарушений, развивающихся на фоне дефицита эстрогенов (Grossman C.J. et al, 1994).

Роль половых стероидных гормонов в регуляции экспрессии теломеразы и ее функциональной активности была идентифицирована во многих типах гормончувствительных тканей (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 $Er\beta$) (Misiti S. et al., 2000; Xu D. et al., 2014).

Таблица 2 - Содержание про (IL-2; IFN γ) и антивоспалительных цитокинов (IL-4; IL-10) (пг/мл) в супернатантах CD45RA $^+$ и CD45RO $^+$ T-лимфоцитов, культивируемых с CD2/CD3/CD28-активатором (Ac/Exp) и разными концентрациями гормонов дексаметазона (Dex), тестостерона (Test) и β -эстрадиола (Est) (M \pm σ)

Варианты культивирования	Количество IL-2 (пг/мл) в супернатантах клеточных культур		Количество IFN γ (пг/мл) в супернатантах клеточных культур		Количество IL-4 (пг/мл) в супернатантах клеточных культур		Количество IL-10 (пг/мл) в супернатантах клеточных культур	
	CD45RA $^+$	CD45RO $^+$	CD45RA $^+$	CD45RO $^+$	CD45RA $^+$	CD45RO $^+$	CD45RA $^+$	CD45RO $^+$
Интактная проба + Ac/Exp	12,72 \pm 3,12 684,9 \pm 121,43 p $<$ 0,05	12,72 \pm 3,12 684,9 \pm 121,43 p $<$ 0,05	9,13 \pm 3,41 486,46 \pm 89,34 p $<$ 0,05	16,58 \pm 3,21 492,44 \pm 78,33 p $<$ 0,05	0,9 \pm 0,01 6,85 \pm 2,23 p $<$ 0,05	4,36 \pm 0,90 69,43 \pm 15,99 p $<$ 0,05	6,98 \pm 1,01 76,07 \pm 9,01 p $<$ 0,05	24,77 \pm 8,90 102,89 \pm 17,23 p $<$ 0,05
Ac/Exp Dex (10 $^{-5}$ M)	257,8 \pm 190,4 p $<$ 0,05	257,8 \pm 190,4 p $<$ 0,05	187,99 \pm 38,32 p $<$ 0,05	348,56 \pm 90,92 p $<$ 0,05	4,39 \pm 1,31 p $<$ 0,05	12,61 \pm 3,22 p $<$ 0,05	32,24 \pm 5,56 p $<$ 0,05	68,48 \pm 6,09 p $<$ 0,05
Ac/Exp Dex (10 $^{-6}$ M)	533,1 \pm 173,9	533,1 \pm 173,9	240,62 \pm 9,91 p $<$ 0,05	476,42 \pm 103,21 p $<$ 0,05	6,25 \pm 2,92	27,39 \pm 6,45 p $<$ 0,05	74,56 \pm 11,01 p $<$ 0,05	84,36 \pm 10,90 p $<$ 0,05
Ac/Exp Dex (10 $^{-7}$ M)	604,7 \pm 187,1	604,7 \pm 187,1	381,21 \pm 85,32 p $<$ 0,05	410,22 \pm 62,34 p $<$ 0,05	8,08 \pm 8,41	38,97 \pm 10,31 p $<$ 0,05	86,15 \pm 9,91 p $<$ 0,05	112,89 \pm 20,32 p $<$ 0,05
Ac/Exp Test (10 $^{-5}$ M)	464,3 \pm 106,1 p $<$ 0,05	464,3 \pm 106,1 p $<$ 0,05	422,26 \pm 76,43	466,48 \pm 81,34	4,57 \pm 1,71 p $<$ 0,05	26,14 \pm 8,48 p $<$ 0,05	68,60 \pm 6,97	138,34 \pm 18,33 p $<$ 0,05
Ac/Exp Test (10 $^{-6}$ M)	472,0 \pm 98,5 p $<$ 0,05	472,0 \pm 98,5 p $<$ 0,05	443,55 \pm 89,37	567,17 \pm 82,21	5,39 \pm 2,51	56,50 \pm 9,11 p $<$ 0,05	66,26 \pm 2,51	164,34 \pm 28,39 p $<$ 0,05
Ac/Exp Test (10 $^{-7}$ M)	456,0 \pm 112,8 p $<$ 0,05	456,0 \pm 112,8 p $<$ 0,05	421,86 \pm 90,45	552,34 \pm 103,21	5,34 \pm 0,88	68,55 \pm 15,61 p $<$ 0,05	71,67 \pm 9,26	188,45 \pm 21,38 p $<$ 0,05
Ac/Exp Est (10 $^{-5}$ M)	141,13 \pm 12,61 p $<$ 0,05	141,13 \pm 12,61 p $<$ 0,05	132,67 \pm 42,67 p $<$ 0,05	229,81 \pm 67,32 p $<$ 0,05	3,12 \pm 0,01 p $<$ 0,05	22,45 \pm 8,15 p $<$ 0,05	9,72 \pm 2,38 p $<$ 0,05	32,59 \pm 5,43 p $<$ 0,05
Ac/Exp Est (10 $^{-6}$ M)	338,12 \pm 89,01 p $<$ 0,005	338,12 \pm 89,01 p $<$ 0,005	658,00 \pm 87,21 p $<$ 0,001	352,56 \pm 45,64 p $<$ 0,05	6,92 \pm 1,01 p $<$ 0,001	59,12 \pm 12,71 p $<$ 0,05	42,99 \pm 7,21 p $<$ 0,001	72,79 \pm 11,54 p $<$ 0,05
Ac/Exp Est (10 $^{-7}$ M)	480,67 \pm 56,83 p $<$ 0,005	480,67 \pm 56,83 p $<$ 0,001	727,52 \pm 104,45 p $<$ 0,005	431,32 \pm 78,32 p $<$ 0,05	7,85 \pm 1,83 p $<$ 0,001	67,45 \pm 9,03 p $<$ 0,05	51,88 \pm 10,28 p $<$ 0,005	91,97 \pm 6,51 p $<$ 0,05
Ac/Exp Est (10 $^{-8}$ M)	590,93 \pm 89,22 p $<$ 0,05	590,93 \pm 89,22 p $<$ 0,05	629,00 \pm 90,66 p $<$ 0,005	503,22 \pm 84,12 p $<$ 0,05	8,16 \pm 2,67 p $<$ 0,05	58,16 \pm 9,77 p $<$ 0,05	62,32 \pm 12,23 p $<$ 0,005	98,97 \pm 12,53 p $<$ 0,05
Ac/Exp Est (10 $^{-9}$ M)	634,39 \pm 57,39 p $<$ 0,05	634,39 \pm 57,39 p $<$ 0,05	731,23 \pm 101,620 p $<$ 0,005	489,43 \pm 98,22 p $<$ 0,05	6,43 \pm 1,96 p $<$ 0,05	63,12 \pm 5,25 p $<$ 0,05	72,29 \pm 9,21 p $<$ 0,001	99,77 \pm 10,67 p $<$ 0,05

Примечания: p $<$ - достоверность различий по сравнению с интактной пробой

p1 - достоверность различий по сравнению с пробой с добавлением активатора Ac/Exp

p2 - достоверность различий по сравнению с пробой с добавлением Ac/Exp + Dex (10 $^{-5}$ M) или Ac/Exp + Test (10 $^{-5}$ M)

p3 - достоверность различий по сравнению с пробой с добавлением Ac/Exp + Dex (10 $^{-6}$ M) или Ac/Exp + Test (10 $^{-6}$ M)

p4 - достоверность различий по сравнению с пробой с добавлением Ac/Exp + Est (10 $^{-7}$ M)

p5 - достоверность различий по сравнению с пробой с добавлением Ac/Exp + Est (10 $^{-8}$ M)

Согласно полученным данным, β -эстрадиол оказывал разнонаправленное действие на экспрессию мРНК гена hTERT активированными CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-клетками (**рисунок 3**). На фоне активации CD45RA⁺ Т-клеток, инкубация с β -эстрадиолом приводила к дозозависимому снижению экспрессии гена hTERT (коэффициент линейной регрессии $r = -0,82$, $p < 0,002$). Эти изменения носили одинаковую направленность с продукцией наивными Т-клетками ростового фактора - IL-2, что позволяет предположить зависимость экспрессии гена каталитической субъединицы теломеразы hTERT от продукции IL-2 в наивных Т-клетках, а также обратную зависимость с IL-2 – независимым этапом активации CD45RA⁺ Т-клеток (повышение CD71⁺ клеток). Можно сделать предположение, что наряду с проапоптогенным эффектом, высокие концентрации β -эстрадиола, угнетая экспрессию hTERT в сочетании с подавлением этапа ранней активации клеток и одновременной стимуляцией IL-2 независимой пролиферации клеток, способствуют снижению репликативного потенциала наивных (CD45RA⁺) Т-лимфоцитов. Вышесказанное позволяет предположить эстрадиол-индуцированное сокращение репликативного потенциала наивных клеток на фоне активирующих TCR-сигналов. Более низкие концентрации гормона (10^{-9} - 10^{-8} М) не оказывали значимого влияния на уровень относительной экспрессии мРНК гена hTERT; он был сопоставим с таковым в активированных пробах без добавления гормона.

Напротив, культивирование активированных CD45RO⁺ Т-клеток с женским половым гормоном - β -эстрадиолом, сопровождалось противоположной динамикой изменения экспрессии hTERT (коэффициент линейной регрессии $r = 0,75$, $p < 0,05$) и продукции IL-2, что может свидетельствовать об отсутствии зависимости между теломеразной активностью примированных CD45RO⁺ Т-клеток от IL-2 на фоне эстрадиол-индуцированной активации. Возможно, супрафизиологические концентрации β -эстрадиола (10^{-7} - 10^{-5} М), подавляя ранний этап активации (угнетение системы IL-2/IL-2R α), наряду с сохранением теломеразной активности на фоне IL-2 независимой пролиферации, способствуют сохранению репликативного потенциала примированных (CD45RO⁺) Т-клеток. В то время как низкие концентрации эстрадиола (10^{-8} - 10^{-9} М) - на фоне восстановления IL-2-зависимого этапа активации – оказывают супрессорный эффект на экспрессию hTERT, что может быть связано со стойкой активацией примированных (CD45RO⁺) Т-клеток и сокращением их репликативного потенциала.

Многочисленные дискуссии об иммуномодулирующих свойствах эстрадиола фокусируются на парадоксе между его про- и противовоспалительными эффектами (Nadkarni S., McArthur S., 2013; Polese B. et al., 2014). Как уже упоминалось, в нашем исследовании было выявлено дозозависимое супрессивное действие β -эстрадиола на уровень продукции IL-2 в обеих популяциях активированных Т-лимфоцитов. Эффекты β -эстрадиола на продукцию основного провоспалительного медиатора IFN- γ активированными CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-клетками, имели разнонаправленный характер. Максимальная концентрация (10^{-5} М) β -эстрадиола оказывала супрессивный эффект на культуру наивных Т-клеток, тогда как более низкие (10^{-9} - 10^{-6} М), напротив – стимулирующий, повышая продукцию IFN- γ , в среднем, в 1,5 раза (по сравнению с пробам только с добавлением активатора) (таблица). Напротив, добавление β -эстрадиола (10^{-5} и 10^{-6} М) в культуру активированных CD45RO⁺ Т-клеток, угнетало продукцию IFN- γ ($p < 0,05$). Более низкие концентрации β -эстрадиола отменяли его супрессивный эффект (**таблица 2, рисунок 4**).

Культивирование лимфоцитов с фенотипом CD45RA⁺ и CD45RO⁺ в присутствии β -эстрадиола приводило к снижению продукции IL-4. Супрессивный эффект наблюдался только при использовании их максимальных концентраций (10^{-5} М).

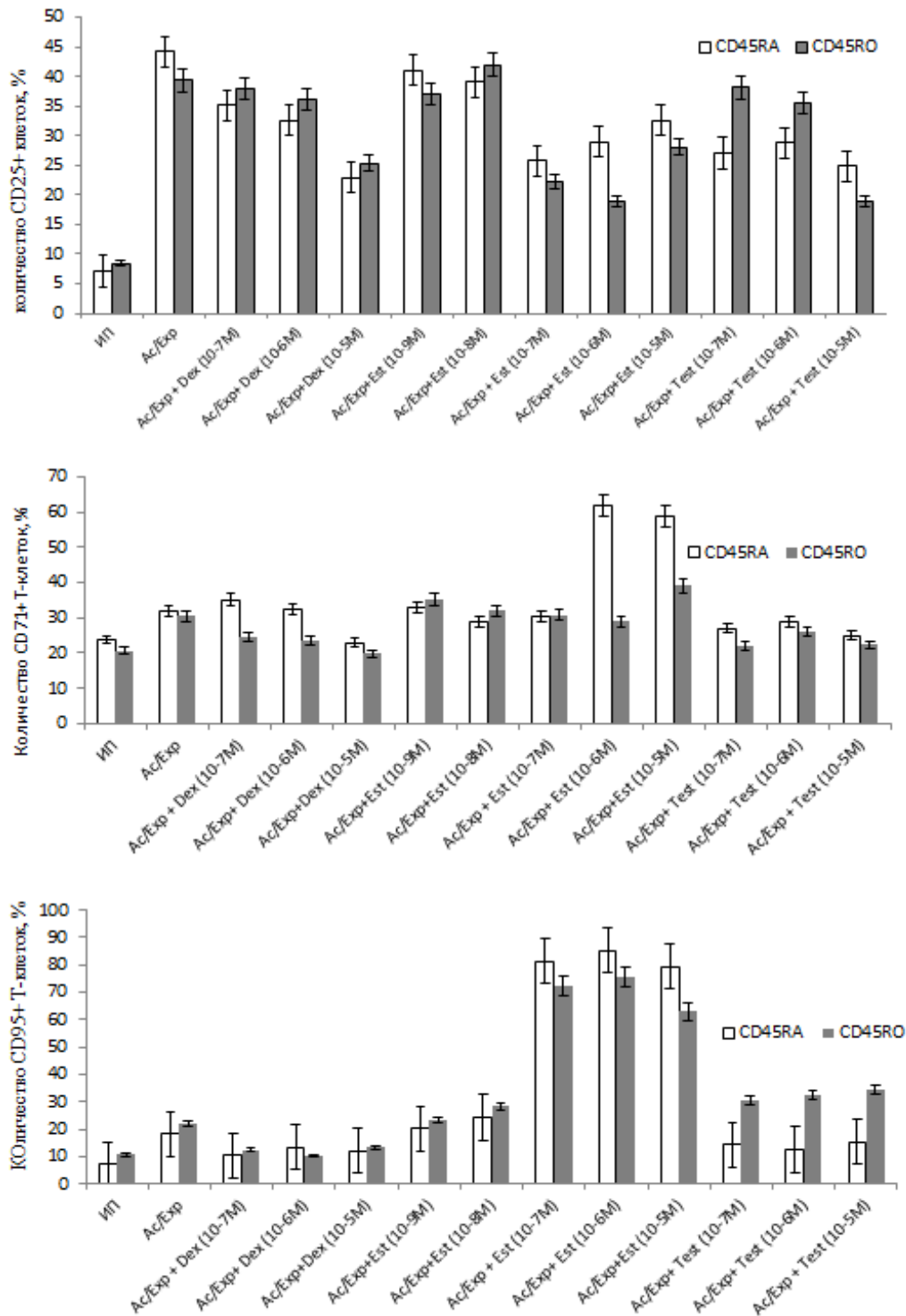


Рисунок 2 - Содержание CD25 (а), CD71 (б), CD95 (с) – позитивных клеток (%) в культурах CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-лимфоцитов, культивируемых с Т-клеточным активатором (Ac/Exp) и разными концентрациями гормонов: дексаметазона (Dex), тестостерона (Test) и β-эстрадиола (Est) (M±σ)

Добавление β-эстрадиола в культуру наивных и примированных Т-клеток приводило к достоверному снижению продукции противовоспалительного цитокина – IL-10. Супрессивные эффекты β-эстрадиола на наивные Т-клетки были дозозависимыми (p<0,05) (таблица 2, рисунок 4).

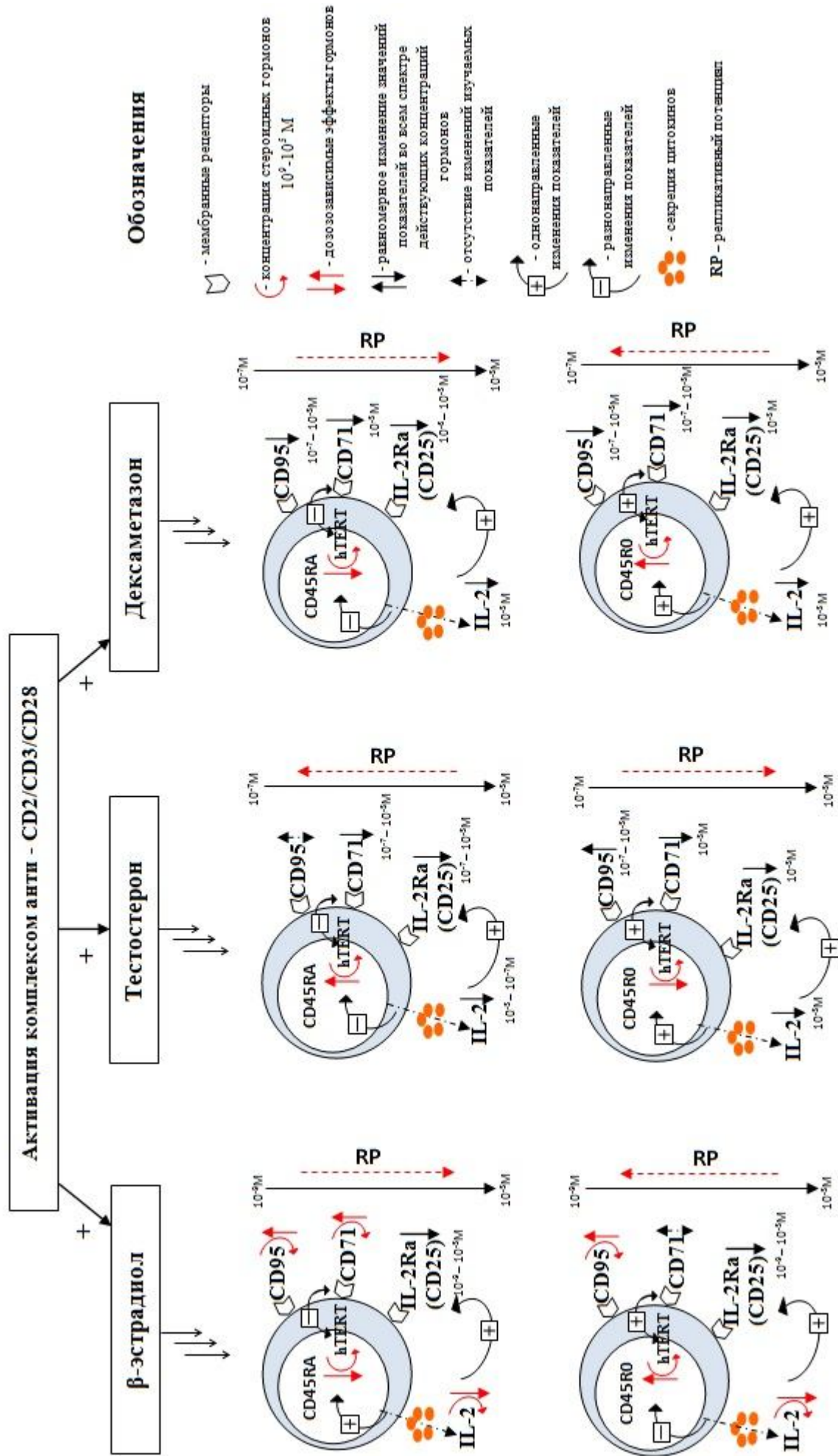


Рисунок 3 – Влияние стероидных гормонов на функциональную активность Т-клеток разной степени дифференцировки (по результатам собственных исследований)

Полученные нами результаты в отношении эффектов β -эстрадиола на продукцию про- и противовоспалительных цитокиновых молекул Т-клетками разной степени дифференцировки противоречат одним источникам и соответствуют другим. продемонстрировано, что эстрадиол усиливает первичный ответ антиген-специфических CD4 Т-клеток и развитие Th1 – популяций *in vivo* (Maret A. et al., 2003). Другие авторы подтверждают стимулирующее действие эстрадиола на секрецию IL-4 CD4⁺ Т-клетками, а также экспрессию GATA-3 у мышей (Faas M. et al., 2000; Lambert K.C. et al., 2005). Существуют работы, показывающие, что эстрогены ингибируют секрецию Th1-провоспалительных цитокинов, таких как IL-12, TNF- α и IFN- γ и стимулируют выработку Th2- цитокинов - IL-10, IL-4, и TGF- β , обеспечивая, тем самым дисбаланс Th1/Th2 (Salem M.L., 2004). Gilmore W. и соавт. (1997) было показано, что эстрадиол одновременно может увеличивать в организме человека продукцию Т-клетками IL-10 и IFN- γ (Gilmore W. et al., 1997).

Таким образом, в нашем экспериментальном блоке *in vitro* было выявлено разнонаправленное действие эстрадиола на продукцию ключевых про – и противовоспалительных молекул Т-клетками (**рисунок 4**). На фоне активирующих TCR-сигналов β -эстрадиол, в большей степени, супрессировал продукцию примированными (CD45RO⁺) Т-клетками Th1-молекул (IL-2, IFN- γ), в то время как его действие на наивные (CD45RA⁺) Т-клетки, сопряжено с угнетением продукции IL-2 и IL-10, на фоне активации секреции основного провоспалительного медиатора – IFN- γ (**рисунок 4**).

	β -эстрадиол + CD2/CD3/CD28-комплекс $10^{-2} - 10^{-5}M$	Тестостерон + CD2/CD3/CD28-комплекс $10^{-2} - 10^{-7}M$	Дексаметазон + CD2/CD3/CD28-комплекс $10^{-2} - 10^{-7}M$
CD45RA	IL-2 ↓ IFN γ ↑ IL-10 ↓ IL-4 ↓	IL-2 ↓ IFN γ ↓ IL-10 ↓ IL-4 ↓	IL-2 ↓ IFN γ ↓ IL-10 ↓ IL-4 ↓
CD45RO	IL-2 ↓ IFN γ ↓ IL-10 ↓ IL-4 ↓	IL-2 ↓ IFN γ ↓ IL-10 ↑ IL-4 ↓	IL-2 ↓ IFN γ ↓ IL-10 ↓ IL-4 ↓

Рисунок 4 - Влияние стероидных гормонов на содержание про- и противовоспалительных цитокинов в супернатантах клеточных культур Т-клеток разной степени дифференцировки (по результатам собственных исследований). Обозначения как в рисунке 3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог вышесказанному, можно выделить ряд закономерностей стероид-опосредованной регуляции функциональной активности Т-клеток памяти, имеющих разную степень дифференцировки. Экспериментальное исследование *in vitro* позволило установить, что эффекты стероидных гормонов: глюкокортикоида - дексаметазона и половых: тестостерона и β -эстрадиола на функциональную активность Т-клеток, подвергшихся антигеннезависимой CD2/CD3/CD28-стимуляции, носят дозозависимый характер; их разнонаправленное действие определяется стадией дифференцировки Т-лимфоцитов (**рисунок 3**). Полученные нами результаты свидетельствуют, что разнонаправленные эффекты стероидных гормонов (дексаметазона, тестостерона, β -эстрадиола) на экспрессию мРНК гена каталитической субъединицы фермента теломеразы (hTERT), на фоне

антигеннезависимой активации, в целом, носят дозозависимый характер и в совокупности с исследованием параметров функциональной активности, позволяют дать оценку репликативного потенциала Т-клеток разной степени дифференцировки. (рисунок 4). В экспериментальных условиях *in vitro* продемонстрировано, что разнонаправленное, разной степени выраженности действие стероидных гормонов (дексаметазона, тестостерона, β -эстрадиола) на баланс продукции Th1/Th2 цитокинов (в условиях CD2/CD3/CD28-активации) определяется стадией дифференцировки Т-лимфоцитов. Резюмируя вышесказанное, необходимо отметить, что выявление физиологических механизмов стероид-опосредованной регуляции функциональной активности Т-клеток памяти разной степени дифференцировки, может быть основополагающим компонентом для дальнейшего, более детального изучения клеточных и молекулярных механизмов, лежащих в основе регуляции первичного и вторичного иммунного ответов на разных этапах его реализации.

ВЫВОДЫ

1. Дозозависимые эффекты стероидных гормонов: глюкокортикоидного - дексаметазона и половых: тестостерона и β -эстрадиола на функциональную активность Т-клеток имеют разнонаправленный характер и определяются стадией дифференцировки Т-лимфоцитов.
2. Эффекты дексаметазона (на фоне CD2/CD3/CD28-стимуляции) на функциональную активность наивных ($CD45RA^+$) Т-лимфоцитов и примированных Т-клеток памяти ($CD45RO^+$) носят угнетающий характер. В популяции наивных ($CD45RA^+$) Т-клеток дексаметазон оказывает более выраженный подавляющий эффект на ранние (IL-2-зависимые / ассоциированные с экспрессией молекулы CD25 и продукцией IL-2) этапы активации; в культурах примированных Т-клеток памяти ($CD45RO^+$) – на более поздние (IL-2-независимые / ассоциированные с экспрессией молекулы пролиферации CD71).
3. Супрессивное действие β -эстрадиола (на фоне CD2/CD3/CD28-стимуляции) на этап ранней активации Т-клеток разной степени дифференцировки, ассоциированный с системой IL-2/IL-2R α , носит однонаправленный характер и зависит от концентрации гормона. Проапоптогенный эффект супрафизиологических доз β -эстрадиола (10^{-7} - 10^{-5} М) у наивных ($CD45RA^+$) Т-клеток, но не у примированных, ассоциирован со стимуляцией IL-2-независимой стадии активации.
4. Эффекты тестостерона на функциональную активность наивных ($CD45RA^+$) Т-лимфоцитов и примированных ($CD45RO^+$) Т-клеток памяти, в целом, носят угнетающий характер. Более чувствительными к его проапоптогенному действию оказались $CD45RO^+$ Т-клетки. Действие тестостерона на продукцию IL-2 и экспрессию молекулы активации CD25 Т-клетками разной степени дифференцировки носит однонаправленный характер и не зависит от концентрации гормона. Супрессивные эффекты тестостерона в отношении системы IL-2-IL2R, в большей степени, затрагивают наивные ($CD45RA^+$) Т-клетки.
5. Разнонаправленные эффекты стероидных гормонов (дексаметазона, тестостерона, β -эстрадиола) на экспрессию мРНК каталитической субъединицы фермента теломеразы hTERT на фоне активации комплексом анти-CD2/CD3/CD28, определяются степенью дифференцировки Т-клеток.
6. Выявлено разнонаправленное влияние стероидных гормонов (дексаметазона, тестостерона, β -эстрадиола) на баланс продукции Th1/Th2 цитокинов Т-клетками разной степени дифференцировки.
7. Дексаметазон во всем спектре действующих концентраций (10^{-7} - 10^{-5} М) снижает продукцию IFN- γ CD2/CD3/CD28-активированными наивными ($CD45RA^+$) Т-клетками.

Действие β -эстрадиола на секрецию IL-2 и IL-10 наивными ($CD45RA^+$) Т-клетками дозозависимое и носит угнетающий характер. β -эстрадиол обладает стимулирующим влиянием на продукцию IFN- γ наивными ($CD45RA^+$) Т-клетками. На фоне CD2/CD3/CD28-активации, тестостерон угнетает продукцию IL-2 и не влияет на секрецию противовоспалительных факторов (IL-4, IL-10) наивными ($CD45RA^+$) Т-клетками.

8. На фоне CD2/CD3/CD28-активации примированных ($CD45RO^+$) Т-клеток памяти, дексаметазон, преимущественно, супрессирует секрецию Th2-цитокинов (IL-4, IL-10), тогда как β -эстрадиол, в большей степени, угнетает продукцию молекул Th1-ответа (IL-2, IFN- γ). Выявлен стимулирующий эффект тестостерона на продукцию активированными ($CD45RO^+$) Т-клетками основного противовоспалительного фактора – IL-10.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Селедцов В.И., Литвинова Л.С., Гончаров А.Г., Шуплецова В.В., Селедцов Д.В., Гуцол А.А., Селедцова И.А. Клеточные механизмы генерации иммунологической памяти // **Цитокины и воспаление**. - 2010. - Том 9 (№4). - С. 9-15 (**IF-0,234**).
2. Селедцов В.И., Селедцова И.А. Литвинова Л.С., Кириенкова Е.В., Шуплецова В.В. Гуморальные и клеточные факторы иммунитета при инфаркте миокарда // **Медицинская иммунология**. - 2010. – Том 12 (№6). – С. 477-484 (**IF-0,348**).
3. Литвинова Л.С., Селедцов В.И., Шуплецова В.В., Гуцол А.А, Анищенко Е.С. Стероидная регуляция иммунной памяти // **Вестник Российского государственного университета им. И. Канта**. - 2011. - №1. - С. 77-87 (**IF-0,019**).
4. Литвинова Л.С., Пельменев В.К., Селедцова И.А., Шуплецова В.В., Панин В.А., Селедцов В.И. Влияние субмаксимальной физической нагрузки на клеточные параметры крови спортсменов // **Медицинская иммунология**. – 2012. – Том 14, №3. – С.213-218 (**IF - 0,332**).
5. Литвинова Л.С., Пельменев В.К., Гончаров А.Г., Селедцова И.А., Шуплецова В.В., Панин В.А., Селедцов В.И. Оптимизация тренировочного процесса спортсменов под контролем индивидуальных иммуно-регенеративных и биохимических параметров крови // **Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта** - 2013. - №5. - 128-137 (**IF-0,019**).
6. Литвинова Л.С., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Шуплецова В.В., Кофанова К.А., Хазиахматова О.Г., Кайгородова Е.В., Гончаров А.Г. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов // **Медицинская иммунология**. – 2014. - Т. 6, № 1. - С. 7-26 (**IF - 0,348**).
7. Шуплецова В.В., Хазиахматова О. Г., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Юрова К.А., Литвинова Л.С. Эффекты мужского полового гормона (тестостерона) на функциональную активность Т-лимфоцитов разной степени дифференцировки // **Гены и Клетки**. – 2014. - №4. С. 21-26 (**IF - 0,236**).
8. Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Шуплецова В.В., Литвинова Л.С. Дозозависимые эффекты дексаметазона на функциональную активность Т-лимфоцитов разной степени дифференцировки // **Молекулярная биология**. - 2015. – Т.49, №1. – С. 149-157 (**IF - 0,381**).
9. Шуплецова В.В., Гуцол А.А., Хазиахматова О.Г., Сохоневич Н.А., Юрова К.А., Литвинова Л.С. Влияние половых стероидных гормонов (тестостерона и β -эстрадиола) на продукцию про- и противовоспалительных цитокинов активированными Т-лимфоцитами разной степени дифференцировки // **Цитокины и воспаление**. – 2015. – Т.14(№1). – С. (**IF-0,234**).
10. Сохоневич Н.А., Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Шуплецова В.В., Литвинова Л.С. Эффекты IL-10 на функциональную активность т-клеток разной степени дифференцировки // **Материалы Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы образования и науки»**, Тамбов, 30 сентября 2014 г. - С. 110-112.
11. Литвинова Л.С., Селедцов В.И., Гуцол А.А., Кириенкова Е.В., Саяркина Е.В., Шуплецова В.В. Изменение содержания клеток иммунной памяти в периферической крови больных аутоиммунными заболеваниями // **Материалы докладов XVI-ой Межгородской научной**

- конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии». - Санкт-Петербург, 2010. С. 105-107.
12. Литвинова Л.С., Селедцов В.И., Гуцол А.А., Кириенкова Е.В., Саяркина Е.В., Шуплецова В.В. Исследование влияния стероидных гормонов на апоптоз Т-клеток иммунной памяти в норме и при иммунопатологии // Материалы докладов XVI-ой Межгородской научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии». - Санкт-Петербург, 2010. С. 107-108.
 13. Шуплецова В.В., Литвинова Л.С., Гончаров А.Г. Влияние экологических факторов на состояние системы иммунитета детей Калининградской области // Сборник трудов Первой международной научно-практической конференции "Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине" // под ред. А.П. Кудинова, Б.В. Крылова. – СПб.: Изд-во Политехн. Ун-та, 2010. -370 с.
 14. Анищенко Е.С., Литвинова Л.С., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Шуплецова В.В., Селедцов В.И. Стероидная регуляция экспрессии теломеразы в Т-клетках памяти // Сборник трудов II-ой международной научно-практической конференции "Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине". - Санкт-Петербург, 26-28 октября 2011 г. – С.108-110
 15. Литвинова Л.С., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Шуплецова В.В., Гончаров А.Г., Селедцов В.И. Влияние интерлейкина-2 на апоптоз и пролиферацию Т-клеток иммунной памяти // Материалы докладов XVII-ой Межгородской научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии». - Санкт-Петербург, 20-21 апреля 2011 года. – С. 44-45.
 16. Шуплецова В.В., Литвинова Л.С., Пельменев В.К., Селедцова И. А., Селедцов В.И., Панин В. А. Муравьева Ю.А. Влияние физической нагрузки на иммуно-регенераторные параметры крови спортсменов // Материалы второго международного научного конгресса «Проблемы физического образования: содержание, направленность, методика, организация». Издательство Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта 2011. - С. 285-287.
 17. Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Шуплецова В.В., Литвинова Л.С. Поиск оптимальных условий для создания системы *in vitro*, предназначенной для исследования влияния биологически активных веществ на функциональную активность и жизнеспособность мононуклеарных лейкоцитов // Материалы II международной конференции "Биотехнология. Взгляд в будущее", г. Казань, 26-27 марта 2013 г. - С.77-81.
 18. Khaziakhmatova O.G., Shupletsova V.V., Yurova K.A., Sokhonevich N.A., Litvinova L.S. The effect of β -estradiol on the proliferation and the level of transcription mRNA of hTERT gene in CD45RO+ T-lymphocytes // 3rd European Conference on Biology and Medical Sciences, Вена, Австрия, 28 октября 2014 г. – С.184-189.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АПК - антиген-презентирующие клетки
 ГК - глюкокортикостероиды
 ИМС - иммуномагнитная сепарация
 МАТ - моноклональные антитела
 мРНК - матричная рибонуклеиновая кислота
 ПЦР – полимеразная цепная реакция
 ER - ядерные рецепторы к эстрадиолу (estradiol reseptor)

ERE - функциональный элемент ответа на эстроген (estrogen responsive element)
 hTERT – каталитическая субъединица фермента теломеразы (humans Telomerase reverse transcriptase)
 MCP-1 - моноцитарный хемоаттрактивный белок-1 (monocyte chemoattractant protein-1)
 TCR – антигенраспознающий рецептор Т-лимфоцитов (T-cell receptor)
 Th 1/2 – Т-хелперы ½ типа
 TNF- α - фактор некроза опухолей α