

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

На правах рукописи

Шуплецова Валерия Владимировна

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

03.03.01 – физиология

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
Л.С. Литвинова

Калининград - 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Основные характеристики иммунологической памяти.....	13
1.1.1. Т-клетки иммунной памяти.....	14
1.1.2. В-клетки памяти и долгоживущие плазматические клетки.....	19
1.2. Стероидная регуляция иммунной системы.....	21
1.2.1. Действие глюкокортикоидов на компоненты иммунной системы.....	22
1.2.2. Гормоны половых желез и функции иммунной системы.....	28
1.2.3. Влияние женских половых гормонов на компоненты иммунной системы ...	30
1.2.4. Действие мужских половых гормонов на компоненты иммунной системы...37	
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	43
2.1. Объект и материал исследования.....	43
2.2. Методы исследования.....	43
2.2.1. Выделение мононуклеарных лейкоцитов из периферической крови.....	44
2.2.2. Выделение «наивных» (CD45RA ⁺) и «примированных» (CD45RO ⁺) Т-лимфоцитов из фракции мононуклеарных лейкоцитов методом иммуномагнитной сепарации.....	44
2.2.3. Культивирование Т-клеток разной степени дифференцировки (CD45RO ⁺ и CD45RA ⁺).....	47
2.2.4. Определение общего числа клеток (в мл) и количества жизнеспособных лимфоцитов в культурах CD45RA и CD45RO ⁺ Т-клеток методом проточной цитометрии.....	49
2.2.5. Определение поверхностных маркеров CD25, CD71, CD95 на Т-клетках разной степени дифференцировки методом проточной цитометрии.....	50
2.2.6. Определение содержания концентрации про- (IL-2, IFN γ) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) в супернатантах клеточных культур CD45RA ⁺ и CD45RO ⁺ Т-клеток.....	50
2.2.7. Выделение тотальной РНК.....	51
2.2.8. Обратная транскрипция образцов тотальной РНК.....	52
2.2.9. Определение уровня относительной экспрессии генов методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени.....	53
2.2.10. Методы статистического анализа данных.....	55
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	59
3.1. Оценка эффектов стероидных гормонов (дексаметазон, β -эстрадиол, тестостерон) на жизнеспособность и общее количество клеток (10^6 /мл) в культурах активированных Т-лимфоцитов, имеющих разную степень дифференцировки.....	59
3.2. Оценка эффектов стероидных гормонов (дексаметазон, β -эстрадиол,	

тестостерон) на мембранную экспрессию молекул ранней активации (CD25), пролиферации (CD71) и апоптоза (CD95) активированными Т-лимфоцитами с разной степенью дифференцировки.....	61
3.2.1. Мембранная экспрессия молекулы ранней активации CD25.....	61
3.2.2. Мембранная экспрессия молекулы пролиферации CD71.....	63
3.2.3. Мембранная экспрессия молекулы апоптоза CD95.....	65
3.3. Оценка влияния стероидных гормонов (дексаметазон, β -эстрадиол, тестостерон) на продукцию про- (IL-2, IFN γ) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов активированными Т-лимфоцитами разной степенью дифференцировки.....	67
3.4. Оценка влияния стероидных гормонов (дексаметазон, β -эстрадиол, тестостерон) на экспрессию мРНК гена каталитической субъединицы теломеразы - <i>hTERT</i> в активированных Т-лимфоцитах с разной степенью дифференцировки.....	74
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	78
ВЫВОДЫ.....	114
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	116

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АИЗ - аутоиммунные заболевания
АПК - антиген-презентирующе клетки
АТФ - аденозинтрифосфат
ГК - глюкокортикостероиды
ГКГ - главный комплекс гистосовместимости
ИК - иммунные комплексы
ИМС - иммуномагнитная сепарация
ИО - иммунный ответ
ИС - иммунная система
ЛГ – лютропин, лютеинизирующий гормон
МАТ - моноклональные антитела
МП – метилпреднизолон
мРНК - матричная рибонуклеиновая кислота
ПГ - прогестерон
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РС - рассеянный склероз
СКВ - системная красная волчанка
ТТГ – тиреотропин, тиреотропный гормон
ХГ - хорионический гонадотропин
цАМФ - циклический аденозинмонофосфат
ЦТЛ - цитолитические Т-лимфоциты
DHEA - дегидроэпиандростерон (Dehydroepiandrosterone)
DHEAS - дегидроэпиандростерона сульфат (Dehydroepiandrosterone sulfate)
ER - ядерные рецепторы к эстрадиолу (estradiol reseptor)
ERE - функциональный элемент ответа на эстроген (estrogen responsive element)
GC - герминативный центр (germinal centers)
GCRm – рецепторы к ГК, экспрессированные на клеточной мембране
GM-CSF - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (Granulocyte-macrophage colony stimulating factor)
GPER (GPR30) - G-протеин, связанный с эстрогеновым рецептором (G-protein-coupled estrogen receptor)
HLA - лейкоцитарный антиген человека (Human leukocyte antigen)
HSP - белки теплового шока (Heat shock proteins)
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)
BCR – антигенраспознающий рецептор В-лимфоцитов (B-cell receptor)
Th 1/2 – Т-хелперы 1/2 типа
VEGF - Фактор роста эндотелия сосудов (Vascular endothelial growth factor)
TNF- α - фактор некроза опухолей α

ВВЕДЕНИЕ

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; Гуцол А.А. и соавт., 2013, 2014; Литвинова Л.С. и соавт., 2011, 2013, 2014). 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; Гуцол А.А. и соавт., 2013, 2014; Литвинова Л.С. и соавт., 2011, 2013, 2014). 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 (Селедцова Г.В. и соавт., 2008; Radbruch A., Thiel A., 2004; Elyaman W. et al., 2008).

Степень проработанности 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; Литвинова Л.С., 2011). 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; Гуцол А.А. и соавт., 2013; Литвинова Л.С. и соавт., 2013).

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; Литвинова Л.С. и соавт., 2013; Priyanka N.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. Снижение уровней эстрогенов и андрогенов приводит к феномену так называемого “*тимусного омоложения*” (Hince M. et al., 2008; Chang C. et al., 2013). Интересно, что возрастное снижение уровня стероидных гормонов способствует поддержанию протективного иммунитета, с одной стороны, и увеличению вероятности развития аутоиммунных расстройств, с другой.

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. В связи с

вышесказанным, *целью нашего 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-2Rα, 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-2Rα 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 $CD45RA^+CD62L^+$ и $CD45RO^+$ 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 единицы фермента теломеразы – hTERT методом полимеразно-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 – отечественных 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Основные характеристики иммунологической памяти

Иммунная система (ИС) обладает уникальным свойством защиты макроорганизма от антигенов инфекционной и неинфекционной природы, а так же от аутоклонов, путем их специфического распознавания и элиминации. Поддерживая многочисленные анатомо-функциональные связи с другими системами организма, ИС обеспечивает стабильность гомеостаза (Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д., 2000; Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И. Г., 2000; Crotty S., Ahmed R., 2004; Ярилин А.А., 2010). Иммунный ответ, как правило, заключается в распознавании возбудителя или иного чужеродного материала и развертывании цепи реакций, направленных на их устранение (Галактионов В.Г., 1998; Хаитов Р.М., 2009; Селедцов В.И. и соавт., 2010; Ройт А. и др., 2010; Ярилин А.А., 2010).

В контексте изучаемой тематики, особого внимания заслуживает изучение молекулярных и клеточных механизмов регуляции иммунной памяти. Согласно современным представлениям, иммунная память – это способность иммунной системы после первичного иммунного ответа быстро и эффективно отвечать на его повторное введение (Воробьёва А. А., Быкова А. С., 2003; Radbruch A, Thiel A., 2004; Elyaman et al., 2008; Селедцов В.И. и др., 2010; Литвинова Л.С. и соавт., 2013). Современные методы оценки экспрессии поверхностных маркеров, оценка структурно-функциональных свойств иммунокомпетентных клеток позволяют выделять «наивные» лимфоциты (naïve T cells) и «примированные» антигеном клетки иммунной памяти (memory T cells). Так, в ходе развития нормального первичного иммунного ответа *in vivo*, в результате дифференцировки активированных антигеном «наивных» предшественников, появляются «примированные» клетки памяти; основной функциональной характеристикой (функциональным отличием) которых является быстрый и усиленный ответ клеток памяти 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., 2006; Хайдуков С.В., 2008; Laurie E. et al., 2008).

1.2.5. Т-клетки иммунной памяти

Фенотипической характеристикой покоящихся наивных Т-лимфоцитов человека является наличие маркеров $CD45RA^+CD45RO^-$. При их дифференцировке в покоящиеся Т-клетки памяти происходит появление на поверхности клеток молекул $CD45RO^+$ вместо изоформы $CD45RA^+$ (Sanders M.E., et al., 1988; Michie C.A., et al., 1992; Хайдкуов С.В., 2008).

Такая фенотипическая характеристика позволяет выделить три субпопуляции $CD4^+$ Т-лимфоцитов человека, а именно:

- покоящиеся наивные $CD45RA^+CD45RO^-$ Т-клетки;
- покоящиеся $CD45RA^-CD45RO^+$ Т-клетки памяти
- и активированные – $CD45RA^+CD45RO^+$ Т-лимфоциты.

Важной особенностью большинства покоящихся $CD4^+$ Т-лимфоцитов-памяти, отличающей их от наивных предшественников является система внутриклеточной сигнализации, а именно резистентность к действию Ca^{2+} -ионофоров, их фенотип $CD4^+CD45RA^-CD45RO^+$. Популяция $CD4^+$ Т-клеток человека, чувствительная к действию Ca^{2+} -ионофоров, составляет основную часть покоящихся наивных $CD4^+CD45RA^+CD45RO^-$ Т-лимфоцитов (Хайдуков С.В., и др., 2003; Ishida Y., et al., 1988; Miller R.A., et al., 1991; Sigova A., et al., 1999).

В настоящее время, молекулярные механизмы дифференцировки наивных клеток в клетки памяти исследованы недостаточно. Предполагается, что программы дифференцировки Т- и В-лимфоцитов имеют схожие механизмы. Сложность проблемы состоит в том, что, в частности, популяция $CD8^+$ клеток человека гетерогенна по экспрессии CCR7, CD62L, CD28, и при различных комбинациях этих маркеров появляется большое количество субпопуляций, значительно различающихся по эффекторному потенциалу, силе пролиферативного ответа и экспрессии цитокинов. В свою очередь, среди $CD4^+$ Т-клеток, наряду с экспрессией вышеобозначенных маркеров, выделяют разные субпопуляции хелперных Т-лимфоцитов, основные из которых - Th1, Th2 Th17 и Treg. Не случайно в одной из последних работ Ярилина А.А. (2010) отмечено, что наши представления о клетках памяти достаточно схематичны и требуют

обобщения механизмов формирования иммунологической памяти с учетом фенотипического и функционального различия популяций как Т-, так и В-клеток (Ярилин А.А., 2010).

В частности, в экспериментальной работе Goldrath A.W. и соавт. (2004), проведенной на мышах, подвергшихся гамма-облучению, при исследовании гомеостатической пролиферации наивных CD8⁺ клеток оценивали экспрессионный профиль их субпопуляций с фенотипически и функционально схожими клетками памяти. Было отмечено однонаправленное увеличение экспрессии таких молекул как - *CD44*, *ЛубС*, *гранзима В* и *внутриклеточный перфорин*. Однако попытка обнаружить особый экспрессионный профиль, который мог бы являться своеобразной «подписью» гомеостатической пролиферации этих клеток, не увенчалась успехом (Goldrath A.W. et al., 2004).

Не решенным остается принципиальный вопрос: из каких клонов клеток идет формирование иммунной памяти. Существующие на сегодняшний день две теории весьма носят весьма дискуссионный характер. Тем не менее, обе гипотезы подкреплены необходимыми исследованиями. *Первая* свидетельствует, что иммунная память формируется в результате развития и дифференцировки клона долгоживущих и высокоспециализированных клеток памяти; тогда как *вторая* - формирование иммунной памяти идет в результате процесса рестимуляции эффекторных лимфоцитов постоянно присутствующим антигеном, попавшим в организм при первичной иммунизации. Сторонники первой теории предполагают, что CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты памяти могут сохраняться в отсутствие антигена (Хаитов Р.М., 2009; Kaech S.M. et al., 2002; Tough D.F., Sprent J., 2003). В эксперименте *in vivo* было продемонстрировано, что Т-лимфоциты регулярно подвергаются гомеостатической пролиферации, не требуя при этом стимуляции МНС-1 или антигеном (Sprent J., Surh C.D., 2003). Ну Н. и соавт. (2001) показано, что после адаптивной передачи, фракция эффекторных CD4⁺ Т-клеток, полученных *in vitro*, становится Т-клетками памяти. Последнее является экспериментальным подтверждением существования линейного пути развития Т-клеток памяти, которые проходят путь дифференцировки от эффекторных лимфоцитов до клеток иммунной памяти. Соответственно из этого предположения, делается важный практический вывод о том, что

эффективность вакцинации следует оценивать по эффекторной стадии иммунного ответа (Hu H. et al., 2001), поскольку свойства лимфоцитов иммунной памяти предетерминированы через генерацию эффекторных клеток.

Долгоживущие Т- и В-лимфоциты, образующиеся при первичном иммунном ответе, являющиеся основными носителями иммунной памяти, рециркулируют в кровеносной и лимфатической системе. После завершения первичного антигенспецифичного ответа основная масса эффекторных клонов Т-лимфоцитов погибает в результате апоптоза, но при этом сохраняется немногочисленная популяция долгоживущих клеток сохраняющих память о контакте с антигеном (Vig M. et al., 2004; Prabhu S.V. et al., 2013). При повторном контакте с антигеном эти клетки быстро пролиферируют, дифференцируются в антителообразующие и антигенреактивные лимфоциты чем обеспечивают высокий уровень иммунного ответа (Achiron A. et al., 2004; Elyaman et., al., 2008; Karussis D. et al., 2012).

Т-клетки памяти, как и наивные Т-клетки – покоящиеся лимфоциты с низким уровнем экспрессии альфа-цепи рецептора к IL-2 (CD25). Однако в сравнении с наивными Т-лимфоцитами, Т-клетки памяти проявляют большую чувствительность к антигенному воздействию, их функциональная активность менее зависима от цитокиновой и мембранной костимуляции (Селедцов В.И. и соавт., 2010).

В активации Т-клеток памяти помимо дендритических клеток могут принимать участие и другие, менее специализированные типы антиген-презентирующих клеток (макрофаги, В-лимфоциты, эндотелиальные клетки). Последние малоэффективны в активации наивных Т-лимфоцитов. Эта особенность Т-клеток памяти определяется экспрессией молекул адгезии - CD11a, способствующих межклеточному взаимодействию; они повышают чувствительность Т-клеток к активирующему воздействию антигенных молекул, ассоциированных с продуктами главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) (Селедцов В.И. и соавт., 2010; Farber D.L., 2010). Активация Т-клеток памяти может осуществляться без участия Т-клеточных рецепторов, только через костимулирующие воздействия, что было продемонстрировано при взаимодействии моноклональных антител с

мембранными молекулами CD28 (Литвинова Л.С. и соавт., 2013; Singh M. et al., 2008).

Разница между наивными Т-лимфоцитами и Т-клетками памяти регистрируется в разной экспрессии поверхностных молекул. Так, Т-клетки памяти несут на своей мембране рецепторы к IL-7 (IL-7Ra; CD127) и к IL-15 (IL-15Ra). Еще одним отличительным признаком Т-клеток памяти является наличие на поверхности молекулы фактора некроза опухоли (CD95L) и его рецептора (CD95), а также - CD56. Последний – относится к семейству иммуноглобулинподобных молекул. Как уже упоминалось, Т-клетки памяти демонстрируют меньшую чувствительность к токсическому действию дексаметазона (Nijhuis et al., 1995) и Ca²⁺-ионофоров (Хайдуков С.В., и др., 2003) по сравнению с наивными Т-лимфоцитами. По-видимому, резистентность Т-клеток памяти к действию этих агентов, указывает на их относительную стресс-устойчивость, увеличивающую их шансы на выживание в условиях адаптационного напряжения макроорганизма. С другой стороны, Т-клетки памяти, в сравнении с наивными Т-лимфоцитами, более чувствительны к токсическому действию перекиси водорода (H₂O₂) (Takahashi A. et al., 2005). Данные указывают на возможную значимость окислительного стресса в регуляции иммунной памяти по механизму обратной связи. Так, у мышей со сниженной индуцибельной синтазой оксида азота (iNOS), определяется более высокое, в сравнении с нормой, содержание CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов памяти (Vig M. et al., 2004).

Основные отличия Т-клеток памяти от наивных Т-лимфоцитов представлены в **таблице 1**.

Таблица 1. Сравнительная характеристика непримированных (наивных) Т-лимфоцитов и Т-клеток памяти (по данным Селедцова В.И. и др., 2010)

Наивные Т-клетки	Т-клетки памяти
Экспрессия CD45RA	Экспрессия CD45RO, CD11a (LFA-1), CD56, CD127, CD95 (Fas), CD95L (FasL), PD-1, PNA-ligand, CCR8
Относительно высокий порог антигенной активации	Низкий порог антигенной активации
Антиген-индуцированная активация высоко зависима от мембранной цитокиновой костимуляции	Антиген-индуцированная активация относительно низкозависима от мембранной и цитокиновой

	костимуляции
Способность к самоподдержанию отсутствует	Способность к самоподдержанию присутствует
Чувствительны к токсическому действию дексаметазона	Относительно резистентны к токсическому действию дексаметазона
Чувствительны к токсическому действию Ca ⁺⁺ -ионофорам	Относительно резистентны к токсическому действию Ca ⁺⁺ -ионофорам
Относительно резистентны к токсическому действию H ₂ O ₂	Чувствительны к токсическому действию H ₂ O ₂

Следует отметить, что Т-клетки памяти подразделяются на центральные (долгоживущие) и эффекторные (короткоживущие). Подобно наивным Т-лимфоцитам, долгоживущие центральные Т-клетки памяти (Т_{СМ}) экспрессируют на своей поверхности молекулу CD62L (лектин типа С) и хемокиновые рецепторы CCR7, которые способствуют их миграции в лимфоидные ткани (Tanel A. et al. 2009). Эффекторные Т-клетки памяти (Т_{ЕМ}) экспрессируют на своей поверхности хемокиновые рецепторы CCR3, способствующие их проникновению в органы и ткани нелимфоидной природы. В условиях антигенной стимуляции, Т_{СМ} активно пролиферируют и продуцируют ИЛ-2. В свою очередь, Т_{ЕМ}, индуцированные антигеном, обладают высокой цитотоксичностью и продуцируют IFN γ . Интересно, что Т_{СМ} способны дифференцироваться в Т_{ЕМ}, но не наоборот. Т_{СМ} в большей степени, чем Т_{ЕМ}, способны поддерживать и реконструировать иммунную память (Tanel A. et al. 2009). Сравнительные данные Т_{СМ} и Т_{ЕМ} суммированы в **таблице 2**.

Таблица 2. Сравнительная характеристика центральных и эффекторных клеток памяти (по данным Селедцова В.И. и др., 2010)

Центральные Т-клетки памяти	Эффекторные Т-клетки памяти
Долгоживущие	Относительно короткоживущие
Имеют тропность к лимфоидным тканям	Имеют тропность к нелимфоидным тканям
Экспрессируют CD62L, CCR6	Экспрессируют CCR3, CCR5,
Способны дифференцироваться в ЭКП	Не способны дифференцироваться в ЦКП

Т-клетки памяти имеют укороченные хромосомные теломеры сравнении с наивными Т-лимфоцитами. С возрастом изменяется пропорция Т-клеток разной степени дифференцировки - относительное содержание фракции Т-клеток памяти, особенно эффекторной их части, нарастает в крови, тогда как, число наивных Т-лимфоцитов снижается (Koch S. et al., 2008). Интересно, что у европейцев

содержание Т-клеток памяти намного ниже, чем у африканцев (Ben-Smith A. et al., 2008). В соответствии с вышесказанным, можно сделать предположение, что «старение» иммунной системы ассоциируется с процессом необратимой дифференцировки наивных Т-лимфоцитов в Т-клетки памяти. Вполне логичным представляется тот факт, что этот дифференцировочный процесс имеет прямую зависимость от инфекционной нагрузки на макроорганизм.

1.1.2. В-клетки памяти и долгоживущие плазматические клетки

В-клетки памяти принципиально отличаются от антигеннепримированных В-лимфоцитов. Эти отличия состоят в том, что В-клетки памяти способны при повторной встрече с антигеном быстро пролиферировать и дифференцироваться в плазматические клетки, а также оперативно переключаться с синтеза IgM на синтез IgG и IgA; причем продукция антител отличается высоким уровнем не только в количественном отношении, но в качественном - иммуноглобулины обладают высокой связывающей способностью (Benjamini E. et al., 1996; Shlomchik M.J., Weisel F., 2012).

Процесс дифференцировки В-клеток чрезвычайно зависим от микроокружения и условий антигенной стимуляции. В связи с этим, В-клетки памяти представляют собой гетерогенную клеточную популяцию. В-клеточную память подразделяют на естественную и адаптивную; на Т-зависимую и Т-независимую; на изотип-переключенную и непереключенную; на мутированную и немутированную (Sanz I. et al., 2008). Естественные В-клетки памяти (natural memory B cells) дифференцируются из наивных В-клеток, в основном, в маргинальных зонах (marginal zones) лимфоидных органов и экспрессируют немутированные IgM. Их функциональная активность не зависит от Т-лимфоцитов (Dörner T. et al., 2009; Fournier E.M. et al., 2012).

В отличие от естественных В-клеток памяти, дифференцировка адаптивных В-лимфоцитов памяти (adaptive memory B-cells) является Т- и антигензависимой и происходит в герминативных центрах (germinal centers, GC) лимфоидной ткани (Hamel K.M. et al., 2012; Shlomchik M.J., Weisel F., 2012).

GC - уникальная структура, которая формируется в течение иммунного ответа (ИО) на многие антигенные стимулы и заселяется активированными антиген-

специфическими В- и Т-клетками (на ранних стадиях ИО). По своей сути, GC - пункт интенсивной пролиферации В-клеток и их гибели (Schmidlin H, Diehl SA, Blom B., 2009; Shlomchik M.J., Weisel F., 2012; Chan T.D., Brink R., 2012). В-клетки в GC подвергаются соматической гипермутации и переключению изотипов; дарвиновский процесс эффективно выбирает В-клетки с более высокой способностью к выживанию и экспансии. В-клетки герминативного центра активируются и приобретают уникальный транскрипционный профиль, после чего они готовы к дифференциации либо в В-лимфоциты памяти или плазматические клетки (Sanz I. et al., 2008; Dörner T. et al., 2009; Shlomchik M.J., Weisel F., 2012). Механизмы, определяющие направление дифференцировки В-клеток GC в сторону В-клеток памяти или плазматических клеток, а также потенциальные источники обоих типов клеток – активно обсуждаются. Предполагают, что GC подвергается временному переключению, которое изменяет направление дифференцировки с MBCs на PCs, в то время как иммунный ответ прогрессирует. При этом ключевая роль отводится В-клеточному рецептору (BCR) (Shlomchik M.J., Weisel F., 2012).

Роль плазматических клеток в реализации вторичного иммунного ответа трудно переоценить, поскольку уже существующие антитела обеспечивают первую линию защиты от патогенных факторов. Антителопродуцирующие клетки, в отличие от В-клеток памяти, высокоспециализированы являются короткоживущими (период полураспада от 3–х до 14-ти дней), они не могут быть стимулированы антигеном, а так же делиться и увеличивать производство антител. Поэтому должна существовать еще одна популяция долгоживущих плазматических клеток за счет которой, при непрерывной антигенной стимуляции В-клеток памяти, происходит пополнение резерва быстро погибающих плазматических клеток, чтобы тем самым сохранить производство антител. Таким образом, возникло предположение о существовании популяции долгоживущих плазматических клеток которые остаются жизнеспособными достаточно долго: от нескольких месяцев до десятков лет. В эксперименте на мышах период полураспада составлял около 3-4 месяцев (Slifka M.K., Antia R., et.al., 1998; Manz R.A., Arce S., et.al., 2002; Crotty S., Kersh E.N., et.al., 2003). Такая модель логично объясняет долговечность антител после проведения специфической вакцинации и некоторых перенесенных острых инфекций.

Таким образом, по современным представлениям схема модели В-клеточного иммунного ответа выглядит следующим образом: на первом этапе в ответ на антигенную стимуляцию образуются короткоживущие плазматические клетки, затем долгоживущие плазматические клетки и В-клетки памяти. Выработка защитных антител инициируется антигеном путем антиген-специфической дифференцировки В-клеток в плазматические клетки заблаговременно в экстрафолликулярных очагах. Наиболее высокий уровень продукции специфических иммуноглобулинов отмечается в первые 2 недели постепенно снижаясь в течение 2-4 недель (Crotty S. et.al., 2003). В ходе этого процесса популяция антителпродуцирующих клеток уменьшается, а часть плазматических клеток начинает мигрировать или накапливаться в костном мозге (Hargreaves D.C., Hуman P.L., et al., 2001; Hauser A.E., Debes G.F., et al. 2002; Shlomchik M.J., Weisel F., 2012; Chan T.D., Brink R., 2012). После снижения продукции антител в центрах размножения (зародышевых центрах) фолликулов лимфоидных органов основным местом производства иммуноглобулинов становится костный мозг, где сосредоточено 80-90 процентов плазматических клеток (Crotty S., Kersh E.N., et al. 2003; Schmidlin H, Diehl SA, Blom B., 2009; Shlomchik M.J., Weisel F., 2012; Chan T.D., Brink R., 2012).

1.2. Стероидная регуляция иммунной системы

Иммунная система с самых ранних этапов своего развития тесно связана с эндокринной (**рисунок 1**). Гормоны оказывают дозозависимые разнонаправленные эффекты в отношении иммунных процессов. Могут стимулировать, либо угнетать иммунную систему, оказывая влияние на пролиферацию иммунокомпетентных клеток, митоз, синтез белка, репликацию нуклеиновых кислот, экспрессию генов, изменения на клеточных мембранах (Феодоритова Е., 2002; Ярилин А.А., 2010; Литвинова Л.С. и соавт., 2011).

Стероидные гормоны играют важнейшую роль 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 Y.

et al., 2003; Sallusto F. et al., 2004; Fedor M.E. et.al., 2006; van Mens S.P. et al., 2012).



Рисунок 1. Взаимосвязь иммунной и эндокринной систем (по Grossman C.J. et al., 1994 с изменениями и дополнениями)

Эффекты стероидных гормонов могут быть реализованы через *геномные* и *негеномные* механизмы, что определяет их разнонаправленное действие на разные клетки макроорганизма (Wherry E.J. et al., 2003; Fedor M.E. et al., 2010; Gruver-Yates A.L. et al., 2013; Cheng Q. et al., 2014; Ayroldi E. et al., 2014).

1.2.1. Действие глюкокортикоидов на компоненты иммунной системы

Глюкокортикоиды (ГК) - мощные иммуносупрессивные агенты, которые оказывают комплексное воздействие на клетки иммунной системы. Их основные эффекты: индукция апоптоза, ингибирование высвобождения провоспалительных медиаторов и стимуляция продукции противовоспалительных цитокинов, снижение миграции иммунокомпетентных клеток и др. (Wherry E.J. et al., 2003; Fedor M.E. et al., 2010; Gruver-Yates A.L. et al., 2013; Cheng Q. et al., 2014; Ayroldi E. et al., 2014).

Глюкокортикоиды являются сильными индукторами апоптоза во многих типах клеток и тканей. Апоптоз, индуцированный действием глюкокортикоидов затрагивает костную систему, мышечный аппарат, сердечно-сосудистую систему, нервную, эндокринную, репродуктивную и иммунную системы. Интересно, что некоторые типы клеток имеют антиапоптотический (цитопротекторный) ответ на глюкокортикоиды (Bjelaković G. et al., 2010; Gruver-Yates A.L., Cidlowski J.A., 2013).

Действие глюкокортикоидов на клетки, 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 (Калинина Н.М., Кетлинский С.А., 2008; Ashwell J.D. et al., 2000; Greenstein S., 2002; Gruver-Yates A.L., Cidlowski J.A., 2013; Cheng Q. et al., 2014; Ayroldi E. et al., 2014).

GR - фосфопротеин с молекулярной массой 85-97 кДа, в низких концентрациях присутствует в большинстве клеток млекопитающих (Distelhorst C.W., Dubyak G., 1998). GR, после связывания лиганда, транслоцируется в ядро и оказывает множество геномных и негеномных эффектов. Ген, кодирующий GR у человека, находится на 5 хромосоме в локусах 31-32 (5q31-32) (Lu N.Z., Cidlowski J.A., 2004). Рецептор имеет три основные функциональные области: N-концевой домен, ДНК-связывающий домен (DBD), и лиганд-связывающий домен (LBD) (Lu N.Z., Cidlowski J.A., 2004). Альтернативный сплайсинг 9 экзона дает 2 основные изоформы рецептора: hGR α и hGR β (Oakley R.H. et al., 1996; Gruver-Yates A.L., Cidlowski J.A., 2013). Высокая экспрессия изоформы hGR α отвечает за классическую сигнализацию и модуляцию транскрипции генов, в то время как роль изоформы hGR β менее определена. Эта субъединица может функционировать как доминантный негативный ингибитор hGR α сигнализации (Gruver-Yates A.L., Cidlowski J.A., 2013).

Кроме того, инициация сайтов альтернативной трансляции и посттрансляционной модификации GR приводят к образованию различных GR-изоформ и сложному комплексу рецепторных молекул (Lu N.Z. et al., 2004; Smith L.K., Cidlowski J.A., 2010). Интересно, что разные трансляционные изоформы

субъединицы GR α индуцируют апоптоз с разной интенсивностью. GR α -C изоформа идентифицирована как наиболее мощный индуктор апоптоза, в то время как GR α -D оказывает менее выраженный эффект (Lu N.Z. et al., 2007). Таким образом, относительная доля конкретных изоформ GR в тканях и клетках могут влиять на их реакцию в ответ на ГК-индуцированный апоптоз (Lu N.Z. et al., 2007).

Чувствительными к действию глюкокортикоидов, в основном, являются гены, обеспечивающие переход G₁-периода в S-фазу (Miesfeld R.L., 1990). Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что под влиянием этих гормонов повышается экспрессия кальмодулина (Kofler R., 2000), снижается продукция IL-2 (Evan G., Littlewood T., 1998), увеличивается концентрация внутриклеточного цАМФ (Dowd D.R., Miesfeld R.L., 1992) и резко возрастает уровень образования активных форм кислорода (Smets L.A. et al., 1999).

Для ГК известны и «быстрые», негеномные эффекты, которые реализуются за счет нескольких механизмов. ГК способны взаимодействовать непосредственно с фосфолипидным бислоем клеточной мембраны, изменяя ее химико-физические свойства, а также модулировать активность кальциевых или натриевых каналов (Stahn C., Buttgereit F., 2008). ГК также могут оказывать прямое действие на мембраны митохондрий. Авторы предполагают, что высокие дозы ГК, модифицируя трансмембранный потенциал митохондрий, снижают доступность АТФ, изменяя, таким образом, клеточные функции (Sionov R.V. et al., 2008).

Другой негеномный механизм заключается в активации белков теплового шока (HSP) и шаперонов комплексом ГК-ГКР, что приводит к высвобождению арахидоновой кислоты из мембранных фосфолипидов (Stahn C., Buttgereit F., 2008). ГК также могут связываться с рецептором, экспрессированным на клеточной мембране (GCRm): в течение 30 минут после введения ГК *in vitro*, блокируется TCR-сигнал путем ингибирования протеинкиназы S_{CR}, вызывая разобщение с TCR, а также подавляя фосфорилирование таких молекул, как митоген-активированная протеин-киназа (МАРК), c-Jun-NH₂-концевая протеинкиназа (JNK), протеинкиназа В, протеинкиназа С и p38 (Lowenberg M. et al., 2006). Относительно недавно GCRm был идентифицирован на моноцитах и В-клетках из периферической крови (Stahn C., Buttgereit F., 2008). Авторы предполагают, что высокая экспрессия GCRm на моноцитах и лимфоцитах пациентов с ревматоидным артритом, определяет

активное участие GCRm в патогенезе хронических воспалительных заболеваний (Bartholome V. et al., 2004).

Выявлено, что в концентрациях, близких к физиологическим, глюкокортикоиды индуцируют апоптоз активированных лимфоцитов (в тимусе, селезенке, лимфоузлах) (Zen M. et al., 2011). Чувствительность лимфоидных клеток к проапоптотическому действию глюкокортикоидов зависит от стадии развития клеток. Пре-Т-клетки и пре-В-клетки, незрелые Т-клетки тимуса, определенные субпопуляции зрелых лимфоцитов (NK-клетки, CTL), незрелые В-лимфоциты, а также эозинофилы претерпевают апоптоз под действием физиологических доз глюкокортикоидов (Meagher L.C. et al., 1996; Lill-Elghanian D. et al., 2002; Cao Y. et al., 2013).

Выявлено, что ГК ингибируют трансдукцию кальциевого сигнала, опосредованного инозитол 1,4,5-трифосфатом (IP3). Стимуляция TCR индуцирует выход кальция из эндоплазматического ретикулума за счет механизма, который частично опосредован лимфоцит-специфичной протеиновой тирозин-киназой (Lck). Это фермент суперэкспрессирован в незрелых (дубльпозитивных) Т клетках (Harr M.W. et al., 2009). Harr M.W. и соавт. (2009) показали, что воздействие низких доз дексаметазона (1-10 нМ) на незрелые Т-клетки вызывает модификацию кальциевого сигнала, за счет угнетения киназы Lck, которая ингибирует экспрессию рецептора IP3, и, как следствие - TCR опосредованный сигнал.

Напротив, глюкокортикоиды защищают от апоптоза нейтрофилы (Saffar A.S. et al., 2011). Зрелые Т- и В-лимфоциты, в том числе и клетки иммунной памяти нечувствительны к глюкокортикоидам (Ярилин А.А., 1996; Müller M. et al., 2003; Zhou Q. et al., 2009).

Интересным представляется тот факт, что в тимусе ГК, через индукцию апоптоза контролируют негативную и позитивную селекцию тимоцитов. При этом эпителиальные клетки тимуса обладают способностью синтезировать глюкокортикоиды, что создает нужную локальную концентрацию этих гормонов (Ashwell J.D. et al., 2000). Действие глюкокортикоидов на адреналэктомированных крыс приводит к инволюции тимуса и программированной клеточной гибели до половины всех тимоцитов,

преимущественно незрелых клеток с фенотипом CD4⁺ и CD8⁺ (Compton M.M. et al., 1987).

ГК супрессируют дифференцировку и многие функции макрофагов: экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС-I и МНС-II), продукцию и высвобождение простогландинов, лейкотриенов и провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, TNF α и др.). Кроме того, ГК снижают противоопухолевую и антибактериальную активность макрофагов (Giles K.M. et al., 2001; Zhou J.Y. et al., 2010).

Напротив, В-лимфоциты обладают относительной резистентностью к иммуносупрессивному эффекту ГК (Lill-Elghanian D. et al., 2002; Калинина Н.М., Кетлинский С.А., 2008). В то же время некоторые исследователи сообщают о наличии GR-рецепторов на мембранах В-клеток пациентов, страдающих с РА (Bartholome V. et al., 2004) и указывают на необходимость дальнейших исследований в этой области.

Активируя транскрипцию гена, кодирующего CD25, ГК способствуют увеличению экспрессии CD25 на регуляторных клетках с фенотипом: CD4+CD25+Foxp3. Авторы выявили повышение числа CD4+CD25 + Т-клеток у пациентов, страдающих СКВ, на фоне лечения ГК (Suarez A. et al., 2006).

Влияние глюкокортикоидов на первичный иммунный ответ выражено сильнее, чем на вторичный, поскольку клональная экспансия клеток при вторичном ответе уже снижена в результате уменьшенной продукции IL-2 (Дейл М.М., Формен Д.К., 1998; Гуцол А.А. и соавт., 2013).

Многочисленными исследованиями установлено, что ГК/GR сигналинг лимитирует транскрипцию (транс-репрессию) воспалительных генов, включая провоспалительные цитокины. Существуют убедительные доказательства, что ГК способны влиять на баланс Th1/Th2, сдвигая его в сторону последних. Так, ГК ингибируют продукцию IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, IL-16, INF- γ , гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), TNF- α , металлопротеиназы-9 (ММП-9), и хемокинов: IL-8, RANTES, эотаксина, воспалительного белка макрофагов - 1 (MIP-1) (Liu Z. Et al., 2009; Spiesa C.M. et al., 2010).

Разная чувствительность субпопуляций Th1 и Th2 к глюкокортикоидам связана с дифференциальной экспрессией GR на этих клеток. Под влиянием IL-4 в сочетании с IL-2 у лимфоцитов повышается количество рецепторов для глюкокортикоидов, а под влиянием IFN- γ – снижается. Так, дифференцировка лимфоцитов в отсутствие IL-4, в присутствии высокой концентрации IFN- γ приводит к созреванию Th1, резистентных к глюкокортикоидам (Калинина Н.М., Кетлинский С.А., 2008; Ashwell J.D. et al., 2000; Zen M. et al., 2011; Gruver-Yates A.L. et al., 2013).

Противовоспалительное и иммуносупрессивное действие глюкокортикоидов даёт основание для их терапевтического применения при лечении ряда заболеваний. На сегодняшний день глюкокортикоидная терапия остаётся одним из наиболее действенных фармакотерапевтических вариантов лечения аутоиммунных заболеваний (АИЗ), направленная на подавление чрезмерной воспалительной реакции (Bjelaković G., Stojanović I., 2010). В последнее время в литературе накапливаются данные, свидетельствующие, что краткосрочные и долгосрочные эффекты стероидных гормонов на иммунные процессы могут иметь разнонаправленный характер. В частности, показано, что реакция на стресс, неразрывно связанная с усилением продукции гормонов надпочечников и с краткосрочной иммунодепрессией, в долгосрочной перспективе способствует генерации антигенспецифичных цитолитических Т-лимфоцитов. Так, однократное введение мышам дексаметазона способно усилить индуцируемые опухолевой вакциной иммунные реакции (Saint-Mezard D. et al., 2003; Maile J. et al., 2006). В эксперименте и в клинических исследованиях показана возможность стимулирующего влияния кортикостероидов на развитие иммунных реакций опосредуемых Т-хелперами-2 типа (Dozmozov I.M., 1998; Wiley F. et al., 2004; Zhang S. et al., 2009).

Cupps T.R и соавт. (1985) установлено, что длительное лечение ГК приводит к уменьшению размеров селезенки и числа В-клеток, ослаблению пролиферации ранних В-клеток-предшественниц, увеличению продукции IgE и снижению секреции IgG (Cupps T.R. et al., 1985). О подобном эффекте ГК свидетельствуют и другие исследователи: длительная терапия низкими дозами кортикостероидов приводит к обратимому снижению числа В-клеток и специфических антител (Fedor

М.Е., Rubinstein A., 2006). Huard B. и соавт. (2001) установлено, что лечение высокими дозами дексаметазона (40 мг / день в течение 5 дней) может вызвать значительное снижение уровней циркулирующего фактора активации В-клеток (BAFF) и экспрессии его мРНК (Huard B. et al., 2001). Кроме того, показано участие BAFF в костимуляции Т-клеток (Youinou P., Pers J.O., 2010).

Высокие дозы глюкокортикоидов широко используются для лечения рассеянного склероза (РС) (Wüst S., van den Brandt J. et al., 2008). Leussink V.I. и соавт. (2001) провели исследование чувствительности разных мононуклеарных клеток периферической крови к апоптозу после импульсной обработки метилпреднизолоном у пациентов, страдающих рассеянным склерозом. Ими выявлена значительная чувствительность CD4⁺ Т-клеток к МП и умеренная - CD8⁺ Т-лимфоцитов. В-лимфоциты и NK-клетки были резистентны к его действию, что может быть опосредовано плотностью рецепторов GR на разных типах клеток (Leussink V.I. et al., 2001). Согласно данным, опубликованным Martínez-Cáceres A. и соавт. (2002), длительное лечение пациентов МП приводит к относительному увеличению циркулирующих в крови миелинреактивных CD4⁺CD45RO⁺ Т-клеток (Martínez-Cáceres A. et al., 2002).

Таким образом, на сегодняшний день не сформировано убедительных доказательств того, что какой-либо из используемых глюкокортикоидных препаратов оказывает более специфическое действие на патологические процессы, развивающиеся при тех или иных аутоиммунных заболеваниях.

Суммируя вышеизложенное, можно сделать заключение о том, что действие стероидных гормонов, оказываемое на иммунную систему, многогранно. Безусловно, их эффекты на клетки врожденного и адаптивного иммунитета определяются многими факторами: типом клеток, степенью их дифференцировки, активационным статусом и т.д. Следует отметить дозозависимость влияния ГК на компоненты иммунной системы, в целом.

1.2.2. Гормоны половых желез и функции иммунной системы

Половые стероидные гормоны являются одними из основных дирижеров иммунных реакций (Grossman C.J. et al., 1994; Селедцов В.И. и соавт., 2010;

Литвинова Л.С. и соавт., 2013) (**рисунок 2**). Еще в 90-х гг. прошлого столетия было доказано, что адекватный иммунный ответ обеспечивается определенным гормональным гомеостазом, и любые его изменения приводят к нарушению нормальной иммунологической реактивности (Brunelli R. et al., 1996; White H.D. et al., 1997).

Для человеческой популяции и экспериментальных животных характерен феномен – *иммунологический половой диморфизм*, который является результатом взаимодействия нейроэндокринной и иммунной систем (Moore F.A. et al., 1996; Chang C. et al., 2013). Начало исследований в области *полового диморфизма*, определяющего течение иммунных реакций, было положено в 1969 г. Graff R.J. и его соавторы (1969) доказали, что у самок и кастрированных самцов мышей наблюдается более раннее отторжение аллотрансплантатов кожи, чем у интактных животных мужского пола (Graff R.J. et al., 1969). Они предположили, что женские и мужские половые гормоны обладают разным иммуномодулирующим действием, где андрогены играют, преимущественно, иммуносупрессивную роль.

В более поздний период выявили, что самки по сравнению с самцами имеют сильный клеточно-опосредованный иммунный ответ с более высокой продукцией антител при антигенной стимуляции (Lahita R. G., 1997) и обладают высокой склонностью к развитию аутоиммунных заболеваний (Whitacre C. C. et al., 1996; Anderson D.J., 2000; Druckmann R., 2001; Chang C. et al., 2013). В отличие от женщин, мужчины имеют более высокий риск развития сепсиса, острых респираторных заболеваний, а также недостаточности многих внутренних органов, развивающейся вследствие травм мягких тканей, геморрагического шока или термической травмы (Moore F.A. et al., 1996; Chang C. et al., 2013).

Помимо системного воздействия на иммунологическую реактивность, половые стероиды оказывают значительное влияние на состояние местного иммунитета, а именно: защитного иммунитета слизистых половых путей (Grossman S.J. et al., 1994; Lemola-Virtanen R. et al., 1997).

Учитывая вышесказанное, мы предприняли попытку систематизировать имеющиеся в литературе сведения о влиянии половых стероидных гормонов на иммунную систему в целом.



Рисунок 2. Половые стероидные гормоны и иммунный ответ (адаптировано из Druckmann R., 2001)

1.2.3. Влияние женских половых гормонов на компоненты иммунной системы

Эстрогены - ключевые гормоны в овуляции и поддержании беременности у женщин; снижение их продукции способствует развитию ассоциированных с возрастом заболеваний, таких как *гормон-зависимая* онкология, *остеопороз*, сердечно-сосудистые заболевания и др. Эффекты эстрогенов на *баланс Th1/Th2* были охарактеризованы в нескольких типах клеток и животных моделях (Priyanka N.P. et al., 2013).

Отмечена дозовая зависимость влияния эстрогенов на иммунную систему в целом (Grossman C.J. et al., 1994; Cunningham M, Gilkeson G., 2011).

Исследованиями Grossman C.J. и соавт. (1994) было установлено, что высокие концентрации эстрогенов блокируют генерацию Т-клеток в тимусе; оказывают избирательное действие на разные субпопуляции Т-лимфоцитов: супрессируют развитие и функции цитотоксических Т-клеток, и напротив, опосредуют активацию Т-хелперов. Последние активируют созревание В-клеток с

последующим увеличением продукции антител в ответ на антигенную стимуляцию (Grossman C.J. et al, 1994). Низкие дозы эстрогенов, напротив, обеспечивают так называемое иммуномодулирующее действие, т.е. способствуют восстановлению иммунных нарушений, развивающихся на фоне дефицита эстрогенов (Grossman C.J. et al, 1994; Литвинова Л.С. и соавт., 2011; 2013). По данным Kincade P.W. и соавт. (2000), снижение системного уровня эстрогенов ниже нормы приводит к росту продукции В-лимфоцитов. Отмечено существование гормонально-чувствительной критической точки дифференциации лимфоцитов в костном мозге (Grossman C.J. et al., 1994; Kincade P.W. et al., 2000).

Уровень эстрогенов подвержен колебаниям в течение репродуктивного периода и резко снижается с наступлением менопаузы. Функциональная активность иммунной системы у женщин зависит от 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). Так, в менопаузе, т.е. в условиях дефицита эстрогенов, значительно снижается индекс иммунореактивности – $CD4^+/CD8^+$, повышается уровень $CD4^+$, $CD3^+$ и $CD8^+$ -презентирующих клеток, происходит повышение активности естественных киллеров, увеличивается количество и активность В-лимфоцитов (Brunelli R. et al., 1996; White H.D. et al., 1997). Это в какой-то степени объясняет большую заболеваемость среди женщин такими аутоиммунными заболеваниями, как ревматоидный артрит и рассеянный склероз (Chang C. et al., 2013). Пик заболеваемости аутоиммунной патологией у женщин, по данным литературы, приходится на периоды дисгормональных изменений - пубертатный, ранний послеродовой, или климактерический (возраст 40-55 лет) (Татарчук, Т.Ф., Сольский Я.П., 2003; Leposavić G., Perisić M., 2008; Hince M. et al., 2008). Особенно выраженная гендерная разница в заболеваемости наблюдается в возрасте старше 35 лет (Татарчук, Т.Ф., Сольский Я.П., 2003). У женщин гормональные изменения являются более существенными при менопаузе, в то время как у мужчин уровни половых стероидных гормонов снижаются постепенно (Harman S.M. et al., 2001; Feldman H.A. et al., 2002).

Свои эффекты эстрогены реализуют за счет геномных и негеномных эффектов. Ядерные рецепторы к эстрадиолу (ER) α и β сверхэкспрессированы иммунных 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). ER α и ER β функционируют как транскрипционные факторы, активированные лигандом (Prossnitz E.R. et al., 2011). Основной эндогенный эстроген, 17 β -эстрадиол (E2), с одинаковой афинностью связывается с ER α и ER β . Тем не менее, важно отметить, что в то время как через ER α - эстрогены стимулируют пролиферацию, сигнализация через ER β ингибирует пролиферацию, активируя апоптоз (Yakimchuk K. et al., 2013). Описаны также негеномные эффекты эстрогенов (Prossnitz E.R. et al., 2011; Priyanka H.P. et al., 2013).

Относительно недавно выявили, что 17 β -эстрадиол может действовать через сигнальные пути - трансмембранный ERs, который представляет собой G-связанный протеин ER1 (GPER; раньше известный как GPR30). GPER вовлечен как в быструю передачу сигналов, так и транскрипционное регулирование (Prossnitz E.R. et al., 2011). Priyanka H.P. и соавт. (2013) в своей работе также показали, что молекулярные механизмы, вовлеченные в реализацию иммуномодулирующих функций эстрадиола опосредованы через его рецепторы и включают участие внутриклеточных сигнальных путей, таких как ERK, CREB и Akt, а также антиоксидантных ферментов (Priyanka H.P. et al., 2013).

Предполагают, что эти рецепторы вовлечены в процессы созревания и дифференцировки Т-клеток в тимусе и изменение лимфопоэза в костном мозге (Cunningham M., Gilkeson G., 2011). Кроме того, экспрессия рецепторов к эстрогенам на ретикулоэпителиальном матриксе тимуса объясняет возможность модулирующего влияния функций иммунной системы как опосредованным путем — за счет снижения продукции гормонов тимуса (тимопоэтина, тимозина, тимического гуморального фактора, тимулина) и воздействие на уровень регуляторных медиаторов - цитокинов, так и через лимфоцитарные стероидные рецепторы (Grossman C.J. et al., 1994; Polese V. et al., 2014). Наличие эстрогенных рецепторов обнаружено и на стромальных клетках костного мозга. Kincade P.W. et al. (2000) с использованием экспериментальных моделей (мыши) показано, что эстрогены снижают продукцию лимфоцитов через активацию продукции

стромальными клетками субстанций, ингибирующих В-лимфопоэз. Более того, предшественники В-лимфоцитов также являются прямой мишенью для половых стероидов (Kincade P.W. et al., 2000; Nakada D. et al., 2014). Интересным является тот факт, что гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) экспрессируют высокие уровни ER α . Условное удаление ER α из ГСК уменьшает число их делений у самок-мышей, но не у самцов. При беременности, сигналинг эстроген / ER α способствует самообновлению гемопоэтических стволовых клеток, увеличению ГСК в селезенке и значительно усиливает эритропоэз (Nakada D. et al., 2014).

Выявлена дифференциальная экспрессия ERs на Т- и В-лимфоцитах: на CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках наблюдается сверхэкспрессия ER α , на В-клетках – Er β (Cunningham M., Gilkeson G., 2011).

Перераспределение изоформ высокоаффинных эстрогенных рецепторов на мембранах «зрелых» лимфоцитов определяет его специфичность в отношении действия на разные субпопуляции Т-лимфоцитов. Выявлено, что эстрадиол стимулирует антигенспецифический иммунный ответ, возможно путем угнетения CD8⁺ Т-клеток и, соответственно, активации CD4⁺ Т-клеток (Anderson D.J., 2000; Chernyshov V.P. et al., 2001).

В физиологических концентрациях эстрадиол стимулирует митоз в популяциях иммунокомпетентных клеток (Chernyshov V.P. et al., 2001). Эти данные были подтверждены Cutolo M. et al. (2004): они показали, что 17 β -эстрадиол усиливает экспрессию маркеров роста и пролиферации клеток, в то время как тестостерон опосредует увеличение молекул, указывающих на повреждение ДНК и развитие апоптоза (Cutolo M. et al., 2004).

Показано влияние эстрадиола на функции мышечных Т-лимфоцитов и экспрессию CCR (Mo R. et al., 2005). Выявлена способность эстрогенов снижать активность натуральных киллеров (Дранник Г.Н., 1999; Brunelli R. et al., 1996; Druckmann R., 2001). Некоторыми авторами показано, что эстрадиол модулирует экспрессию цитокинов и хемокинов дендритными клетками человека и мыши (Liu H.Y. et al., 2002; Bengtsson A.K. et al. 2004), которые в дальнейшем влияют на реализацию вторичного иммунного ответа.

Интересны эффекты эстрогенов в отношении индукции активности теломеразы в разных клеточных системах, в частности: в клетках рака молочной

железы (Kyo S. et al., 1999), эндометрия (Kyo S. et al., 1997), предстательной железе (Meeker AK. Et al., 1996), эпителиальных клетках яичников (Misiti S. et al., 2000). Отмечена способность эстрогенов оказывать влияние на длину хромосомных теломер в гепатоцитах (Sato R. et al., 2004) и клетках яичника (Cong Y-S. et al., 2002). Выявлен предполагаемый функциональный элемент ответа на эстроген (ERE), который способен связывать *in vitro* человеческий рецептор эстрогена Era (но не Er β). *In vivo* выявили модификацию ERE-региона в Era -позитивных клетках после действия 17 β -эстрадиола, что свидетельствовало об эстроген-зависимом ремоделировании хроматина (Misiti S. et al., 2000; Xu D. et al., 2014).

Относительно недавно, были предприняты несколько попыток оценить эффекты эстрогенов на экспрессию теломеразы и ее активность в лимфоцитах человека (Effros R.V. et al., 2005; Choi J. et al., 2008; Calado R.T. et al., 2009).

Прогестерон (ПГ), наряду с эстрадиолом, является одним из важнейших гормонов женской репродуктивной системы, играет ключевую роль в «установлении» и поддержании беременности. Помимо эндокринных, для ПГ характерны иммунологические свойства, в частности, известны его иммуносупрессивные эффекты (Siiteri P.K. et al., 1997). Piccinni M.P. и соавт. (1995), показали, что ПГ способствует развитию Th2 CD4 + Т-клеток (Piccinni M.P. et al., 1995). Влияние ПГ на развитие Th2 ответа опосредовано через иммуномодулирующий белок, так называемый Р4-индуцируемый блокирующий фактор (PIBF), способствующий увеличению секреции лимфоцитами Th2-цитокинов у мышей (Szekeres-Bartho J. et al., 1996).

Увеличение экспрессии IL-4 при одновременном снижении IFN- γ в лютеиновой фазе овариального цикла связывают с повышенными уровнями ПГ и эстрогенов (Faas M. et al., 2000; Dosiou C. et al., 2004). Кроме того, у мышей, ПГ непосредственно ингибирует развитие Th1 при одновременной поляризации в сторону Th2 (Miyaura H. et al., 2002).

Появление парадигмы о балансе между различными субпопуляциями CD4+ Т-клеток - Th1/Th2/Treg/Th17, привело к изучению рецепторов ПГ на этих клетках. Mjosberg J. и соавт. (2009) указали на регулируемую роль ПГ на Treg клетки во время беременности человека (Mjosberg J. et al., 2009). В экспериментальных

моделях *in vivo* и *in vitro*, показано, что ПГ не только увеличивает число Treg, но и повышает их супрессивные эффекты (Mao G. Et al., 2010).

Связь между уровнями Treg и ПГ была подтверждена также и у человека (Weinberg A. et al., 2011). Lee J.H. и соавт. показали, что ПГ способствует дифференциации Т-клеток пуповинной крови плода человека в Treg-лимфоциты (Lee J.H. et al., 2011).

Интересно, что ПГ также способствует генерации iTreg клеток (Lee J.H. et al., 2012), которые подавляют развитие Th17-клонов у мышей. В Т-клетках (человеческих и мышинных), ПГ подавляет Th17-дифференцировку и снижает экспрессию связанных с развитием Th17 ответа факторов - RORC и IL-17a (Xu L. et al., 2013).

Считается, что Т-лимфоциты не имеют классических прогестероновых рецепторов (PR, 1 типа, ядерных). *В литературе это вопрос носит дискуссионный характер.* Одни исследователи свидетельствуют, что Т-клетки, как и макрофаги, имеют глюкокортикоидные рецепторы. Так, ПГ и ацетилированные прогестагены прегнанового типа активизируют глюкокортикоидные рецепторы и оказывают глюкокортикоидоподобное иммуносупрессивное действие (Kontula K. et al., 1983; Grossman C.J. et al., 1994). Druckmann R. (2001) показал, что регулирующее действие прогестерона на Т-клетки и естественные киллеры обеспечивается путем обратимой блокады потенциал- и кальцийзависимых каналов с последующей деполяризацией мембран (Druckmann R., 2001).

Относительно недавно рецепторы к ПГ были обнаружены на мембранах Т-клеток человека (mPRs) (Dosiou C. et al., 2008). В частности, описаны: mPR α , mPR β , and mPR γ . Авторами показано, что экспрессия mPR α регулируется ПГ в CD8⁺ Т-лимфоцитах, но не в CD4⁺ Т-клетках, с повышенной экспрессией в середине лютеиновой фазы цикла.

Факт повышения экспрессии mPR α в CD8⁺ клетках в лютеиновой фазе особенно интересен, так как CD8⁺ Т-лимфоциты, как было установлено, обеспечивают защитный эффект производных прогестерона против индуцированного стрессом аборта у мышей, путем изменения профиля цитокинов Th1 / Th2 в пользу из Th2 медиаторов (Blois S.M. et al., 2004).

Однако Lee J.H. и соавт. (2010) установили, что в экспансии Treg участвуют ядерные и мембранные рецепторы ПГ (Lee J.H. et al., 2012). PIBF является одним из целевых генов ПГ в лимфоцитах во время беременности. Он регулирует экспрессию цитокинов через сигнализацию JAK1 / STAT6 пути (Kozma N. et al., 2006; Szekeres-Bartho J. et al., 2009).

В целом, современные исследования свидетельствуют, что ПГ способствует развитию Th2 и Treg клеток, угнетая Th1 и Th17, создавая благоприятную среду для развития беременности.

Еще одним из гормонов женской репродуктивной системы, тесно связанным с функциями иммунной системы – является хорионический гонадотропин (ХГЧ). ХГЧ принадлежит к группе гликопротеиновых гормонов, куда входят также: тиреотропный гормон, (тиреотропин, ТТГ), лютеинизирующий гормон (лютропин, ЛГ), фолликулостимулирующий гормон (фоллитропин, ФСГ) (Polese B. et al., 2014). Иммуномодулирующие свойства ХГЧ многочисленны. ХГЧ имеет положительное влияние на uNK-клетки, которые являются преобладающим подтипом лейкоцитов в беременной матке у человека и мышей (Lash G.E. et al., 2010; Yagel S., 2009; Moffett A. et al., 2014).

В частности, uNK-клетки регулируют ремоделирование децидуальных спиральных артериол (Zhang J. et al., 2011), преимущественно, путем секреции ангиогенных факторов, таких как члены семейства VEGF (Hanna J. et al., 2006).

Показано, что ХГЧ регулирует пролиферацию uNK-клеток (Bansal A.S. et al., 2012). Дозозависимое увеличение числа uNK наблюдается при их инкубации с ХГЧ in vitro (Kane N. et al., 2009).

Выявлена способность ХГЧ регулировать функции моноцитов и макрофагов, усиливать продукцию ими IL-8 (Kosaka K et al., 2002; Wan H. et al., 2007). ХГЧ влияет на дифференцировку и функции дендритных клеток, снижая их способность стимулировать пролиферацию Т-клеток (Wan H. et al., 2008).

Khan N.A. и соавт. (2001) показали, что лечение NOD мышей ХГЧ предотвращает развитие аутоиммунного диабета (Th1 типа). Они выявили, что инъекции ХГЧ NOD-мышам до начала диабета, позволяют избежать воспалительной инфильтрации поджелудочной железы и значительно снижают гипергликемию. Кроме того, они установили, что ХГЧ ингибируют развитие Th1

клеток и продукцию ими IFN γ (Khan N.A. et al., 2001). Эта информация была подтверждена и дополнена другими авторами. Так, Khil L.Y. и соавт. (2007) продемонстрировали, что ХГЧ опосредует супрессию Т-клеточной пролиферации, при увеличении числа CD4⁺CD25⁺ Т-лимфоцитов у NOD-мышей (Khil L.Y. et al., 2007). Интересным является факт, что истощение CD4⁺CD25⁺ Т-клеток отменяет защитные эффекты лечения ХГЧ на развитие диабета.

С использованием миграционных тестов, Schumacher A. и соавт (2013) показали, что ХГЧ привлекает Treg-клетки в матку на ранних сроках беременности (Schumacher A. et al., 2009). Этими же исследователями было установлено, что ХГЧ увеличивает число Treg-клеток *in vivo* и усиливает их супрессивные свойства *in vitro* (Schumacher A. et al., 2013).

1.2.4. Действие мужских половых гормонов на компоненты иммунной системы

Андрогены и их рецепторы (AR) контролируют развитие и функции мужской и женской репродуктивных систем (Yeh S. et al., 2002; Palacios S., 2007; Hu Y.C. et al., 2004). Ген AR расположен на X-хромосоме как у человека, так и в геноме мыши. AR является прототипом ядерных рецепторов, содержащий N-концевой домен, лиганд-связывающий домен, ДНК-связывающий домен и С-концевой домен (Chang C.S., Kokontis J., Liao S.T., 1988; ; Foradori C.D. et al., 2008; Chang C. et al., 2013). После связывания лигандов – тестостерона или 5 α -дигидротестостерона с AR, последний транслоцируется в ядро и связывается с андроген-реактивными элементами на промоторах или энхансерах генов-мишеней, включая или выключая их экспрессию (Brinkmann A.O. et al., 1999).

Помимо геномного механизма действия андрогенов, существуют и негеномные эффекты (Heinlein C.A., Chang C., 2002; Foradori C.D. et al., 2008; Chang C. et al., 2013). Андрогены способны вызывать быструю активацию киназ-сигнальных каскадов и модулировать внутриклеточные уровни кальция. Предполагают, что эти эффекты негеномные, поскольку они осуществляются в клеточных типах, которые не имеют функционального AP, и в присутствии ингибиторов транскрипции и трансляции. Эти эффекты происходят очень быстро,

чтобы включать в себя изменения в генной транскрипции. Такие негеномные эффекты андрогенов могут осуществляться через цитоплазматический AR, активирующий MAPK – сигнальный каскад. В дополнение, андрогены могут функционировать через секс-стероидсвязывающий протеин и возможно, через G-белок-связанные рецепторы, для активации систем вторичных мессенджеров. Однако физиологический эффект негеномного действия андрогенов до сих пор не определен (Heinlein C.A., Chang C., 2002).

Участие андрогенов и их рецепторов в регуляции функций иммунной системы на сегодняшний день является доказанным, поскольку экспрессия AR, помимо клеток гормон-зависимых органов и тканей, была обнаружена в различных иммунных клетках, *включая нейтрофилы, тучные клетки, макрофаги, В- и Т-клетки* (Viselli S.M. et al., 1997; Mantalaris A. et al., 2001). Тимус уже давно признан в качестве мишени действия мужских половых гормонов (Kovacs and Olsen, 1987, Olsen et al., 1991). Относительно недавно было показано, что циркулирующие уровни половых гормонов могут влиять на выход Т-клеток из тимуса (Olsen N.J., Kovacs W.J., 2011).

Однако данные, касающиеся распространённости AR на клетках иммунной системы, весьма противоречивы и имеют дискуссионный характер. Olsen N.J. и Kovacs W.J. (2001) выявили, что экспрессия AR, лиганд-активированного фактора транскрипции, опосредующего действие гормона, зарегистрирована в лимфоидных и нелимфоидных клетках тимуса и костного мозга, но не в зрелых лимфоцитах периферической крови. С использованием экспериментальных моделей химерных животных они показали, что эпителиальные клетки тимуса и стромальные клетки костного мозга необходимы в качестве посредников андрогенных эффектов для развития и созревания незрелых лимфоцитов (Kincade P.W. et al., 2000; Olsen N.J, Kovacs W.J., 2001; Olsen N.J., Olson G., Viselli S.M., Gu X., Kovacs W.J., 2001).

Эти данные были подтверждены другими исследователями. Использование метода проточной цитометрии позволило выявить, что AR экспрессируется всеми субпопуляциями тимоцитов, выявляемых с помощью маркеров CD3, CD4, CD8, с самой высокой экспрессией AR в CD3^{low}CD8⁺ - незрелых тимоцитах (Kovacs W.J., Olsen N.J., 1987; Viselli S.M., Olsen N.J., Shults K., Steizer G., Kovacs W.J., 1995).

Другие ученые не обнаружили экспрессии AR на тимоцитах (Grossman C.J. et al., 1979; McCrudden A.V. et al., 1984). Напротив, выявлена слабая экспрессия мРНК гена AR в периферических Т-клетках (Vebo V.F. et al., 1999).

Выявлен 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). Снижение уровней эстрогенов и андрогенов приводит к феномену “тимусного омоложения”. Интересно, что возрастное снижение уровня стероидных половых гормонов способствует с одной стороны, поддержанию протективного иммунитета, с другой - увеличению вероятности развития аутоиммунных расстройств.

Доказательством прямого действия андрогенов на иммунокомпетентные клетки является то, что изменение функциональной активности Т-клеток может происходить в отсутствие вспомогательных клеток (в частности, АПК) (Lai J.-J. et al., 2012).

В целом, андрогены, обладают антипролиферативным действием на клетки иммунной системы. Общеизвестным является тот факт, что угнетающее действие андрогенов на пролиферацию Т-клеток может быть фактором, обеспечивающим низкую частоту аутоиммунных заболеваний у мужчин, нежели у женщин (Roden A.C. et al., 2004; Lai J.-J. et al., 2012). Еще в 1999 г. андрогены были предложены в качестве модуляторов баланса Th1/Th2 при формировании аутоиммунных реакций (Whitacre C.C., 1999).

Следует отметить, что супрессивные эффекты мужских половых гормонов, наряду с местной иммуносупрессивной средой и системной иммунной толерантностью у особей мужского пола, эволюционно направлены на поддержание статуса «иммунной привилегии» органов мужской репродуктивной системы (Zhao S. et al., 2014).

Некоторыми авторами показано, что для дегидроэпиандростерона и андростендиона характерно преобладание иммуносупрессивных глюкокортикоидоподобных эффектов (Grossman C.J. et al., 1994; Kincade P.W. et al., 2000). Эти андрогены, но не тестостерон, взаимодействуют с глюкокортикоидными

рецепторами благодаря высокой степени гомологичности между различными стероидами и их рецепторами (Blum M. et al., 1990; Grossman C J. et al., 1994).

В то же время показано, что для тестостерона характерны эффекты, аналогичные кортикостероидам. Его введение приводит к уменьшению лимфоидной ткани и силы иммунного ответа (Lai J.-J. et al., 2012; Zhao S. et al., 2014).

Показано, что половые стероидные гормоны обладают способностью регулировать уровни экспрессии цитокинов и их ингибиторов, белков острой фазы. Так, эстрогены и андрогены ингибируют продукцию IL-1 β и TNF α моноцитами и макрофагами. Тем не менее, в отличие от эстрогенов, андрогены стимулируют синтез «негативного» белка острой фазы - аполиipoproteина AI в печени, который на системном уровне блокирует контакт между моноцитами и Т-клетками (Burger D., Dayer J.M., 2002).

На сегодняшний день физиологическая роль дегидроэпиандростерона (DHEA) и дегидроэпиандростерон сульфата (DHEAS) не ограничивается сведениями об их превращении в *тестостерон* и *эстрадиол* и вызывает неподдельный интерес у исследователей (Pediaditakis I. et al., 2014). Выявлено, что дегидроэпиандростерон взаимодействует и модулирует активность мембранных и внутриклеточных нейротрансмиттеров и стероидных рецепторов (Stárka L. et al., 2014). Исследователями показано, что дегидроэпиандростерон защищает нервные клетки от апоптоза, взаимодействуя с TrkA, высокоаффинным рецептором фактора роста нервов (NGF)– нейтрофином. Авторы предполагают, что эволюционно, дегидроэпиандростерон действовал в качестве неспецифического нейротрофического фактора, способствующего выживаемости нейронов (Pediaditakis I. et al., 2014).

Предполагают участие дегидроэпиандростерона в регуляции иммунных реакций. Результаты исследований Rearte B. et al. (2013) показывают, что дегидроэпиандростерон и гормон с анти-глюкокортикоидными свойствами, ингибитор синтеза кортикостерона - метирапон (MET), играют важную роль в восстановлении адаптивного гуморального и клеточного иммунного ответа в LPS-иммуносупрессированных мышцах, подтверждая важную роль в этом процессе - эндогенных глюкокортикоидов (Rearte B. et al., 2013). Pratschke S. et al. (2014)

продемонстрировали, что DHEA играет решающую роль в поддержании баланса Th1/Th2 в ближайшем послеоперационном периоде после сложных абдоминальных операций. Авторы предполагают, что DHEA-индуцированное ослабление и Th1 и Th2 ответов имеют протективную роль (Pratschke S. et al., 2014).

С возрастом наблюдается снижение секреции DHEA как у людей (Hazeldine J. et al., 2010), так и у животных (Willis E.L. et al., 2014). Этот феномен именуется как «адренопауза» (Hazeldine J. et al., 2010).

Исследования последнего десятилетия свидетельствуют, что DHEA обладает иммуностимулирующими и анти-глюкокортикоидными эффектами. Способность DHEA регулировать иммунные реакции повышает интерес к его терапевтическому использованию для лечения иммунологических нарушений, возникающих у лиц с низкими циркулирующими уровнями. Это привело к попыткам восстановления нарушенного иммунного ответа у людей старшего возраста в ответ на вакцинацию и повышения эффективности регуляции иммунных реакций при аутоиммунных заболеваниях (Hazeldine J. et al., 2010). Показано, что доза DHEA в 200 мг достоверно снижала активность системной красной волчанки (Buvat J., 2003). В то же время некоторые авторы подчеркивают, что эпидемиологические исследования в современной литературе весьма противоречивы и не имеют пока достаточных клинических испытаний, доказывающих протективную роль DHEA у людей при патологии, а также безопасность его введения (Buvat J., 2003; Hazeldine J. et al., 2010; Willis E.L. et al., 2014).

Безусловно, с учетом вышесказанного, возникает необходимость более пристального изучения действия гормонов репродуктивной системы на отдельные компоненты иммунной системы. Понимание многогранного влияния половых стероидных гормонов на различные звенья иммунной системы чрезвычайно важно для определения тактики лечения различных дисгормональных нарушений, в частности, у женщин с аутоиммунными заболеваниями и риском их развития, прежде всего для определения в этих случаях показаний для заместительной гормональной терапии, возможности назначения оральных контрацептивов как с лечебной, так и с контрацептивной целью, и при отсутствии противопоказаний — выбор оптимальных препаратов, доз, режимов, путей их введения. Кроме того, следует учитывать влияние возрастных гормональных изменений на иммунную

систему: изменение уровня половых стероидов является одной из внешних причин старения иммунной системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, резюмируя вышесказанное, следует отметить, что к принципиальным отличиям системы адаптивного иммунитета от врожденного, относятся способность формировать иммунологическую память, клеточным субстратом которой являются Т- и В-клетки памяти. Наличие иммунологической памяти о встрече организма с антигеном лежит в основе протективного иммунитета. Главными медиаторами нейрогуморальной регуляции сложного механизма первичного и вторичного иммунного ответа являются гормоны, нейропептиды и нейромедиаторы. Относительно хорошо изучены эффекты некоторых гормонов на иммунную систему. В то же время, по мере накопления новых знаний о популяциях (клонах) клеток, участвующих в реализации иммунной памяти, вопрос о стероидной регуляции их функций остается малоизученным. Особенно это касается дозозависимых эффектов, что является принципиальным положением, поскольку уровень тех или иных гормонов достаточно лабилен и определяется как минимум возрастными и гендерными различиями. Становится очевидным, что установление тонких молекулярно-клеточных механизмов влияния стероидных гормонов на Т-клетки разной степени дифференцировки позволит расширить представления о регулирующих механизмах адаптивного иммунитета на разных этапах его реализации.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект и материал 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, имеющих разную степень дифференцировки (наивные – CD45RA⁺, 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).

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, тестостерона*) на функциональную активность Т-клеток разной степени дифференцировки. Дизайн исследования схематично представлен на **рисунке 3**.

В своей работе мы использовали *активационную модель*, которая отражает процесс взаимодействия Т-лимфоцитов разной степени дифференцировки с

ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ

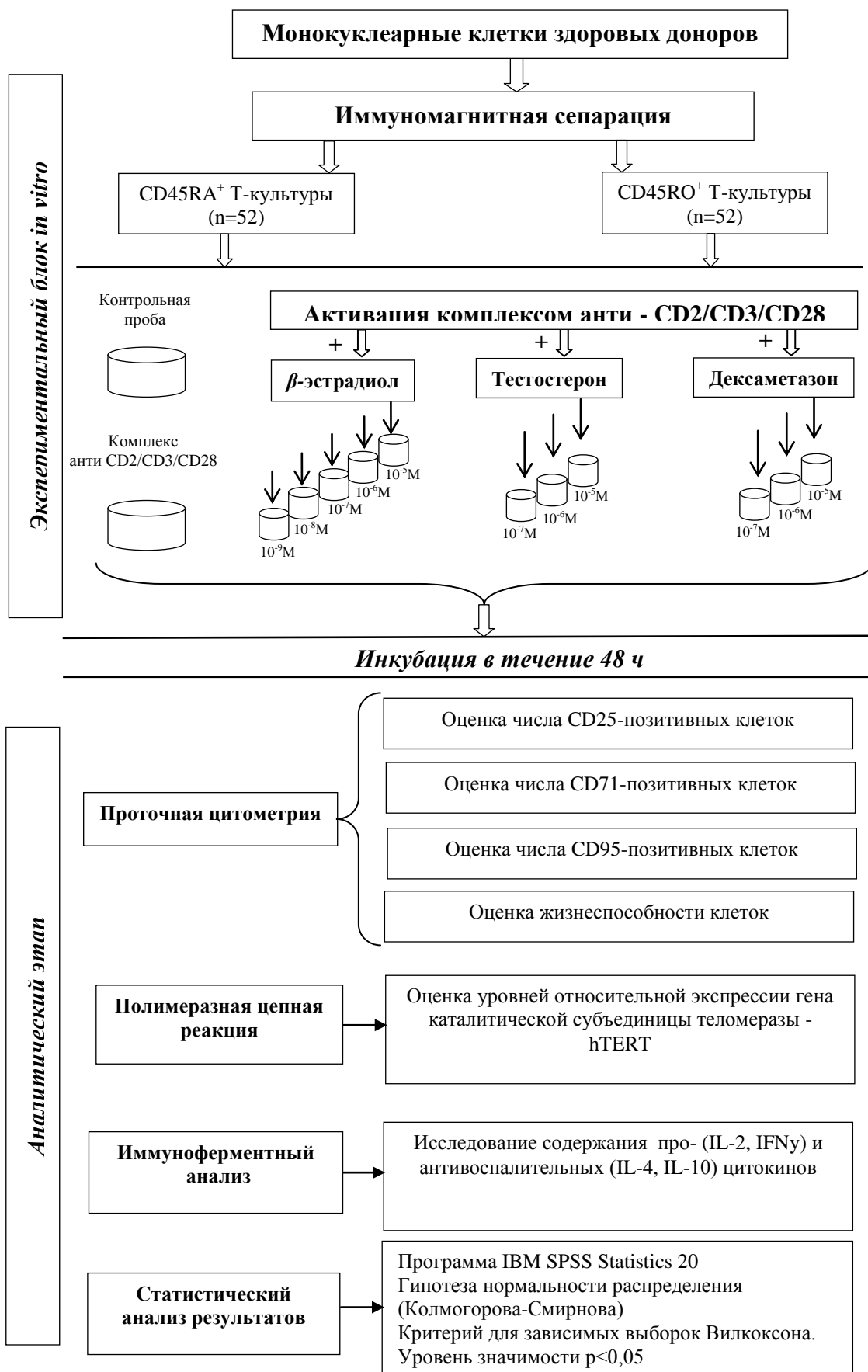


Рисунок 3. Схема дизайна исследования

антиген-презентирующими клетками (АПК) (активация Т-клеток через *CD2*, *CD3* и *CD28*).

Разработанная нами экспериментальная модель позволяет в строго контролируемых условиях исследовать разные аспекты функциональной деятельности Т-клеток памяти.

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) ($\rho=1,077$ г/см³) (Натвиг Дж. и соавт., 1980). 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 г/см³) 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 доводили фосфатно-солевым буфером (с 0,5% BSA «Miltenyi Biotec», Германия) до 1 мл и в дальнейшем использовали для выделения фракций CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-лимфоцитов.

2.2.2. Выделение «наивных» (CD45RA⁺) и «примированных» (CD45RO⁺) Т-лимфоцитов из фракции мононуклеарных лейкоцитов методом иммуномагнитной сепарации

Принцип метода: Для получения монокультур наивных Т-клеток (CD45RA) и Т-клеток памяти (CD45RO) из МНК был использован метод иммуномагнитной сепарации (ИМС), в основе которого лежит технология MACS® («Miltenyi Biotec» Германия). Технология MACS основана 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 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 4).

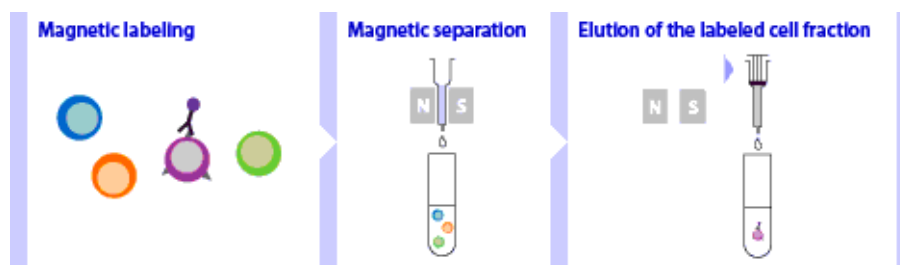


Рисунок 4. Позитивная иммуномагнитная селекция

Для избавления смеси мононуклеаров от CD14⁺-клеток (моноцитов) был использован метод негативной иммуномагнитной селекции с применением автоматического магнитного сепаратора AutoMACS Pro Separator Instrument («Miltenyi Biotec», Германия) и моноклональных антител к CD14⁺ 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⁺ (MicroBeads human, «Miltenyi Biotec», Германия), согласно протоколу производителя. Суспензию с магнитными частицами инкубировали 15 мин в темноте при +4⁰С. 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 CD45RO⁺ и CD45RA⁺ Т-клеток, в дальнейшем, использовали *негативную фракцию*, которую центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин. Далее сливали надосадочную жидкость и добавляли в пробирку 80 мкл буфера и 20 мкл магнитных частиц к CD45RO⁺ (MicroBeads human, «Miltenyi Biotec», Германия). Для позитивной селекции CD45RO⁺ Т-лимфоцитов повторяли процедуру, аналогичную для CD14⁺ клеток.

Полученные пробирки с позитивной фракцией, содержащей CD45RO⁺ и негативной фракцией, центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин. Сливали надосадочную жидкость и добавляли в пробирку, содержащую CD45RO⁺-лимфоциты среду Искова, а в пробирку с негативной клеточной фракцией - 80 мкл буфера и 20 мкл магнитных частиц к CD45RA⁺ (MicroBeads human, «Miltenyi Biotec», Германия). Для позитивной селекции CD45RA⁺CD62L⁺ Т-лимфоцитов повторяли процедуру, аналогичную для CD45RO⁺ клеток, используя микс магнитных частиц к CD45RA и CD62L (MicroBeads human, «Miltenyi Biotec», Германия).

Выделенные методом автоматической иммуномагнитной сепарации клетки с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺ и CD45RO⁺, помещали в бессывороточную культуральную среду Искова, объемом 1 мл. 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 (рисунок 5).

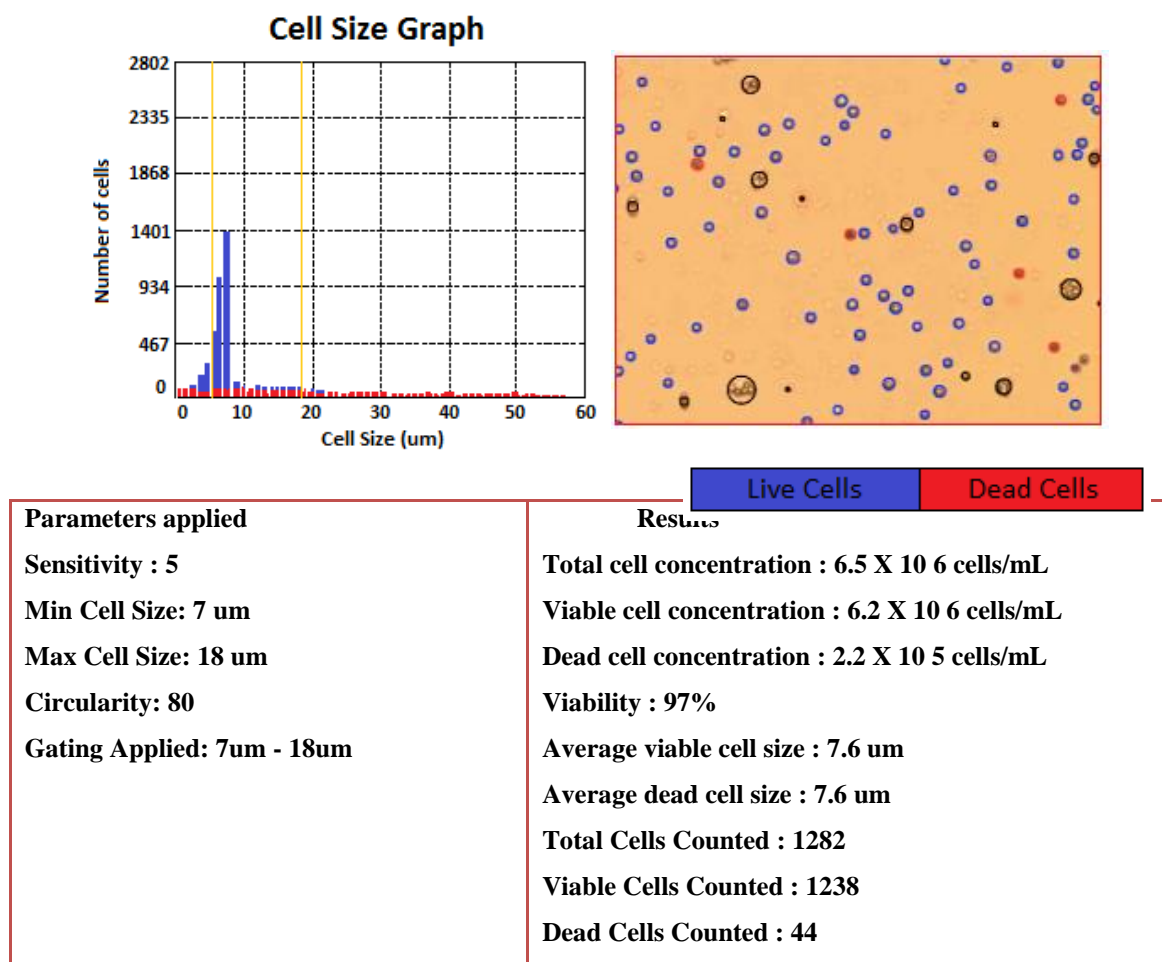


Рисунок 5. Количество живых и мёртвых клеток в культуре CD45RO⁺ Т-лимфоцитов

Отсутствие примесей моноцитов (CD14⁺) и В-лимфоцитов (CD19⁺) в культурах CD45RA⁺- и CD45RO⁺ 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. Использовали клеточные культуры, содержание CD3⁺CD45RA⁺CD14⁻CD19⁻ и CD3⁺CD45RO⁺CD14⁻CD19⁻ клеток в которых, составляло, в среднем 97,5 ± 2,12% (рис.).

2.2.3. Культивирование Т-клеток разной степени дифференцировки (CD45RO⁺ и CD45RA⁺)

CD45RA⁻ и CD45RO⁺ Т-клетки (1×10^6 кл/мл) культивировали в 48-луночном планшетах в бессывороточной среде Искова («Sigma-Aldrich», США), содержащей 0.5% сывороточного альбумина человека («Микроген», Россия), 5×10^{-5} М β-меркаптоэтанола («Acros Organics», США) и 30 мкг/мл гентамицина в течение 48 ч при 37⁰С, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂.

В эксперименте были использованы разные концентрации стероидных гормонов: дексаметазон («KRKA», Словения), тестостерон (Sigma, USA) и β-эстрадиол (Sigma, USA), и Т-клеточный активатор.

В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали реагент T-Cell Activation/Expansion Kit human (Ac/Exp) («Miltenyi Biotec», Германия), который представляет собой анти-биотиновые MACSiBeadTM частицы с биотинилированными антителами против CD2⁺, CD3⁺, CD28⁺. Реагент Ac/Exp добавляли в пробы в количестве 5 мкл, которые содержали - $0,5 \times 10^6$ анти-биотиновых MACSiBeadTM частиц. Соотношение клеток и активирующих частиц составило 1:2 (рисунок 6).

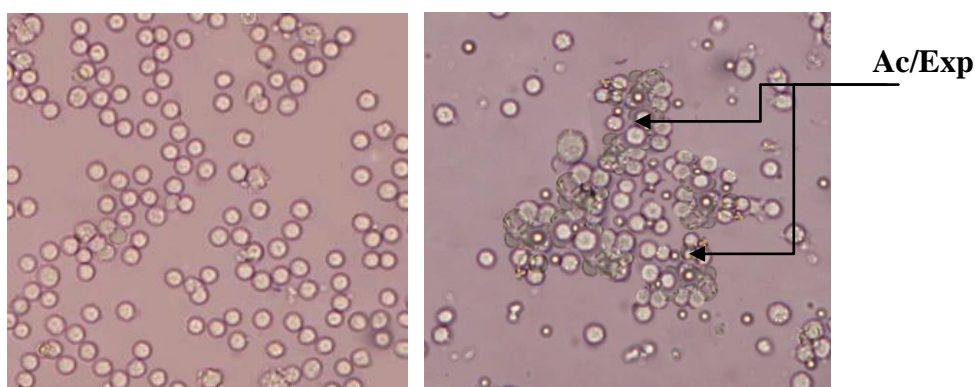


Рисунок 6. Культуры CD45RO⁺-лимфоцитов без (А) и с добавлением (Б) Т-клеточного активатора (Ac/Exp).

Нагруженные антителами анти-биотиновые частицы MACSiBeadTM используются в качестве имитации АПК и активации покоящихся Т-клеток.

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^{-7} - 10^{-5} М);
- 5) пробы с добавлением Ac/Exp и β -эстрадиола (10^{-9} - 10^{-5} М) (рис.).

2.2.4. Определение общего числа клеток (в мл) и количества жизнеспособных лимфоцитах в культурах CD45RA и CD45RO+ 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 Т-лимфоцитов разной степени дифференцировки, 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 подсчёт числа клеток в исследуемых клеточных культурах проводили с использованием программы «Guava ViaCount» (Millipore, США), методом проточной лазерной цитометрии на проточном цитометре «Guava EasyCite Plus» (Millipore, США), согласно протоколу производителя (**рисунок 7**).

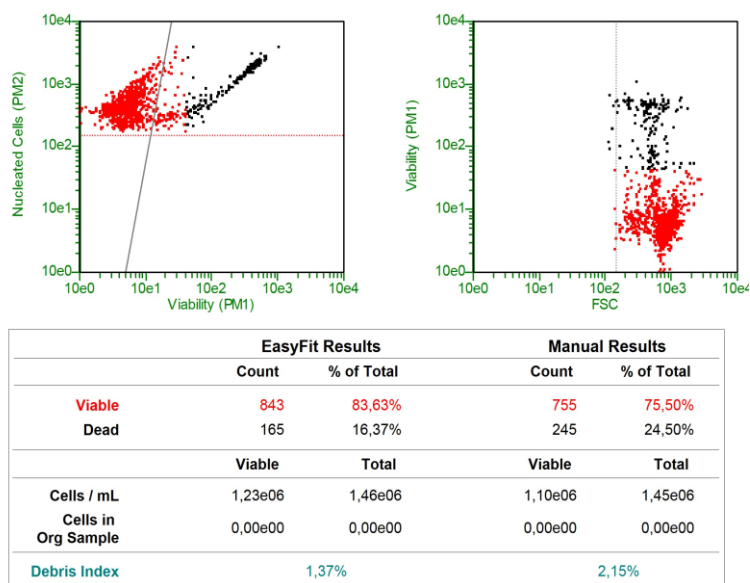


Рисунок 7. Стандартный протокол с использованием реагента и одноименной программы «GuavaViacount» (Millipore, USA).

2.2.5. Определение поверхностных маркеров CD25, CD71, CD95 на Т-клетках разной степени дифференцировки 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 коктейля моноклональных антител к CD45(ViaBlue); CD25(FITC), CD71(APC), CD95(PE) («eBioscience», USA), приготовленного *ex temporo*.

После культивирования, образцы тщательно ресуспендировали. 50 мкл клеточной взвеси переносили в микроцентрифужные пробирки (типа эппендорф) и вносили 9 мкл коктейля моноклональных антител (рН=7,4). Инкубирование осуществляли в течение 30-45 мин в темноте при температуре 4⁰С. 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).

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 $CD45RA^+$ и $CD45RO^+$ Т-клеток).

2.2.6. Определение содержания концентрации про- (IL-2, IFN γ) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) в супернатантах клеточных культур CD45RA $^+$ и CD45RO $^+$ Т-клеток

Для определения концентрации про- (IL-2, IFN γ) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) в супернатантах клеточных культур $CD45RA^+$ и $CD45RO^+$ Т-клеток использовали твердофазный иммуноферментный «сэндвичевый» метод (ELISA).

Принцип метода. Суть метода заключается в связывании молекул цитокина с адсорбированными в ячейках планшета антителами. Данный комплекс взаимодействует с конъюгатом, связанным с биотином, избыток которого в последующем удаляется после инкубации при промывке. К сорбированным на твердой фазе комплексам «цитокин-антитело» добавляется субстратный раствор, позволяющий образовывать окрашенный комплекс. Реакция останавливается добавлением кислоты. Оптическая плотность раствора пропорциональна концентрации определяемого вещества и регистрируется колориметрически.

Ход определения. Во все лунки иммунологического планшета вносили по 100 мкл раствора для разведения образцов, затем добавляли по 100 мкл «0 дозы», стандартов, контролей и образцы плазмы. Инкубировали планшет при 37°C при интенсивном помешивании (700 об/мин) в течение 2 ч.

Не связавшийся материал удалялся 5-кратным циклом отмывки на автоматическом вошере. В последующем добавляли по 100 мкл рабочего раствора конъюга №1 (антитела к IL-6 или TNF α человека с биотином) во все лунки и инкубировали в течение 1 часа при тех же условиях.

Несвязавшийся конъюгат удаляли 5-кратным циклом отмывки на автоматическом вошере. Далее добавляли по 100 мкл рабочего раствора

конъюгата №2 (стрептавидин с пероксидазой хрена) в каждую лунку и инкубировали в течение 30 мин при тех же условиях.

Субстратный раствор тетраметилбензидина (ТМБ) вносили в количестве 100 мкл после 5-кратной промывки и инкубировали в темноте в течение 30 мин. при температуре 18-25°C. Реакцию останавливали добавлением в ячейки раствора 0,5 М серной кислоты (стоп-реагент).

Процедуру выполнения иммуноферментного анализа проводили согласно инструкциям, предлагаемым производителями тест-систем («Вектор Бест» Россия) на автоматическом иммуноферментном анализаторе Lasurit (Dyplex Technologies, США).

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. Растворяли полученную РНК в 100 мкл воды, свободной от РНКаз и ДНКаз. Концентрацию полученной РНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoVue Plus («GE Healthcare», США).

Полученный образец был заморожен при -80°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 мкМ) (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°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 специфичного зонда TaqMan («Евроген», Россия).

Принцип метода реализуется за счет добавления в реакционную смесь, флуоресцирующих зондов комплиментарных 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'-экзонуклеазной 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.

Последовательность олигонуклеотидных праймеров указана в **таблице 3**.

Для проведения полимеразно-цепной реакции использовали реагенты qPCRmixHS («Евроген», Россия), зонды TaqMan («Бигль», Россия) и праймеров («Бигль», Россия), в концентрации 10 пМ. В качестве матрицы использовали 5 мкл кДНК, в качестве референсного гена – ген RPLPO.

Таблица 3. Нуклеотидная последовательность праймеров и проб

TERT_for	5'-TGACACCTCACCTCACCCAC-3'
TERT_rev	5'-CACTGTCTTCCGCAAGTTCAC-3'
RPLPO_for	5'-GGCGACCTGGAAGTCCAAC-3'

RPLPO_rev	5'-CCATCAGCACACCACAGCCTTC-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.

Температура плавления продукта амплификации определялась индивидуально для каждой пары праймеров, при анализе кривой плавления.

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

Расчеты уровней относительной экспрессии исследуемых генов производили с помощью модифицированной формулы Пфаффла 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 (Δ) точек пересечения (CP) неизвестного образца по сравнению с контрольным ($\Delta CP = CP_{\text{исследуемого образца}} - CP_{\text{контрольного образца}}$).

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 средневыборочные характеристики: Рассчитывали среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (σ). Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали критерий для зависимых выборок Вилкоксона. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ (Кремер Н.Ш., 2004).

Таблица 4. Распределение экспериментальных клеточных моделей *in vitro* в соответствии с использованными методами исследования (число культур/число проб)

Методы исследования	Условия культивирования	Экспериментальные клеточные модели	
		CD45RA ⁺	CD45RO ⁺
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 ⁻⁵ M) Ac/Exp + Dex (10 ⁻⁶ M) Ac/Exp + Dex (10 ⁻⁷ M) Ac/Exp + Test (10 ⁻⁵ M) Ac/Exp + Test (10 ⁻⁶ M) Ac/Exp + Test (10 ⁻⁷ M) Ac/Exp + Est (10 ⁻⁵ M) Ac/Exp + Est (10 ⁻⁶ M) Ac/Exp + Est (10 ⁻⁷ M) Ac/Exp + Est (10 ⁻⁸ M) Ac/Exp + Est (10 ⁻⁹ M)	52/676	52/676
Определение числа CD25-позитивных клеток (молекула активации) методом проточной цитометрии		52/676	52/676
Определение числа CD71-позитивных клеток (молекула пролиферации) методом проточной цитометрии		52/676	52/676
Определение числа CD95-позитивных клеток (молекула апоптоза) методом проточной цитометрии		52/676	52/676
Определение содержания концентрации про- (IL-2, IFN γ) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) в супернатантах клеточных культур методом иммуноферментного анализа		52/676	52/676
Определение относительного уровня экспрессии мРНК гена каталитической субъединицы теломеразы – hTERT методом полимеразно-цепной реакции		52/676	52/676

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1.1. Оценка эффектов стероидных гормонов (дексаметазон, β -эстрадиол, тестостерон) на жизнеспособность и общее количество клеток ($10^6/\text{мл}$) в культурах активированных Т-лимфоцитов, имеющих разную степень дифференцировки

Для нормального функционирования иммунной системы необходимо равновесие между пролиферацией иммунокомпетентных клеток и их гибелью. Сдвиг этого равновесия считается одним из факторов, приводящих к развитию патологических процессов (Elmore S., 2007; Жукова О.Б., 2006; Литвинова и соавт., 2007, 2013).

Общее количество клеток в *интактных культурах* CD45RA^+ - и CD45RO^+ - Т-лимфоцитов после окончания срока культивирования (48 ч) составляло, в среднем $(1.08 \pm 0.09) \times 10^6$ кл/мл (рисунок 8).

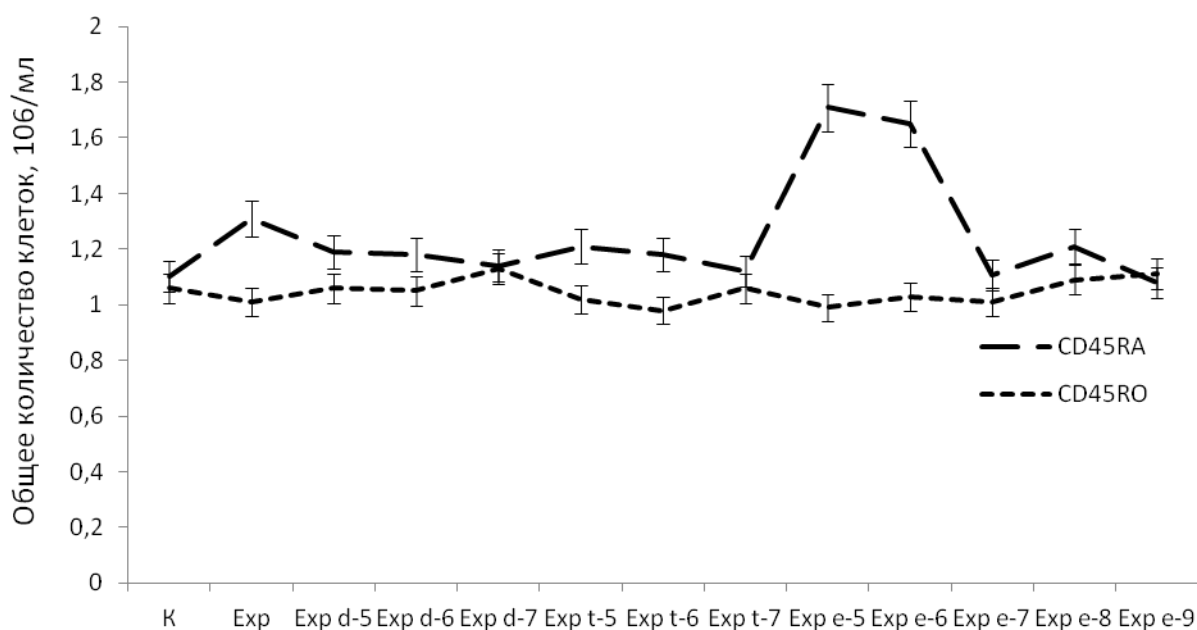


Рисунок 8. Общее количество клеток ($10^6/\text{мл}$) в культурах мононуклеарных клеток (МНК) и CD45RA^+ - и CD45RO^+ -лимфоцитов в условиях культивирования *in vitro* с добавлением стероидных гормонов в различной концентрации; К – количество клеток в контрольной пробе; Exp – с Т-клеточным активатором; Exp d-5–d-7 – в клеточных культурах с Т-клеточным активатором и дексаметазоном (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} М); Exp t-5–t-7 – в клеточных культурах с Т-клеточным активатором и тестостероном (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} М); Exp e-5–e-9 – в клеточных культурах с Т-клеточным активатором и β -эстрадиолом (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} М).

Инкубация Т-лимфоцитов с комплексом анти-CD2/CD3/CD28, имитирующим действие антиген-презентирующих клеток, сопровождалась повышением числа клеток в культурах CD45RA⁺ Т-лимфоцитов, в среднем, на 22%. Добавление в культуры наивных клеток комбинаций активатора и β-эстрадиола (10⁻⁵ и 10⁻⁶ М) сопровождалось увеличением их числа, в среднем, на 30%. Дексаметазон и тестостерон в широком диапазоне концентраций не оказывали значимого влияния на общее число клеток (в мл) в культурах CD45RA⁺ Т-лимфоцитов (**рисунок 8**). Добавление активатора, а также всех гормонов в диапазоне используемых концентраций, не изменяло числа CD45RO Т-клеток (**рисунок 8**).

Анализ жизнеспособности лимфоцитов показал, что число живых лимфоцитов в культурах CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-лимфоцитов было равным - 76,70±2,58%, в - 69,71±2,74%, соответственно (**рисунок 9**).

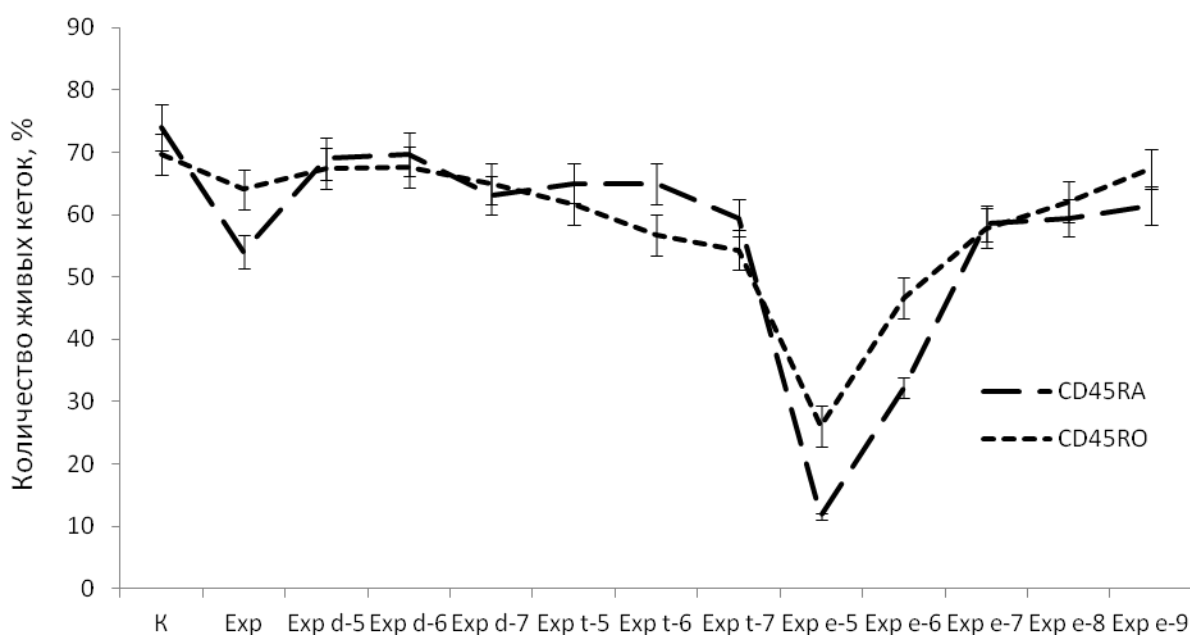


Рисунок 9. Содержание живых клеток (%) в культурах CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-лимфоцитов в условиях культивирования *in vitro* с добавлением стероидных гормонов в различной концентрации. К – количество живых клеток в контрольной пробе; Exp – с Т-клеточным активатором; Exp d-5–d-7 – в клеточных культурах с Т-клеточным активатором и дексаметазоном (10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ М); Exp t-5–t-7 – в клеточных культурах с Т-клеточным активатором и тестостероном (10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ М); Exp e-5–e-9 – в клеточных культурах с Т-клеточным активатором и β-эстрадиолом (10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹ М).

Инкубация CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-клеток с активатором Ас/Ехр, приводила к статистически значимому уменьшению числа живых лимфоцитов по сравнению с интактными образцами. В большей степени, активатор снижал жизнеспособность CD45RA⁺ Т-клеток (в среднем на 25%).

Добавление дексаметазона в концентрациях 10⁻⁵ и 10⁻⁶ М к культурам активированных CD45RA⁺-лимфоцитов снижало негативный эффект активации, способствуя увеличению числа живых клеток. Более низкие концентрации гормона значимого эффекта не оказывали (**рисунок 9**). На популяцию CD45RO⁺ Т-клеток, дексаметазон оказывал аналогичное действие, способствуя увеличению числа живых клеток.

Тестостерон (10⁻⁶ и 10⁻⁷ М) снижал общее число живых клеток в культурах клеток с фенотипом CD45RO⁺ и не влиял существенно на жизнеспособность активируемых CD45RA⁺ Т-лимфоцитов (**рисунок 9**).

Интересно, что в отличие от дексаметазона и тестостерона, β-эстрадиол в концентрации 10⁻⁵ и 10⁻⁷ М резко снижал содержание живых клеток в культурах CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-клеток ($p < 0,001$). Более выраженным эффект был в случае CD45RA⁺-клеток. В более низких концентрациях Est (10⁻⁸-10⁻⁹М) существенно не влиял на жизнеспособность культивируемых лимфоцитов ($p > 0,05$) (**рисунок 9**).

1.2. Оценка эффектов стероидных гормонов (дексаметазон, β-эстрадиол, тестостерон) на мембранную экспрессию молекул ранней активации (CD25), пролиферации (CD71) и апоптоза (CD95) активированными Т-лимфоцитами с разной степенью дифференцировки

1.2.1. Мембранная экспрессия молекулы ранней активации CD25

Молекула CD25 представляет собой α-цепь рецептора IL-2 и является «ранним» маркером активации лимфоцитов (Гуцол А.А. и соавт., 2013; Литвинова Л.С. и соавт., 2014; Berridge M. J., 1997; Lin J., Weiss A., 2001; Graca L., Cobbold S.P., 2002).

По окончании срока инкубации (через 48 ч), в интактных пробах количество CD45RA⁺ и CD45RO⁺ клеток, экспрессирующих на своей мембране молекулу активации - CD25, составляло, в среднем, 7,16±3,44 и 8,43±2,11%, соответственно.

Культивирование с активатором приводило к увеличению исследуемого показателя в среднем в 5 раз в обеих популяциях Т-клеток ($p_0 < 0,05$) (таблица 5).

Дексаметазон в концентрациях 10^{-5} и 10^{-6} М способствовал снижению количества лимфоцитов $CD45RA^+CD25^+$ на 48 и 26%, соответственно ($p_1 < 0,05$). В популяции $CD45RO^+$ Т-клеток, количество $CD25$ -позитивных лимфоцитов также уменьшалось по сравнению с пробой с добавлением Ас/Ехр (на 34%, $p_1 < 0,05$) только при использовании максимальной концентрации гормона 10^{-5} М (таблица 5).

Таблица 5. Содержание $CD25$ – позитивных клеток (%) в культурах $CD45RA^+$ и $CD45RO^+$ Т-лимфоцитов, культивируемых с Т-клеточным активатором (Ас/Ехр) и разными концентрациями гормонов: дексаметазона (Dex), тестостерона (Test) и β -эстрадиола (Est) ($M \pm \sigma$)

Варианты культивирования	Число $CD25^+$ клеток (%)	
	$CD45RA^+$	$CD45RO^+$
Интактная проба	7,16 ± 3,44	8,43 ± 2,11
+ Ас/Ехр	44,13 ± 8,21 $p_0 < 0,05$	39,41 ± 7,32 $p_0 < 0,05$
Ас/Ехр + Dex (10^{-5} М)	22,91 ± 4,54 $p_1 < 0,05$	29,37 ± 5,16 $p_1 < 0,05$
Ас/Ехр + Dex (10^{-6} М)	32,54 ± 6,01 $p_1 < 0,05$	36,22 ± 9,18
Ас/Ехр + Dex (10^{-7} М)	38,15 ± 8,21	37,93 ± 5,90
Ас/Ехр + Test (10^{-5} М)	24,85 ± 6,11 $p_1 < 0,05$	18,93 ± 3,23 $p_1 < 0,05$
Ас/Ехр + Test (10^{-6} М)	28,75 ± 5,35 $p_1 < 0,05$	35,51 ± 9,13
Ас/Ехр + Test (10^{-7} М)	27,04 ± 3,41 $p_1 < 0,05$	38,01 ± 6,49
Ас/Ехр + Est (10^{-5} М)	32,6 ± 6,76 $p_1 < 0,05$	28,1 ± 4,19 $p_1 < 0,05$
Ас/Ехр + Est (10^{-6} М)	29,31 ± 7,54 $p_1 < 0,005$	19,93 ± 3,24 $p_1 < 0,05$
Ас/Ехр + Est (10^{-7} М)	25,78 ± 4,82 $p_1 < 0,05$	22,23 ± 5,03 $p_1 < 0,05$
Ас/Ехр + Est (10^{-8} М)	39,23 ± 6,51 $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$ $p_4 < 0,05$	42,18 ± 6,23 $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$ $p_4 < 0,05$

Ac/Exp + Est (10⁻⁹ M)	41,29 ± 8,16	37,22 ± 6,15
	p ₂ <0,05	p ₂ <0,05
	p ₃ <0,05	p ₃ <0,05
	p ₄ <0,05	p ₄ <0,05

Здесь и в сл. таблицах:

p₀ - 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)/ Ac/Exp + Est (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)/ Ac/Exp + Est (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)

Тестостерон 10⁻⁵-10⁻⁷ M способствовал снижению относительного числа CD25-позитивных CD45RA⁺ лимфоцитов (**таблица 5**). При добавлении тестостерона в пробы CD45RO⁺ Т-лимфоцитов, снижение числа CD25⁺-клеток регистрировалось лишь при действии максимальной концентрации мужского гормона (10⁻⁵ M) (p₁<0,05) (**таблица 5**).

β-эстрадиол равномерно (независимо от концентрации), подавлял экспрессию молекулы активации CD25 как в популяции CD45RA⁺ Т-клеток, так и в культурах Т-клеток памяти (**таблица 5**). Более выраженным эффект был в случае CD45RO⁺ Т-клеток.

В более низких концентрациях (10⁻⁸ - 10⁻⁹ M) β-эстрадиол не оказывал влияния на экспрессию молекулы активации – CD25 как наивными, так и примированными Т-лимфоцитами.

Т.о., этап ранней активации CD45RA⁺ лимфоцитов, ассоциированный с мембранной экспрессией молекулы CD25 (α-цепь рецептора IL-2), оказался более чувствительным к угнетающему действию дексаметазона и тестостерона, чем у CD45RO⁺ Т-клеток. Супрессивный эффект β-эстрадиола, в отношении мембранной экспрессии молекулы CD25, в большей степени, затрагивал CD45RO⁺ Т-лимфоциты.

1.2.2. Мембранная экспрессия молекулы пролиферации CD71

Молекула CD71 представляет собой рецептор к трансферрину и, как правило, экспрессируется на пролиферирующих клетках (Литвинова Л.С. и соавт., 2014).

В нестимулированных пробах Т-лимфоцитов, имеющих разную степень дифференцировки, количество CD45RA⁺CD71⁺ и CD45RO⁺CD71⁺ Т-клеток составляло 23,78±2,06% и 20,62±2,11%, соответственно. Активация клеток приводила к увеличению данного показателя в 1.5 раза в обеих популяциях Т-лимфоцитов ($p_0 < 0,05$).

Добавление дексаметазона способствовало снижению числа CD71⁺-лимфоцитов в культурах CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-клеток, в среднем, на 30% ($p_1 < 0,05$). Интересным является тот факт, что в популяции наивных CD45RA⁺ Т-клеток данный эффект наблюдался только при относительно высокой концентрации Dex 10^{-5} М ($p_1 < 0,05$), в то время как в CD45RO⁺ культуре - во всем исследуемом диапазоне концентраций - 10^{-5} - 10^{-7} М ($p_1 < 0,05$) (таблица 6).

Таблица 6. Содержание CD71 – 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)

Варианты культивирования	Число CD71+ клеток (%)	
	CD45RA ⁺	CD45RO ⁺
Интактная проба	23,78 ± 2,06	20,62 ± 2,11
+ Ac/Exp	32,05 ± 6,43 $p_0 < 0,05$	30,42 ± 6,12 $p_0 < 0,05$
Ac/Exp + Dex (10^{-5} М)	22,54 ± 1,28 $p_1 < 0,05$	19,94 ± 3,12 $p_1 < 0,05$
Ac/Exp + Dex (10^{-6} М)	28,99 ± 3,11	23,69 ± 5,15 $p_1 < 0,05$
Ac/Exp + Dex (10^{-7} М)	30,95 ± 6,18	24,48 ± 2,13 $p_1 < 0,05$
Ac/Exp + Test (10^{-5} М)	23,76 ± 3,28 $p_1 < 0,05$	22,29 ± 2,11 $p_1 < 0,05$
Ac/Exp + Test (10^{-6} М)	25,44 ± 4,35 $p_1 < 0,05$	29,07 ± 5,20
Ac/Exp + Test (10^{-7} М)	29,93 ± 4,48 $p_1 < 0,05$	29,05 ± 3,09

Ac/Exp + Est (10^{-5} M)	58,76 ± 8,16 $p_1 < 0,05$	33,13 ± 6,78
Ac/Exp + Est (10^{-6} M)	61,45 ± 6,44 $p_1 < 0,05$	29,54 ± 1,98
Ac/Exp + Est (10^{-7} M)	30,43 ± 7,01 $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	30,72 ± 5,67
Ac/Exp + Est (10^{-8} M)	28,65 ± 6,08 $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	32,14 ± 6,54
Ac/Exp + Est (10^{-9} M)	33,44 ± 8,65 $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	35,75 ± 5,67

Тестостерон подавлял пролиферацию клеток в культуре наивных лимфоцитов в диапазоне концентраций 10^{-6} - 10^{-5} M, а в популяции CD45RO⁺ - только в присутствии максимальной концентрации гормона (10^{-5} M) (**таблица 6**).

β -эстрадиол в максимальных концентрациях (10^{-5} - 10^{-6} M), напротив, способствовал увеличению числа CD45RA⁺CD71⁺-лимфоцитов, в среднем, в 2 раза (по сравнению с пробой с добавлением только Ac/Exp). Эффекты β -эстрадиола не затрагивали экспрессию молекулы CD71 CD45RO⁺ T-клетками (**таблица 6**).

Т.о., пролиферативная активность CD45RA⁺ лимфоцитов, связанная с мембранной экспрессией молекулы CD71, более чувствительна к супрессивному действию тестостерона, и менее - к эффектам дексаметазона, чем CD45RO⁺ T-клетки. β -эстрадиол обладает активирующим эффектом на наивные клетки, что согласуется с его высоким проапоптогенным действием. Пролиферативная активность CD45RO⁺ T-лимфоцитов относительно резистентна к действию β -эстрадиола.

1.2.3. Мембранная экспрессия молекулы апоптоза CD95

Молекула CD95 (APO-1, Fas) одна из наиболее значимых маркеров, определяющих готовность лимфоцитов к запуску активационного апоптоза (Greil R. et al., 1998; Curtin J.F., Cotter T.G., 2003; Жукова О.Б., 2006).

Число наивных CD45RA⁺ и CD45RO⁺ T-клеток в контрольных пробах, несущих на своей поверхности маркер апоптоза CD95⁺ составило $7,12 \pm 2,06$ и $10,62 \pm 4,11\%$, соответственно (**таблица 7**). Добавление комплекса анти-

CD2/CD3/CD28 приводило к существенному увеличению числа CD95 – позитивных клеток в обеих культурах Т-клеток (в среднем, в 2,5 раза) (таблица 7).

Инкубация наивных и примированных Т-клеток с дексаметазоном, отменяло апоптоз-индуцирующее действие Т-активатора независимо от степени их дифференцировки (таблица 7).

Таблица 7. Содержание CD95 – 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)

Варианты культивирования	Число CD95+ клеток (%)	
	CD45RA ⁺	CD45RO ⁺
Интактная проба	7,12 ± 2,06	10,62 ± 4,11
+ Ac/Exp	18,23 ± 6,15 p ₀ <0,05	22,16 ± 5,11 p ₀ <0,05
Ac/Exp + Dex (10⁻⁵ M)	12,14 ± 3,21 p ₁ <0,05	13,21 ± 4,34 p ₁ <0,05
Ac/Exp + Dex (10⁻⁶ M)	13,28 ± 2,11 p ₁ <0,05	10,29 ± 2,13 p ₁ <0,05
Ac/Exp + Dex (10⁻⁷ M)	10,26 ± 3,12 p ₁ <0,05	12,36 ± 4,33 p ₁ <0,05
Ac/Exp + Test (10⁻⁵ M)	15,43 ± 4,54	34,21 ± 6,15 p ₁ <0,05
Ac/Exp + Test (10⁻⁶ M)	12,45 ± 2,31	32,34 ± 2,99 p ₁ <0,05
Ac/Exp + Test (10⁻⁷ M)	14,32 ± 4,39	30,42 ± 7,30 p ₁ <0,05
Ac/Exp + Est (10⁻⁵ M)	79,34 ± 10,23 p ₁ <0,05	62,14 ± 10,32 p ₁ <0,05
Ac/Exp + Est (10⁻⁶ M)	85,32 ± 6,29 p ₁ <0,05	75,39 ± 6,43 p ₁ <0,05
Ac/Exp + Est (10⁻⁷ M)	81,38 ± 7,13 p ₁ <0,05	72,11 ± 6,55 p ₁ <0,05
Ac/Exp + Est (10⁻⁸ M)	24,19 ± 7,21 p ₂ <0,05 p ₃ <0,05 p ₄ <0,05	28,32 ± 11,52 p ₂ <0,05 p ₃ <0,05 p ₄ <0,05
Ac/Exp + Est (10⁻⁹ M)	20,19 ± 6,72 p ₂ <0,05 p ₃ <0,05 p ₄ <0,05	23,14 ± 6,23 p ₂ <0,05 p ₃ <0,05 p ₄ <0,05

Тестостерон (10^{-5} - 10^{-7} М) не изменял количественные параметры CD45RA+CD95+ Т-лимфоцитов.

Напротив, мужской половой гормон (в широком диапазоне действующих концентраций) способствовал увеличению (в среднем, в 1,5 раза) числа CD45RO+CD95+ Т-лимфоцитов по сравнению с пробами только с добавлением активатора.

Выявлен четкий проапоптогенный эффект высоких концентраций β -эстрадиола (10^{-5} - 10^{-7} М) на активированные CD45RA+ и CD45RO+ Т-клетки (таблица 7). Концентрации гормона (10^{-8} - 10^{-9} М) не обладали проапоптогенным эффектом на Т-клетки: содержание CD95⁺ Т-лимфоцитов в культурах активированных клеток значимо не отличалось от аналогичных значений контрольных проб с добавлением только активатора.

1.3. Оценка влияния стероидных гормонов (дексаметазон, β -эстрадиол, тестостерон) на продукцию про- (IL-2, IFN γ) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов активированными Т-лимфоцитами разной степенью дифференцировки

Продукция IL-2

Через 48 ч инкубации в интактных пробах CD45RA⁺ Т-лимфоцитов содержание IL-2 в супернатантах клеточных культур было в 6,5 раз меньше, чем в популяции CD45RO⁺ Т-клеток (таблица 8).

Добавление Т-клеточного активатора способствовало значительному увеличению концентрации IL-2 в среде культивирования: в популяции CD45RA+ Т-лимфоцитов – в 53 раза ($p_0 < 0.05$), а в культуре Т-клеток памяти – в 8.6 раз ($p_0 < 0.05$). Дексаметазон в концентрации 10^{-5} М снижал исследуемый показатель в активируемых культурах CD45RA⁺ и CD45RO⁺ клеток на 52 и 32%, соответственно. Меньшие концентрации гормона значимого эффекта не оказывали (таблица 8).

Тестостерон, независимо от концентрации, равномерно (в среднем, в 1,4 раза) подавлял продукцию IL-2 ($p_1 < 0,05$) CD45RA⁺ Т-лимфоцитами.

При добавлении тестостерона в культуры CD45RO⁺ лимфоцитов, снижение значений IL-2 регистрировалось лишь при действии максимальной концентрации мужского гормона (10⁻⁵ М) (p₁<0,05) (таблица 8).

Таблица 8. Количество IL-2 (пг/мл) в супернатантах CD45RA⁺ и CD45RO⁺ культур лимфоцитов, культивируемых с Т-клеточным активатором (Ac/Exp) и разными концентрациями гормонов дексаметазона (Dex), тестостерона (Test) и β-эстрадиола (Est) (M±σ)

Варианты культивирования	Количество IL-2 (пг/мл) в супернатантах клеточных культур	
	CD45RA ⁺	CD45RO ⁺
Интактная проба	12,72 ± 3,12	82,87 ± 10,13
+ Ac/Exp	684,9 ± 121,43 p ₀ <0,05	715,19 ± 98,34 p ₀ <0,05
Ac/Exp + Dex (10⁻⁵ М)	257,8 ± 190,4 p ₁ <0,05	482,58 ± 38,78 p ₁ <0,05
Ac/Exp + Dex (10⁻⁶ М)	533,1 ± 173,9	690,31 ± 49,56
Ac/Exp + Dex (10⁻⁷ М)	604,7 ± 187,1	680,18 ± 50,43
Ac/Exp + Test (10⁻⁵ М)	464,3 ± 106,1 p ₁ <0,05	565,21 ± 87,48 p ₁ <0,05
Ac/Exp + Test (10⁻⁶ М)	472,0 ± 98,5 p ₁ <0,05	679,83 ± 89,11
Ac/Exp + Test (10⁻⁷ М)	456,0 ± 112,8 p ₁ <0,05	681,64 ± 68,61
Ac/Exp + Est (10⁻⁵ М)	141,13 ± 12,61 p ₁ <0,05	234,45 ± 42,15 p ₁ <0,05
Ac/Exp + Est (10⁻⁶ М)	338,12 ± 89,01 p ₁ <0,005 p ₂ <0,001	353,12 ± 62,71 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05
Ac/Exp + Est (10⁻⁷ М)	480,67 ± 56,83 p ₁ <0,05 p ₂ <0,001 p ₃ <0,05	415,34 ± 45,03 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₃ <0,05
Ac/Exp + Est (10⁻⁸ М)	590,93 ± 89,22 p ₂ <0,05 p ₃ <0,05 p ₄ <0,05	709,33 ± 79,23 p ₂ <0,05 p ₃ <0,05 p ₄ <0,05
Ac/Exp + Est (10⁻⁹ М)	634,39 ± 57,39 p ₂ <0,05 p ₃ <0,05 p ₄ <0,05	721,32 ± 102,33 p ₂ <0,05 p ₃ <0,05 p ₄ <0,05

β -эстрадиол в концентрациях 10^{-5} - 10^{-7} М оказывал выраженное супрессивное действие на уровень продукции IL-2 в обеих популяциях Т-лимфоцитов (**таблица 8**). Действие β -эстрадиола на продукцию IL-2 наивными и примированными Т-лимфоцитами носило выраженный дозозависимый характер.

В более низких концентрациях (10^{-8} - 10^{-9} М), β -эстрадиол не влиял на секрецию IL-2 наивными и примированными Т-лимфоцитами.

Продукция IFN γ

Содержание IFN γ в интактных культурах CD45RA⁺ и CD45RO⁺ было равным $9,13 \pm 3,41$ и $16,58 \pm 3,21$ пг/мл, соответственно.

Инкубация CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-клеток с активатором увеличивала продукцию IFN γ , в среднем, более, чем в 25 раз по сравнению со спонтанным уровнем ($p < 0,05$).

Дексаметазон оказывал угнетающее действие на продукцию IFN γ наивными CD45RA⁺ Т-клетками. Его эффекты были дозозависимы. Активированные CD45RO⁺ Т-клетки были чувствительны только к действию максимальной концентрации гормона (10^{-5} М) ($p < 0,05$).

Тестостерон в широком диапазоне концентраций не оказывал значимого влияния на исследуемый параметр ($p > 0,05$) (**таблица 9**).

Эффекты β -эстрадиола на продукцию 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^{-6} и 10^{-9} М), напротив – стимулирующий, повышая продукцию IFN γ , в среднем, в 1,5 раза (по сравнению с пробами только с добавлением активатора) (**таблица 9**).

Добавление женского полового гормона (10^{-5} и 10^{-7} М) в культуру активированных CD45RO⁺ Т-клеток памяти, дозозависимым образом угнетало продукцию IFN- γ ($p < 0,05$). Более низкие концентрации β -эстрадиола отменяли его супрессивный эффект.

Таблица 9. Количество IFN γ (пг/мл) в супернатантах CD45RA⁺ и CD45RO⁺ культур лимфоцитов, культивируемых с Т-клеточным активатором (Ac/Exp) и разными концентрациями гормонов дексаметазона (Dex), тестостерона (Test) и β -эстрадиола (Est) ($M \pm \sigma$)

Варианты культивирования	Количество IFN γ (пг/мл) в супернатантах клеточных культур	
	CD45RA ⁺	CD45RO ⁺
Интактная проба	9,13 \pm 3,41	16,58 \pm 3,21
+ Ac/Exp	486,46 \pm 89,34 $p_0 < 0,05$	492,44 \pm 78,33 $p_0 < 0,05$
Ac/Exp + Dex (10^{-5} M)	187,99 \pm 38,32 $p_1 < 0,05$	348,56 \pm 90,92 $p_1 < 0,05$
Ac/Exp + Dex (10^{-6} M)	240,62 \pm 9,91 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	476,42 \pm 103,21
Ac/Exp + Dex (10^{-7} M)	381,21 \pm 85,32 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	410,22 \pm 62,34 $p_1 < 0,05$
Ac/Exp + Test (10^{-5} M)	422,26 \pm 76,43	466,48 \pm 81,34
Ac/Exp + Test (10^{-6} M)	443,55 \pm 89,37	567,17 \pm 82,21
Ac/Exp + Test (10^{-7} M)	421,86 \pm 90,45	552,34 \pm 103,21
Ac/Exp + Est (10^{-5} M)	132,67 \pm 42,67 $p_1 < 0,05$	229,81 \pm 67,32 $p_1 < 0,05$
Ac/Exp + Est (10^{-6} M)	658,00 \pm 87,21 $p_1 < 0,005$ $p_2 < 0,001$	352,36 \pm 45,64 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
Ac/Exp + Est (10^{-7} M)	727,52 \pm 104,45 $p_1 < 0,005$ $p_2 < 0,001$	431,32 \pm 78,32 $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
Ac/Exp + Est (10^{-8} M)	629,00 \pm 90,66 $p_1 < 0,005$ $p_2 < 0,05$	503,22 \pm 84,12 $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
Ac/Exp + Est (10^{-9} M)	731,23 \pm 101,620 $p_1 < 0,005$ $p_2 < 0,05$	489,43 \pm 98,22 $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$

Далее мы оценивали влияние стероидных гормонов на продукцию CD45RO⁺-клетками медиаторов, обладающих противовоспалительным действием – IL-4 и IL-10.

Продукция IL-4

Содержание IL-4 в супернатантах клеточных культур (в интактных образцах) CD45RA⁺ Т-лимфоцитов было более чем в 4,5 раза ниже аналогичных значений в культурах CD45RO⁺-клеток (таблица 10).

Таблица 10. Количество IL-4 (пг/мл) в супернатантах CD45RA⁺ и CD45RO⁺ культур лимфоцитов, культивируемых с Т-клеточным активатором (Ac/Exp) и разными концентрациями гормонов дексаметазона (Dex), тестостерона (Test) и β-эстрадиола (Est) (M±σ)

Варианты культивирования	Количество IL-4 (пг/мл) в супернатантах клеточных культур	
	CD45RA ⁺	CD45RO ⁺
Интактная проба	0,9 ± 0,01	4,36 ± 0,90
+ Ac/Exp	6,85 ± 2,23 p ₀ <0,05	69,43 ± 15,99 p ₀ <0,05
Ac/Exp + Dex (10⁻⁵ M)	4,39 ± 1,31 p ₁ <0,05	12,61 ± 3,22 p ₁ <0,05
Ac/Exp + Dex (10⁻⁶ M)	6,25 ± 2,92	27,59 ± 6,45 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05
Ac/Exp + Dex (10⁻⁷ M)	8,08 ± 8,41	38,97 ± 10,31 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₃ <0,05
Ac/Exp + Test (10⁻⁵ M)	4,57 ± 1,71 p ₁ <0,05	26,14 ± 8,48 p ₁ <0,05
Ac/Exp + Test (10⁻⁶ M)	5,59 ± 2,51	56,50 ± 9,11 P ₂ <0,05
Ac/Exp + Test (10⁻⁷ M)	5,34 ± 0,88	68,55 ± 15,61 P ₂ <0,05
Ac/Exp + Est (10⁻⁵ M)	3,12 ± 0,01 p ₁ <0,05	22,45 ± 8,15 p ₁ <0,05
Ac/Exp + Est (10⁻⁶ M)	6,92 ± 1,01 p ₂ <0,001	59,12 ± 12,71 p ₂ <0,05
Ac/Exp + Est (10⁻⁷ M)	7,85 ± 1,83 p ₂ <0,001	67,45 ± 9,03 p ₂ <0,05
Ac/Exp + Est (10⁻⁸ M)	8,16 ± 2,67 p ₂ <0,05	58,16 ± 9,77 p ₂ <0,05
Ac/Exp + Est (10⁻⁹ M)	6,43 ± 1,96 p ₂ <0,05	63,12 ± 5,25 p ₂ <0,05

Концентрация IL-4 значительно возросла при инкубации CD45RA⁺ (в 7,6

раза) и CD45RO⁺-лимфоцитов (в 15,5 раз) с активатором Ac/Exp ($p_0 < 0,05$).

Эффект дексаметазона на продукцию IL-4 CD45RO⁺ Т-клетками имел супрессивный характер и зависел от концентрации гормона ($p < 0,05$). Т-CD45RA⁺ клетки были чувствительны только к максимальной концентрации гормона.

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

Продукция IL-10

Содержание IL-10 в супернатантах клеточных культур (в интактных образцах) CD45RO⁺ в 3,4 раза превышало аналогичный параметр в CD45RA⁺ Т-клетках и было равным $24,77 \pm 8,90$ и $6,98 \pm 1,01$ пг/мл, соответственно.

Продукция IL-10 в процессе активации CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-клеток увеличивалась (на 90 и 76%, соответственно) по сравнению с базальным уровнем ($p < 0,05$).

Дексаметазон снижал продукцию IL-10 активированными наивными Т-клетками только в максимальной концентрации (10^{-5} М). Добавление β -эстрадиола в культуру наивных клеток приводило к дозопосредованному снижению продукции провоспалительного цитокина – IL-10 (**таблица 11**).

CD45RA⁺ Т-клетки были нечувствительны к тестостерону (независимо от концентрации).

При культивировании CD45RO⁺-лимфоцитов в присутствии дексаметазона и β -эстрадиола (в концентрациях 10^{-5} и 10^{-6} М), наблюдалось уменьшение количества IL-10 в супернатантах клеточных культур ($p < 0,05$). Инкубация CD45RO⁺ Т-клеток с тестостероном сопровождалась увеличением продукции провоспалительного цитокина – IL-10 активированными лимфоцитами; стимулирующий эффект мужского полового гормона наблюдался во всём исследуемом спектре концентраций ($p < 0,05$) (**таблица 11**).

Таблица 11. Количество IL-10 (пг/мл) в супернатантах CD45RA⁺ и CD45RO⁺ культур лимфоцитов, культивируемых с Т-клеточным активатором (Ac/Exp) и

разными концентрациями гормонов дексаметазона (Dex), тестостерона (Test) и β -эстрадиола (Est) ($M \pm \sigma$)

Варианты культивирования	Количество IL-10 (пг/мл) в супернатантах клеточных культур	
	CD45RA ⁺	CD45RO ⁺
Интактная проба	6,98 ± 1,01	24,77 ± 8,90
+ Ac/Exp	76,07 ± 9,01 $p_0 < 0,05$	102,89 ± 17,23 $p_0 < 0,05$
Ac/Exp + Dex (10^{-5} M)	32,24 ± 5,56 $p_1 < 0,05$	68,48 ± 6,09 $p_1 < 0,05$
Ac/Exp + Dex (10^{-6} M)	74,56 ± 11,01	84,36 ± 10,90 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
Ac/Exp + Dex (10^{-7} M)	86,15 ± 9,91	112,89 ± 20,32 $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
Ac/Exp + Test (10^{-5} M)	68,60 ± 6,97	138,34 ± 18,33 $p_1 < 0,05$
Ac/Exp + Test (10^{-6} M)	66,26 ± 2,51	164,34 ± 28,39 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
Ac/Exp + Test (10^{-7} M)	71,67 ± 9,26	188,45 ± 21,38 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
Ac/Exp + Est (10^{-5} M)	9,72 ± 2,38 $p_1 < 0,05$	32,59 ± 5,43 $p_1 < 0,05$
Ac/Exp + Est (10^{-6} M)	42,99 ± 7,21 $p_1 < 0,005$ $p_2 < 0,001$	72,79 ± 11,54 $P_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
Ac/Exp + Est (10^{-7} M)	51,88 ± 10,28 $p_1 < 0,005$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,05$	91,97 ± 6,51 $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
Ac/Exp + Est (10^{-8} M)	62,32 ± 12,23 $p_1 < 0,005$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,05$ $p_4 < 0,05$	98,97 ± 12,53 $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
Ac/Exp + Est (10^{-9} M)	72,29 ± 9,21 $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,05$ $p_4 < 0,05$	99,77 ± 10,67 $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$

Резюмируя вышесказанное, в наших экспериментах четко проявилась тенденция разнонаправленного влияния стероидных гормонов на баланс

продукции Th1/Th2 цитокинов наивными Т-лимфоцитами и примированными Т-клетками иммунной памяти.

Базальная продукция основных про- и противовоспалительных цитокинов CD45RO⁺ клетками значимо превышала таковую наивными Т-лимфоцитами.

Дексаметазон во всем спектре действующих концентраций значимо снижал продукцию активированными наивными Т-клетками только IFN γ . Супрессивное действие на секрецию других цитокинов проявлялось только в его максимальной концентрации. Действие β -эстрадиола на продукцию IL-2 и IL-10 наивными Т-клетками было дозозависимым и носило угнетающий характер. Интересно, что β -эстрадиол обладал стимулирующим влиянием на продукцию наивными клетками IFN γ . На фоне CD2/CD3/CD28-активации наивных Т-клеток, тестостерон угнетал продукцию IL-2 и не влиял на продукцию противовоспалительных факторов (IL-4, IL-10).

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

Таким образом, стероид-опосредованная регуляция продукции Т-клетками разной степени дифференцировки ключевых лимфокинов может быть основополагающим компонентом в формировании того или иного типа иммунных реакций на фоне антигензависимой и антигеннезависимой стимуляции клеток.

1.4. Оценка влияния стероидных гормонов (дексаметазон, β -эстрадиол, тестостерон) на экспрессию мРНК гена каталитической субъединицы теломеразы - *hTERT* в активированных Т-лимфоцитах с разной степенью дифференцировки

Как показало наше исследование, активация CD45RA⁺ клеток приводила к значительному (в 68,6 раза) возрастанию экспрессии hTERT относительно нестимулированной пробы (рисунок 10). Экспрессия мРНК гена hTERT в пробах CD45RO⁺ Т-лимфоцитов с добавлением комплекса анти-CD2/CD3/CD28 была в 3,2

раза ниже, чем в интактных образцах (**рисунок 11**).

При инкубации активируемых CD45RA⁺ клеток с дексаметазоном, уровень экспрессии hTERT снижался. Наиболее выраженный эффект наблюдался в образцах с добавлением активатора и 10⁻⁷М Dex (**рисунок 10**).

В культурах CD45RO⁺ Т-клеток с одновременным добавлением активатора и дексаметазона (10⁻⁵ и 10⁻⁶ М), экспрессия гена hTERT увеличивалась относительно проб с добавлением Т-клеточного активатора в 5 и 5,4 раза, соответственно. Наименьшая концентрация гормона, напротив, способствовала снижению исследуемого показателя в 1,2 раза (**рисунок 11**).

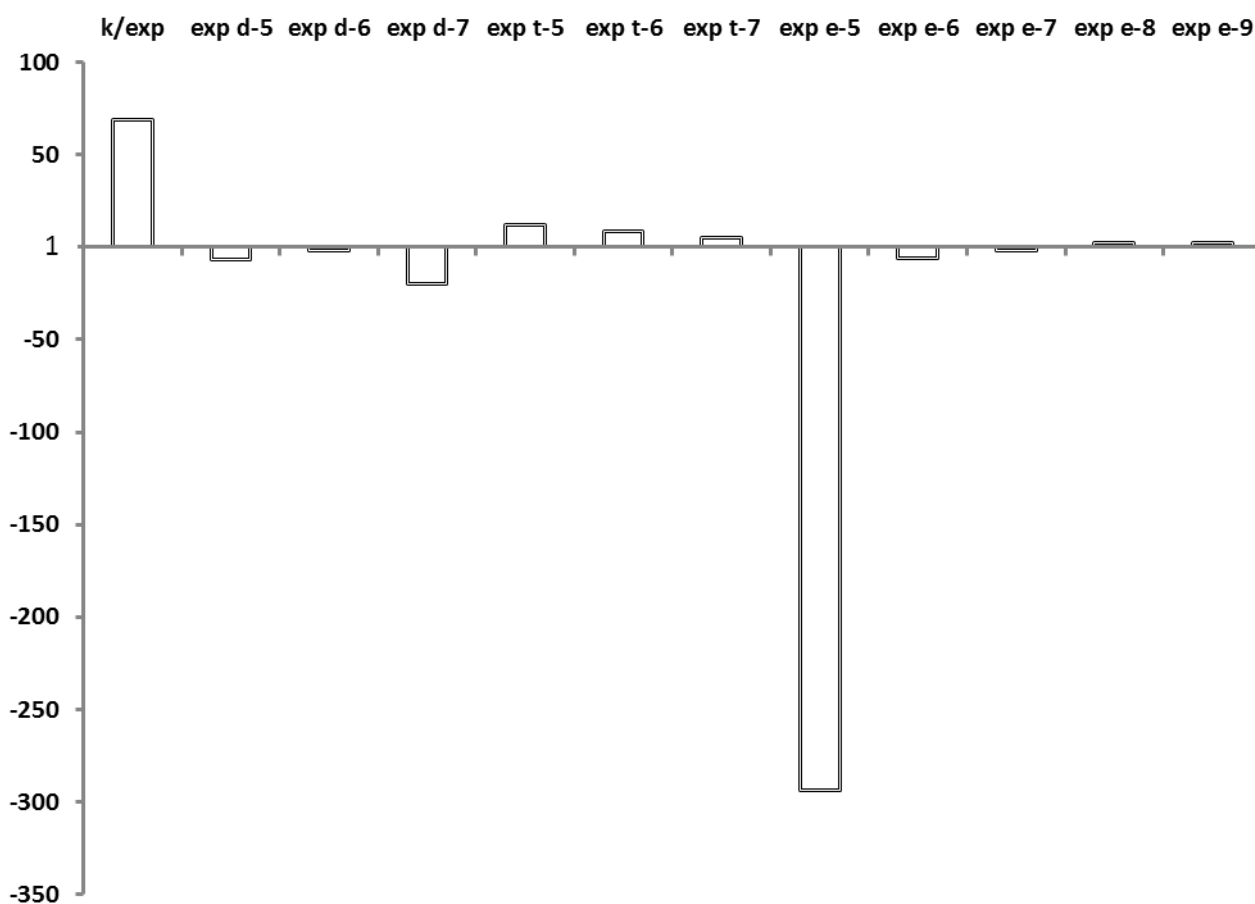


Рисунок 10. Относительное изменение уровня транскрипции гена каталитической субъединицы фермента теломеразы - *hTERT* в наивных (CD45RA⁺) Т-клетках под влиянием активатора и стероидных гормонов (дексаметазона, тестостерона и β -эстрадиола) (кратность). К/Exp – отношение уровня экспрессии мРНК в контрольных образцах (без воздействия) и образцов, с добавлением Т-клеточного активатора (Exp); Exp d-5–d-7 – отношение уровня экспрессии мРНК в образцах с добавлением Т-клеточного активатора и в образцах с добавлением дексаметазона (10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ М); Exp t-5–t-7 – отношение уровня экспрессии мРНК в образцах с добавлением Т-клеточного активатора и в образцах с добавлением тестостероном (10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ М); Exp e-5–e-9 – отношение уровня экспрессии мРНК в образцах с

добавлением Т-клеточного активатора и в образцах с добавлением β -эстрадиолом (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} М).

Инкубация CD45RA⁺ Т-клеток с тестостероном сопровождалась дозозависимым увеличением экспрессии мРНК гена hTERT. Максимальный активирующий эффект наблюдался при добавлении супрафизиологической концентрации гормона (10^{-5} М) (**рисунок 10**).

При культивировании CD45RO⁺ клеток с тестостероном были получены следующие данные: в концентрациях 10^{-5} и 10^{-6} М экспрессия гена hTERT снижалась в 3,5 и 10,3 раза, соответственно, а в концентрации 10^{-7} М – увеличивалась в 13 раз, относительно пробы с добавлением комплекса анти-CD2/CD3/CD28 (**рисунок 11**).

На фоне активации CD45RA⁺ Т-клеток, инкубация с β -эстрадиолом приводила к дозозависимому снижению экспрессии гена hTERT: высокие концентрации гормона вызывали максимальное угнетение экспрессии мРНК гена hTERT.

Более низкие концентрации гормона (10^{-8} - 10^{-9} М) не оказывали значимого влияния на уровень относительной экспрессии мРНК гена hTERT в наивных клетках; он был сопоставим с таковым в активированных пробах без добавления гормона.

Культивирование активированных CD45RO⁺ Т-клеток с β -эстрадиолом сопровождалось выраженным супрессивным эффектом на экспрессию гена каталитической субъединицы теломеразы – hTERT, который возрастал с каждым последующим снижением концентрации гормона в культуральной среде (**рисунок 11**).

Уровень относительной экспрессии мРНК гена hTERT в примированных Т-клетках при добавлении гормона (10^{-8} - 10^{-9} М) более не уменьшался и был сопоставим с таковым в активированных пробах с добавлением гормона в концентрации (10^{-7} М), что было ниже проб с добавлением только активирующего комплекса в среднем, в 20 раз (**рисунок 11**).

Т.о., было установлено, что 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.

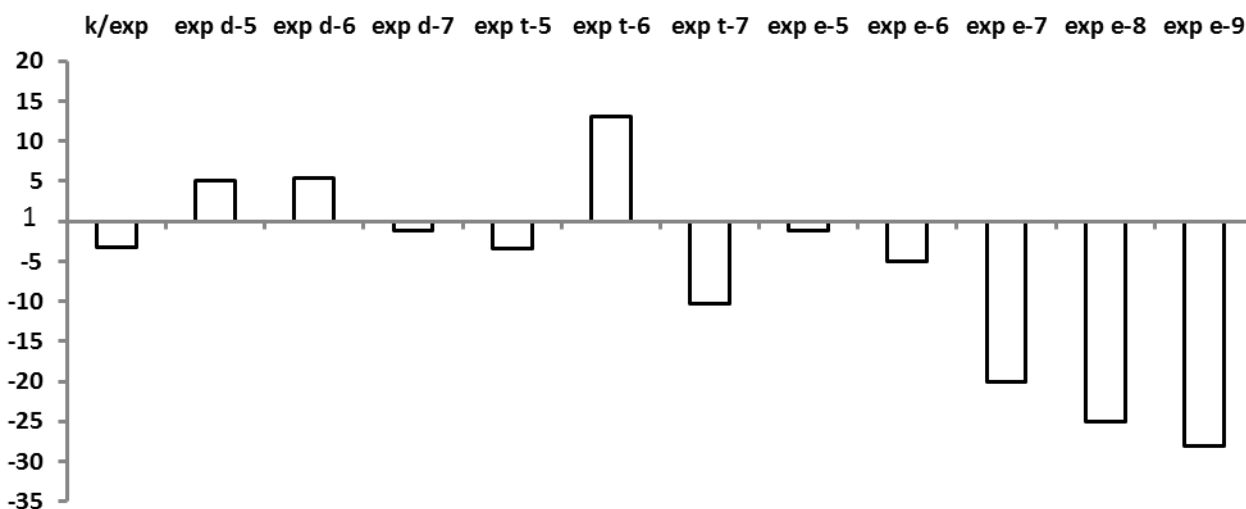


Рисунок 11. Относительное изменение уровня транскрипции гена каталитической субъединицы фермента теломеразы - *hTERT* в примированных (CD45RO⁺) Т-клетках под влиянием активатора и стероидных гормонов (дексаметазона, тестостерона и β-эстрадиола) (кратность). К/Exp – отношение уровня экспрессии мРНК в контрольных образцах (без воздействия) и образцов, с добавлением Т-клеточного активатора (Exp); Exp d-5–d-7 – отношение уровня экспрессии мРНК в образцах с добавлением Т-клеточного активатора и в образцах с добавлением дексаметазона (10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ М); Exp t-5–t-7 – отношение уровня экспрессии мРНК в образцах с добавлением Т-клеточного активатора и в образцах с добавлением тестостероном (10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ М); Exp e-5–e-9 – отношение уровня экспрессии мРНК в образцах с добавлением Т-клеточного активатора и в образцах с добавлением β-эстрадиолом (10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹ М).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе выполненного исследования получены данные, характеризующие дозозависимые эффекты стероидных гормонов: глюкокортикоидного - дексаметазона и половых: тестостерона и β-эстрадиола на функциональную активность Т-клеток разной степени дифференцировки, ассоциированную с мембранной экспрессией молекул CD25/IL-2Rα, CD71 и CD95, продукцией IL-2, а также экспрессией мРНК гена hTERT. Выявлены эффекты стероидных гормонов на продукцию ключевых цитокинов, определяющих Т-хелперную направленность иммунного ответа (IL-2, IFN-γ, IL-4, IL-10) активированными CD45RA⁺ и CD45RO⁺-лимфоцитами

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно современным представлениям, иммунная память – это способность иммунной системы после первичного иммунного ответа быстро и эффективно отвечать на его повторное введение (Воробьева А. А., Быкова А. С., 2003; Radbruch A, Thiel A., 2004; Elyaman et al., 2008; Селедцов В.И. и др., 2010). Ее механистической основой являются селективная экспансия и дифференцировка клонов антиген-специфических Т- и В-лимфоцитов. Клетки иммунной памяти быстро пролиферируют под влиянием специфического антигена: появляется большая популяция эффекторных клеток, увеличивается синтез антител и цитокинов. За счёт клеток памяти более быстро и эффективно удаляются повторно введённые антигены (*при вторичном иммунном ответе*) (Воробьева А.А., Быкова А.С., 2003; Banatvala J., et al., 2001; Janeway Ch. et al., 2004).

Генерация иммунной памяти является непременным условием адаптации организма к изменяющимся условиям антигенного окружения. Стероидные гормоны играют важную роль в регуляции адаптивных иммунных процессов. Общепринятой точкой зрения является то, что кортикостероиды и андрогены обладают выраженным иммунодепрессивным действием, тогда как эстрогены являются стимуляторами иммунных реакций (Karagiannidis Y. et al. 2003; Page F. et al. 2006; Fedor M.E. et.al., 2006; Литвинова Л.С. и соавт., 2011, 2013). В последнее время появляются данные, свидетельствующие, что краткосрочные и долгосрочные эффекты стероидных гормонов на иммунные процессы могут иметь разнонаправленный характер (Селедцов и соавт., 2010; Литвинова и соавт., 2013; Grossman et al., 1994; McMurray R.W. et al., 2001; Yeh S. et al., 2002; Hu Y.C. et al., 2004; Palacios S., 2007; Priyanka H.P. et al., 2013). В связи с этим становится очевидным, что влияние стероидных гормонов на иммунитет прямо или косвенно связано с их эффектами на генерацию, жизнеспособность и функциональную активность Т-клеток памяти. В связи с вышесказанным, принципиально важным становится исследование физиологических механизмов, лежащих в основе регуляции первичного и вторичного иммунного ответов.

Целью нашего 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⁺).

Для оценки дозозависимых эффектов стероидных гормонов на Т-клетки памяти разной степени дифференцировки, 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*). Разработанная нами экспериментальная модель позволяет в строго контролируемых условиях исследовать разные аспекты функциональной деятельности Т-клеток памяти.

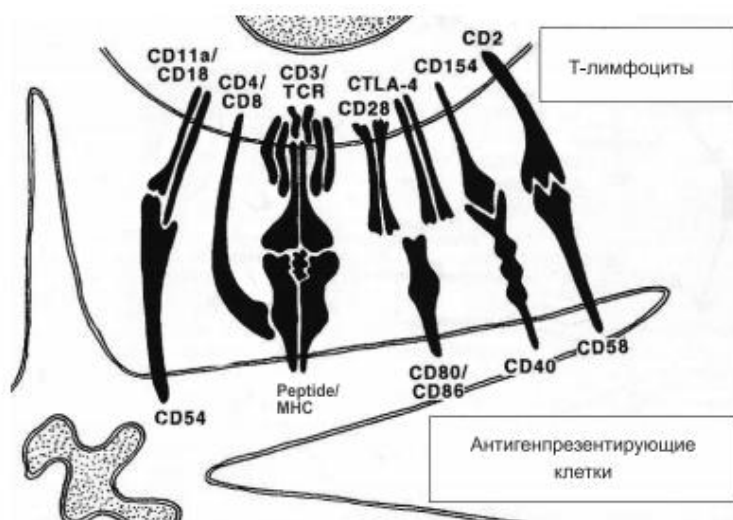


Рисунок 12. Схема формирования иммунного синапса между дендритной клеткой и Т-лимфоцитом (по данным А.А. Ярилина, 2010).

Ключевым моментом в запуске иммунного ответа является образование *иммунного синапса* между АПК и лимфоцитом, что обусловлено наличием соответствующих поверхностных молекул на обеих клетках. В результате образования иммунного синапса осуществляется обмен информацией между иммунокомпетентными клетками, а также контролируются такие процессы, как *активация, дифференцировка и пролиферация лимфоцитов*. Формирование ИК необходимо для передачи двух основных сигналов, первый из которых – информация об антигене; производится за счет распознавания TCR-рецептором Т-лимфоцитов комплекса антигена и молекул HLA (**рисунок 12**).

При контакте TCR с комплексом «*пептид – HLA*» больше порогового времени, наивная Т-клетка активируется и претерпевает клональную пролиферацию и дифференцировку в эффекторные клетки. Данный процесс сопровождается качественным изменением набора поверхностных молекул адгезии, которые направляют уже эффекторные Т-клетки из лимфоидных тканей в места локализации патогена (Ивашкин В.Т., 2008; Sallusto F., Lanzavecchia A., 2010; Чурина Е.Г., 2013).

Второй и немаловажный внутриклеточный сигнал осуществляется за счет костимуляторных молекул со стороны АПК, которые необходимы для полноценной активации Т-лимфоцитов, их дифференцировки и секреции цитокинов. Этот сигнал поступает в результате взаимодействия костимулирующих молекул семейства В7, в частности В7.1 (CD80) и В7.2 (CD86) на поверхности ДК с рецептором CD28 на поверхности Т-лимфоцита (Ивашкин В.Т., 2008; Хаитов Р.М. и соавт., 2009; Хоченков Д.А., 2010).

Эффекты дексаметазона на функциональную активность Т-лимфоцитов разной степени дифференцировки

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).

Действие дексаметазона, как и эффекты других ГК, в частности, на лимфоциты, опосредовано специфическими внутриклеточными (GR) и мембранными (GCRm) рецепторами (Distelhorst C.W., Dubyak G., 1998; Lowenberg M. et al., 2006; Stahn C., Buttgereit F., 2008; Gruver-Yates A.L., Cidlowski J.A., 2013).

В связи с этим, ГК в зависимости от плотности и разной локализации своих рецепторов на всем многообразии типов клеток макроорганизма, будут проявлять разнонаправленные эффекты: геномные или быстрые «негеномные» (Leussink V.I. et al., 2001).

Сущность ответной иммунной реакции организма на различные агенты инфекционной и неинфекционной природы определяется процессами пролиферации, дифференцировки и *программированной гибели*, которым подвергаются основные участники иммунного ответа – лимфоциты. В ходе активационного процесса на поверхности лимфоцитов последовательно экспрессируются молекулы активации (ранней и поздней), пролиферации и апоптоза (Shipkova M, Wieland E., 2012; Литвинова Л.С. и соавт., 2014).

Ранний этап активации Т-клеток является IL-2 зависимым и тесно ассоциирован с продукцией IL-2 и мембранной экспрессией молекулы CD25/IL-2R α (Lin J., Weiss A., 2001; Литвинова Л.С. и соавт., 2014).

Рецепторный комплекс IL-2 (IL-2R), необходимый для взаимодействия IL-2 с клетками-мишенями, включает 3 полипептидные субъединицы (α -, β - и γ -цепи), локализованные на клеточной мембране. Молекула CD25 представляет собой α -цепь рецептора IL-2 (IL-2R α). Появление α -цепи в составе $\beta\gamma$ рецептора приводит к значимому возрастанию сродства рецептора к IL-2 (Graca L., Cobbold S.P. 2002; Lindenmann M.J. et al., 2003). Взаимодействие IL-2 с высокоаффинным IL-2R обеспечивает запуск сигнальных событий, регулирующих вступление покоящихся Т-лимфоцитов в клеточный цикл (Ellery J.M., Nicholls P.J. 2002; Benczik M., Gaffen S.L. 2004; Литвинова Л.С. и соавт., 2013, 2014). Т-лимфоциты являются единственными клетками, которые способны экспрессировать ген IL-2, его экспрессия строго контролируется антигенраспознающим комплексом Т-лимфоцитов (TCR) (Taniguchi T. et al., 1983; Meuer S.C. et al., 1984; Литвинова Л.С., 2013, 2014; Waysbort N. et al., 2013; Tkach K.E. et al., 2014). В состоянии анергии Т-лимфоциты не способны продуцировать IL-2. Даже если они продуцируют IL-2, они не экспрессируют IL-2R и не способны ответить на IL-2 (Bona C., Bonilla F., 1996). Таким образом, молекула CD25 является индуцибельным поверхностным белком, увеличение количества которого указывает на активацию клеток (Егорова В.Н. и соавт., 2009; Литвинова Л.С. и соавт., 2013, 2014). Дефицит IL-2, CD25 или IL-2R β приводит к полиорганному воспалению и системному аутоиммунитету у мышей и человека (Yamanouchi J, et al., 2007, Cénit M.C., et al, 2013).

Добавление Т-клеточного активатора, имитирующего действие антиген-презентирующих клеток, способствовало значительному увеличению

концентрации IL-2 в среде культивирования: в популяции наивных лимфоцитов – в 53 раза ($p < 0,05$), а в культуре Т-клеток памяти – в 8,6 раза ($p < 0,05$). Интересно, что в интактных пробах CD45RA⁺ Т-лимфоцитов, содержание IL-2 в супернатантах клеточных культур было в 6,5 раз меньше, чем в популяции CD45RO⁺ Т-клеток (таблица 8).

Полученные результаты являются вполне прогнозируемыми, поскольку молекула CD28 конститутивно располагается на поверхности всех покоящихся CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, а используемый нами для создания активационной модели реагент содержит анти-биотиновые MACSiBeadTM частицы с антителами против CD2⁺, CD3⁺, CD28⁺. Многие исследователи считают, что именно через взаимодействие **CD28/CD80/86** обеспечивается секреция основных провоспалительных цитокинов - IL-2 и IFN γ Т-лимфоцитами (Ивашкин В.Т., 2008; Хаитов Р.М. и соавт., 2009; Хоченков Д.А., 2010).

Как уже упоминалось, экспрессия молекулы CD25 (IL-2R α) на Т-лимфоцитах ассоциируется с IL-2-зависимой стадией иммунного ответа (Letourneau S. et al., 2009). Культивирование с Т-активатором приводило к увеличению CD45RA⁺ и CD45RO⁺ клеток, экспрессирующих молекулу CD25, в среднем в 5 раз в обеих популяциях Т-клеток ($p < 0,05$) (таблица 5).

Связывание IL-2/IL-2R α играет важную роль для функционирования IL2R *in vivo*. Для IL-2-зависимых ответов продукция IL-2 и экспрессия IL-2R должны временно происходить в той же микросреде (Huse M, et al, 2006, Sabatos CA, et al, 2008).

При проведении сравнительного анализа действия дексаметазона 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.

Добавление дексаметазона в концентрации 10^{-5} М, снижало продукцию IL-2 в культурах активируемых наивных - CD45RA⁺ и примированных - CD45RO⁺ клеток на 52 и 32%, соответственно. Меньшие концентрации гормона значимого эффекта не оказывали (таблица 8).

Экспериментальные исследования ряда авторов на мышах и периферической крови человека показывают, что дексаметазон способен подавлять продукцию IL-2

активированными Т-клетками (Гуцол А.А. и соавт., 2013; Baus E. et al., 1996; Arzt E. et al., 2000; Tang Q. Et al., 2008; Creed T.J. et al., 2009). Дексаметазон действует на активацию транскрипции гена IL-2 (ингибируя транскрипционные факторы AP-1 и NF-kB, активирующие промотор гена IL-2), а также 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).

Дексаметазон в концентрациях 10^{-5} и 10^{-6} М способствовал снижению количества CD45RA⁺CD25⁺ Т-лимфоцитов на 48 и 26%, соответственно ($p < 0,05$). В популяции CD45RO⁺ количество CD25-позитивных клеток также уменьшалось по сравнению с пробой с добавлением Ac/Exp (на 34%, $p < 0,05$), но только при максимальной концентрации гормона 10^{-5} М (**таблица 5**).

В настоящий момент механизм действия глюкокортикоидов на IL-2R остаётся до конца не изученным. Некоторыми исследователями показано, что под действием глюкокортикоидов увеличивается уровень мРНК IL-2R α и количество соответствующего белка, возможно, в синергизме с IL-2 (Lamas M. et al., 1993; Wiegers G.J. et al., 1995). В то же время имеются сведения, что глюкокортикоиды снижают уровни мРНК IL-2R α и IL-2R β и соответствующих белков. Показано, что экспрессия гена IL-2R ингибируется по крайней мере через 72 ч после воздействия на клетки дексаметазона (Voumpas D.T. et al., 1991; Batuman O.A. et al., 1994).

На наш взгляд, снижение экспрессии IL-2R α , скорее всего, является вторичным эффектом, реализуемым за счет ингибирования продукции IL-2. Согласно данным литературы, экзогенный IL-2 предотвращает данный эффект (Voumpas 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).

Таким образом, установленное нами снижение числа CD25⁺-клеток в популяциях CD45RA⁺ и CD45RO⁺ может быть следствием выявленной ранее способности дексаметазона блокировать выработку IL-2 активированными Т-лимфоцитами разной степени дифференцировки.

Ключевая функция IL-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 (Saparov et al., 1999; Yamamoto M. et al., 2013; Литвинова Л.С. и соавт., 2014).

Молекула CD71 - рецептор к трансферрину, как правило, экспрессируется на пролиферирующих клетках (Хаитов Р.М., 2009. Литвинова Л.С. и соавт., 2013, 2014). Рецептор CD71 связывает комплекс железо-трансферрин на клеточной мембране, после чего образовавшийся комплекс поглощается клеткой путем эндоцитоза, и, тем самым, обеспечивается вхождение в активированную клетку ионов железа, необходимых для дальнейшего процесса пролиферации (Baynes R.D. et al., 1994; Tosoni D. et al., 2005). В литературе имеются данные, что дексаметазон способен ингибировать пролиферацию эффекторных и регуляторных Т-клеток после TCR-активации (Pandolfi J. et al., 2013).

Активация CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-лимфоцитов *комплексом анти-CD2/CD3/CD28* приводила к увеличению количества клеток, экспрессирующих молекулу CD71 (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 на 30% ($p < 0,05$). Интересным является тот факт, что в популяции наивных CD45RA⁺ Т-клеток данный эффект наблюдался только при относительно высокой концентрации Dex 10^{-5} М ($p < 0,05$), в то время как в культуре CD45RO⁺ - во всем исследуемом диапазоне концентраций - 10^{-5} - 10^{-7} М ($p < 0,05$) (**таблица 6**).

На наш взгляд, наблюдаемое снижение числа клеток, экспрессирующих молекулу CD71, обусловлено способностью дексаметазона ингибировать пролиферацию Т-клеток, путём подавления продукции ключевых цитокинов, в частности, IL-2 (Baus E. et al., 1996; Arzt E. et al., 2000; Tang Q. et al., 2008; Creed T.J. et al., 2009).

Теломераза представляет собой клеточный фермент, осуществляющий 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, так называемую ее «репликативную историю» (Aubert G., Lansdorp P.M., 2008; Beirne C. et al., 2014; Paiva R.M., Calado R.T., 2014).

Т-лимфоциты представляют особый интерес в отношении исследования регуляции теломеразной активности (Weng N.P., 2008; Gharagozloo M. et al., 2009; Molgora V. et al., 2013), поскольку они являются высоко пролиферирующей популяцией (Elyaman W. et al., 2008; Gharagozloo M. et al., 2009). Лимфоциты тимуса (*тимоциты*) демонстрируют самые высокие уровни теломеразной активности, сопоставимые с таковыми в трансформированных клеточных линиях. Т-клеткам вторичных лимфоидных органов присуща промежуточная активность фермента, тогда как у периферических Т-лимфоцитов - она низко-детектируемая (Weng et al., 1996; Benko A.L. et al., 2012).

Наивные CD45RA⁺ Т-клетки имеют более длинные теломеры, чем CD45RO⁺ Т-лимфоциты памяти, что связано с более высоким репликативным потенциалом наивных клеток-предшественниц (Weng N.P. et al., 1995; Burns J.V. et al., 2000; Wolf D. et al., 2006). Как уже упоминалось, в отличие от большинства типов соматических клеток, Т-лимфоциты способны временно реактивировать экспрессию теломеразы во время стимуляции. Так, активация периферических Т-лимфоцитов комплексом анти-CD3/CD28, повышает активность теломеразы до уровня, сопоставимого с тем, который детектируется в тимоцитах (Weng et al., 1996; Benko A.L. et al., 2012). Экспрессия теломеразы в Т-лимфоцитах модулируется различными внешними стимулами и вирусными агентами (Wang E., 1997; Spaulding C. Et al., 1999; Horikawa I., Barrett J.C. 2003; Barsov E.V., 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). Согласно данным литературы, уровень экспрессии мРНК гена каталитической единицы фермента теломеразы - *hTERT* эквивалентна активности фермента теломеразы (Poole J.C., Andrews L.G., Tollefsbol T.O., 2001; Matsumura-Arioka Y. et al., 2005; Королькова О.Ю. и соавт., 2007; Benko A.L. et al., 2012). CD25⁺ Т-

лимфоциты характеризуются более низкой экспрессией *hTERT*, по сравнению с CD25⁻ Т-лимфоцитами (Wolf D. et al., 2006).

Строгая регуляция экспрессии *TERT*, тем самым 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., Wright W.E., Shay J.W., 2002; Matsumura-Arioka Y. et al., 2005; Королькова О.Ю. и соавт., 2007; Королькова О.Ю., 2011). В тоже время - активность теломеразы в совокупности с длиной теломер отражают пролиферативный потенциал клетки (Королькова О.Ю., 2011).

Как показало наше исследование, активация CD45RA⁺ Т-клеток **комплексом анти-CD2/CD3/CD28** приводила к значительному (в 68,6 раза) возрастанию экспрессии *hTERT* относительно интактной пробы. Экспрессия мРНК гена *hTERT* в пробах CD45RO⁺ Т-лимфоцитов с добавлением Ас/Ехр была в 3,2 раза ниже, чем в интактных образцах. Как уже упоминалось, стойкая активация Т-клеток (в данном случае Ас/Ехр) - способствует уменьшению активности *hTERT* (Horikawa I., Barrett J.C., 2003), тем самым способствуя укорочению теломер и завершая репликативный потенциал антиген-специфических Т-клеток. Это может играть ключевую роль в снижении иммунного контроля над некоторыми патогенами (например, ВИЧ), которые вызывают стойкую активацию Т-клеток (Bodnar A.G. et al., 1996).

При инкубации активируемых CD45RA⁺ клеток с дексаметазоном (10^{-5} - 10^{-7} М), уровень экспрессии *hTERT* снижался. Вызывает интерес тот факт, что наиболее выраженный эффект наблюдался в активированных образцах с добавлением дексаметазона в минимальной концентрации 10^{-7} М. В культурах активированных CD45RO⁺ Т-клеток с добавлением дексаметазона в концентрациях 10^{-5} и 10^{-6} М, экспрессия гена *hTERT* увеличивалась относительно проб с добавлением только Т-клеточного активатора (в среднем, в 5 раз). Наименьшая концентрация гормона, напротив, способствовала снижению исследуемого показателя в 1.2 раза (**рисунок 10,11**).

Известно, что цитокины принимают непосредственное участие в регуляции пролиферации и экспансии Т-клеток *in vivo*, путём регуляции экспрессии *TERT*

через пути сигнальной трансдукции. Предполагают, что IL-2-зависимая активация промотора гена *hTERT* может быть необходима для предотвращения репликативного старения в результате интенсификации пролиферативной активности клеток (Matsumura-Arioka Y. et al., 2005). Коллективом авторов (2009) продемонстрировано достоверное увеличение уровней транскрипции мРНК гена *hTERT* в культурах Т-лимфоцитов при стимуляции IL-2 (Кожевников В.С. и соавт., 2009). Исходя из этого, можно предположить, что наблюдаемое снижение экспрессии *hTERT* в культурах наивных Т-клеток могло явиться следствием вышеописанной способности дексаметазона в достаточно широком спектре концентраций подавлять продукцию IL-2 в популяции незрелых (CD45RA⁺) лимфоцитов, а значит и 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.

Регуляция апоптотической гибели Т-клеток, опосредованной антигензависимой активацией, является одним из основных механизмов поддержания иммунного гомеостаза, а так же весьма чувствительной точкой воздействия различных экзогенных и эндогенных факторов, в том числе, гормональных.

Согласно данным литературы, молекула CD95 (APO-1, Fas) является одним из наиболее значимых маркеров, определяющих готовность лимфоцитов к запуску активационного апоптоза. Она представляет собой трансмембранный белок I типа, относящийся к семейству рецепторов TNF. Система взаимодействующих рецепторов CD95 (Fas) и лигандов CD178 (FasL) играет важную роль формировании аутоотолерантности и поддержании Т-клеточного гомеостаза (Greil R. et al., 1998; 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 комплекса анти CD2/CD3/CD28, приводило к повышению числа апоптотических лимфоцитов

и CD95 – позитивных клеток в обеих популяциях CD45RA⁺ и CD45RO⁺ ($p_0 < 0,05$) (таблица 7).

В связи с вышесказанным, вполне логичным представляется тот факт, что эти изменения являются следствием 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., Fas S.C., Baumann S., Krammer P.H., 2003).

Нами было выявлено отсутствие значимой разницы между чувствительностью CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-клеток к активационным стимулам. Согласно данным литературы, Т-клетки памяти более устойчивы к Fas/FasL апоптозу, чем CD45RA⁺ Т-лимфоциты, что может быть связано с высоким уровнем экспрессии митохондриальных белков Bcl-X (L) и Bcl-2 (Mueller Y.M. et al., 2003; Fas S.C. et al., 2006; Strasser A. et al., 2009).

Данные литературы свидетельствуют, что повышенная гибель клеток может быть ассоциирована с усилением пролиферативной реакции (Elmore S. 2007; Ярилин А.А., 2010). Этот эффект был продемонстрирован нами в популяции активированных наивных CD45RA⁺ Т-лимфоцитов и был ассоциирован с повышением общего числа клеток (в мл) в образцах (рисунок 8).

Как уже упоминалось ранее, 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). Согласно данным литературы, чувствительность лимфоидных клеток к проапоптотическому действию ГК зависит от стадии их дифференцировки и их функционального предназначения. Так, пре-Т-клетки, незрелые Т-клетки тимуса, наивные Т-лимфоциты, зрелые НК-клетки, цитолитические Т-лимфоциты (ЦТЛ), а также и пре-В-клетки и незрелые В-лимфоциты претерпевают апоптоз под действием физиологических доз глюкокортикоидов. Зрелые Т- и В-лимфоциты, в том числе и клетки иммунной памяти, относительно резистентны к апоптотическому действию ГК (Müller M. et al., 2003; Zhou Q. Et al., 2009; Литвинова Л.С. и соавт., 2011).

Добавление синтетического глюкокортикоида - дексаметазона к активируемым культурам наивных - CD45RA⁺ (в концентрациях 10⁻⁵ и 10⁻⁶ М) и примированных - CD45RO⁺ Т-лимфоцитов (в концентрации 10⁻⁵ М) снижало негативный эффект активации, способствуя уменьшению числа апоптотических клеток (p<0,05) (**рисунок 9**). На фоне активации, добавление в культуры Т-клеток дексаметазона, приводило к снижению (по сравнению с пробой только с добавлением активатора) процентного числа *CD95-позитивных клеток в культурах CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-клеток*.

Полученные нами данные указывают на способность дексаметазона подавлять развитие активационного апоптоза, 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 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).

Интересно, что дексаметазон *in vitro* способен усиливать пролиферативную активность Т-клеток, индуцируемую анти-CD3 антителами и IL-7. Этот эффект ассоциирован с уменьшением относительного количества наивных Т-клеток и центральных Т-клеток памяти, и, напротив, увеличением числа CD7⁺CD45RA⁺CD62L⁻ эффекторных Т-лимфоцитов памяти. Этот факт связывают со стимуляцией дексаметазоном экспрессии рецептора IL-7 (ген α -цепи этого рецептора индуцируется глюкокортикоидами), в большом количестве представленного на мембранах наивных Т-лимфоцитов (Talayev V. et al., 2005; Schluns K.S., Lefrançois L. 2003; Селедцов В.И. и соавт., 2011).

Заключение. В результате проведенного исследования получены данные, характеризующие дозозависимые эффекты дексаметазона на активацию Т-клеток разной степени дифференцировки, ассоциированную с мембранной экспрессией молекул CD25/IL-2R α , CD71, CD95, продукцией IL-2, а также с экспрессией мРНК гена *hTERT*.

В целом, влияние глюкокортикоида - дексаметазона на функциональную активность CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-лимфоцитов носит угнетающий характер. Выявлено, 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 то время как в культуре примированных клеток памяти (CD45RO⁺) – на более **поздние** (IL-2-независимые / ассоциированные с экспрессией молекулы пролиферации CD71). На фоне активации, разнонаправленные эффекты дексаметазона на уровень экспрессии мРНК гена каталитической единицы теломеразы (hTERT) ассоциированы со степенью дифференцировки Т-клеток.

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

Половые гормоны являются одними из ключевых регуляторов иммунных реакций. Многочисленные исследования свидетельствуют, что они влияют на способность зрелых эффекторных клеток к реализации иммунного ответа (Grossman et al., 1994; Селедцов и соавт., 2010; Литвинова и соавт., 2013).

При проведении сравнительного анализа действия тестостерона 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.

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 (Viselli S.M. et al., 1997; Mantalaris A. et al., 2001; Lai J.-J. et al., 2012). Тимус уже давно признан в качестве мишени действия андрогенных гормонов (Kovacs and Olsen, 1987, Olsen et al., 1991). Относительно недавно было установлено, что циркулирующие уровни половых гормонов могут влиять на выход Т-клеток из тимуса (Olsen N.J., Kovacs W..J., 2011). Также выявлена взаимосвязь между структурной и функциональной атрофией тимуса, связанная в частности с секрецией половых гормонов (Hince M. et al., 2008).

Андрогены, как и другие стероидные гормоны, реализуют свои эффекты за счет геномных и негеномных механизмов (Heinlein C.A., Chang C., 2002; Foradori C.D. et al., 2008; Chang C. et al., 2013).

Нами выявлено, что тестостерон в использованных концентрациях (10^{-5} - 10^{-7}) не влиял существенно на жизнеспособность активируемых CD45RA⁺-лимфоцитов. Число мертвых клеток и CD45RA⁺CD95⁺ Т-лимфоцитов превышало аналогичные значения контрольных проб с активатором, однако эти изменения были статистически недостоверными.

Интересно, что тестостерон в широком диапазоне действующих концентраций снижал количество живых клеток в культурах CD45RO⁺-клеток (**рисунок 4**). Одновременно с этим, статистически достоверно (в среднем, в 1,5 раза) увеличивалось число CD45RO⁺CD95⁺ Т-лимфоцитов по сравнению с пробами только с добавлением активатора.

В литературе имеются сведения, касающиеся разнонаправленного действия мужских половых гормонов на активацию запрограммированной гибели клеток-мишеней в зависимости от их типа и стадии дифференцировки (Hince M. et al., 2008; Татарчук Т.Ф., Сольский Я.П., 2003; Литвинова Л.С. и соавт., 2011; 2013).

На наш взгляд, проапоптогенный эффект тестостерона может быть обусловлен его прямым действием на примированные Т-клетки, опосредованным через негеномные механизмы. Как уже упоминалось ранее (в обзоре литературы), 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 AR и в присутствии ингибиторов транскрипции и трансляции, это позволяет предположить негеномные механизмы действия андрогенов (Heinlein C.A., Chang C., 2002; Foradori C.D. et al., 2008; Chang C. et al., 2013).

В то же время данные, касающиеся распространённости AR на клетках иммунной системы, весьма противоречивы и имеют дискуссионный характер. Исследования Olsen N.J. и Kovacs W.J. (2001) свидетельствуют, что экспрессия андрогенового рецептора – AR, зарегистрирована в лимфоидных и нелимфоидных клетках тимуса и костного мозга, но не в зрелых лимфоцитах периферической крови (Olsen N.J. и Kovacs W.J., 2001). Другие ученые не обнаружили экспрессии

AR на тимоцитах (Grossman C.J. et al., 1979; McCruden A.B. et al., 1984). Напротив, выявлена слабая экспрессия мРНК гена AP в периферических Т-клетках (Bebo V.F. et al., 1999).

Таким образом, в нашем исследовании было выявлено, что CD45RO⁺ Т-клетки оказались более чувствительными к апоптоз-индуцирующему действию высоких концентраций тестостерона, нежели их наивные предшественники.

Тестостерон во всем спектре действующих концентраций не влиял общую клеточность (в мл) в культурах Т-клеток, имеющих разную степень дифференцировки (**рисунок 8**). Данные литературы свидетельствуют, что андрогены, в частности, тестостерон обладает антипролиферативным действием. В эксперименте *in vitro* показано, что иммунокомпетентные клетки 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).

Далее нами были проанализированы данные, характеризующие эффекты тестостерона на этап ранней активации CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-клеток, ассоциированный с продукцией IL-2 и мембранной экспрессией молекулы CD25/IL-2R α . Тестостерон, независимо от концентрации (10^{-5} - 10^{-7} 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 (**таблица 8**). 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 его максимальной концентрации (10^{-5} М) ($p_1 < 0,05$) (**таблица 8**).

В связи с вышесказанным, вполне закономерным явилось выявленное нами снижение числа CD71-позитивных клеток в культурах наивных и примированных лимфоцитах. Как и ожидалось, CD45RA⁺ Т-клетки обладали наибольшей чувствительностью к супрессивным эффектам тестостерона (**таблица 6**).

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 (Литвинова Л.С. и соавт., 2011; 2013; Roden A.C. et al., 2004; Lai J.-J. et al., 2012), так и его ингибирующим

влиянием на продукцию цитокинов – на уровне транскрипции, за счет подавления экспрессии фактора NF- κ B (Li S. et al., 2013).

Поскольку примированные Т-лимфоциты (CD45RO⁺) менее зависимы от IL-2 (Дейл М.М., Формен Д. 1998; Литвинова ЛС и соавт., 2013), то вполне логичным представляется тот факт, что действие тестостерона на CD45RO⁺ Т-клетки проявлялось только в его *супрафизиологической* концентрации (10^{-5} М). Кроме того, как уже упоминалось – на зрелых периферических Т-клетках экспрессия андрогеновых рецепторов менее выражена, чем на наивных Т-клетках (Bebo V.F. et al., 1999; Olsen N.J. и Kovacs W.J., 2001).

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).

Таким образом, можно сделать вывод, что тестостерон подавляет Т-клеточную активацию, ассоциированную с системой IL-2 и его рецептора IL-2R и следующую за ней пролиферацию за счет уменьшения сигнализации основного ростового фактора - IL-2.

Как уже упоминалось ранее, активность теломеразы – определяет репликативный потенциал клеток, в том числе, высокопролиферирующей популяции лимфоцитов (Poole J.C., Andrews L.G., Tollefsbol T.O., 2001; Matsumura-Arioka Y. et al., 2005; Королькова О.Ю., 2007; Benko A.L. et al., 2012). В связи с этим, наибольший интерес представляла оценка влияния тестостерона, обладающего супрессивным и антипролиферативным эффектами, на экспрессию мРНК гена каталитической субъединицы *hTERT*, *косвенно отражающей активность фермента теломеразы.*

Добавление тестостерона в культуры активированных CD45RA⁺ Т-клеток сопровождалось, в целом, повышением экспрессии мРНК гена hTERT. Интересно, что самый высокий уровень экспрессии каталитической субъединицы фермента теломеразы 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 тестостерона на репликативный потенциал стимулированных (комплексом анти CD2/CD3/CD28) наивных (CD45RA+) T-клеток (рисунок 10).

В то же время при инкубации CD45RO⁺ клеток с тестостероном были получены следующие данные: в концентрациях 10⁻⁵ и 10⁻⁶ М экспрессия гена *hTERT* снижалась в 10,3 и 3,5 раза, соответственно, тогда как добавление минимальной дозы гормона (10⁻⁷ М) увеличивало экспрессию *hTERT* в 13 раз, относительно пробы с добавлением только Ас/Ехр (рисунок 11).

В случае примированных T-клеток, снижение экспрессии *hTERT* под действием высоких концентраций гормона можно объяснить как проапоптогенным действием, так и антипролиферативным эффектом тестостерона на зрелые T-клетки. Вышесказанное позволяет предположить, что наряду с угнетением раннего и IL-2-независимого этапов активации, тестостерон подавляет репликативный потенциал примированных T-клеток. Более низкие концентрации снижали негативные эффекты гормона на CD4RO⁺ T-клетки.

В дополнение к вышесказанному, считаем необходимым привести данные коллег, которые в серии экспериментов 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 (Calado R.T. et al., 2009).

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). Эстрадиол пассивно диффундирует в клетки и связывается с α -изоформой рецептора эстрогена (ER α), которая 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 таким образом, андрогены и эстрогены

увеличивают экспрессию hTERT, и в конечном итоге приводят к увеличению активности теломеразы в кроветворных клетках (Calado R.T. et al., 2009).

***Заключение.** В целом, влияние тестостерона на функциональную активность наивных и примированных T-клеток носит угнетающий характер. Более чувствительными к его проапоптогенному действию оказались CD45RO⁺T-клетки. Эффекты тестостерона на продукцию IL-2 и экспрессию молекулы активации CD25 T-клетками носили однонаправленный характер и не зависели от концентрации гормона. Супрессивные эффекты тестостерона в отношении системы IL-2-IL2R, в большей степени затрагивали наивные T-клетки.*

Эффекты тестостерона на экспрессию мРНК каталитической субъединицы фермента теломеразы hTERT определяются степенью дифференцировки T-клеток. Выявленные нами изменения свидетельствуют о протективном влиянии тестостерона на репликативный потенциал стимулированных (комплексом анти CD2/CD3/CD28) наивных клеток, и напротив, его действие на примированные T-клетки носит угнетающий характер.

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

Эстрогены участвуют в регуляции процессов созревания, дифференциации, активации и пролиферации лимфоидных клеток (McMurray R.W. et al., 2001; Priyanka H.P. et al., 2013). Функциональная активность иммунной системы у женщин зависит от менструального цикла: клеточные иммунные реакции имеют значительные отличия в фолликулярную и лютеиновую фазы менструального цикла, в пред- и постменопаузе, что предполагает зависимость функциональной активности T-лимфоцитов от концентрации эстрогенов (Priyanka H.P. et al, 2013).

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

Нами был выявлен четкий проапоптогенный эффект высоких концентраций β -эстрадиола (10^{-5} - 10^{-7} М) на активированные T-клетки разной степени

дифференцировки. Так, 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 (**таблица 7, рисунок 9**).

Более низкие концентрации гормона (10^{-8} - 10^{-9} М) не обладали проапоптогенным эффектом на Т-клетки: число апоптотических клеток и содержание CD95⁺ Т-лимфоцитов в культурах активированных клеток не отличалось от аналогичных значений контрольных проб с добавлением только активатора. Наиболее чувствительными к проапоптогенному действию женского полового гормона оказались CD45RA⁺ Т-клетки.

Интересно, что существенное увеличение общего числа CD45RA⁺ Т-клеток, регистрируемое на фоне их значительной гибели при инкубации с β -эстрадиолом (в диапазоне концентраций 10^{-5} - 10^{-7}), было связано с усилением пролиферативной активности, ассоциированной с мембранной экспрессией молекулы CD71.

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 (Razandi M. et al., 2002; http://vivovoco.astronet.ru/VV/JOURNAL/NATURE/09_03/ESTRO.HTM). Как уже упоминалось ранее, для эстрогенов, как и для андрогенов, выявлены геномные и негеномные эффекты. Первые реализуются за счет ядерных рецепторов к эстрадиолу (ER) α и β , которые сверхэкспрессированы на иммунных клетках (Danel L. et al., 1983; Cohen J.H. et al., 1983; Stimson W.H. 1988; Couse J.F. et al., 1997; Cunningham M, Gilkeson G., 2011) и функционируют как транскрипционные факторы, активированные лигандом (Prossnitz E.R. et al., 2011). Предполагают, что эти рецепторы вовлечены в процессы созревания и дифференцировки Т-клеток в тимусе и изменение лимфопоэза в костном мозге (Cunningham M., Gilkeson G., 2011).

Негеномные эффекты осуществляются через сигнальные пути, в частности, трансмембранный ERs, который представляет собой G-связанный протеин ER1 и

предназначен для быстрой передачи сигналов (Prossnitz E.R. et al., 2011; Priyanka H.P. et al., 2013).

Вероятно, что проапоптогенное действие эстрадиола, наряду с усилением пролиферативной активности (в случае CD45RA⁺ Т-клеток), может быть опосредовано как геномными, так и негеномными эффектами β-эстрадиола.

В то же время высокое содержание мертвых клеток в культурах активированных CD45RO⁺-лимфоцитов, подвергнутых воздействию β-эстрадиола (10^{-5} и 10^{-6} 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- ERα 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 эстрадиола на процессы функциональной активности Т-лимфоцитов, связанные с этапом ранней активации (система IL-2/IL-2Rα)

В нашем исследовании β-эстрадиол в концентрациях 10^{-5} - 10^{-7} М оказывал выраженное супрессивное действие на уровень продукции IL-2 в обеих популяциях активированных Т-лимфоцитов (**таблица 8**), что может быть связано с выявленным нами ранее проапоптогенным действием женского полового гормона на Т-лимфоциты (Литвинова Л.С. и соавт., 2013).

Действие β-эстрадиола на продукцию IL-2 наивными и примированными Т-лимфоцитами носило четкий дозозависимый характер (**таблица 8**). 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 (**таблица 5**).

Более выраженным эффект был в случае CD45RO⁺ Т-клеток, что может быть обусловлено, как *перераспределением изоформ высокоаффинных эстрогенных рецепторов на мембранах «зрелых» лимфоцитов*, особенно на цитотоксических CD8⁺-Т-клетках, так и, как упоминалось ранее – высокой плотностью молекул CD45RO⁺ на поверхности примированных Т-лимфоцитов (ограничение

функциональной активности) (Chernyshov V.P. et al., 2001; Anderson D.J. 2000). Показано, что эстрадиол стимулирует антигенспецифический иммунный ответ, возможно за счет некоторого угнетения функциональной активности $CD8^+$ Т-клеток и усиления активации $CD4^+$ Т-клеток (Chernyshov V.P. et al., 2001; Anderson D.J. 2000).

В современной литературе имеются весьма противоречивые данные по влиянию эстрадиола на продукцию ИЛ-2. Так, Priyanka H.P. и соавт. (2013) в экспериментальном исследовании показали, что 17β -эстрадиол в сочетании с Т-клеточным митогеном (CD3/CD28), конканавалином А, а также без них - в широком диапазоне действующих концентраций гормона (10^{-6} - 10^{-12} М) не оказывал влияния на секрецию ИЛ-2 лимфоцитами селезенки крыс линии Sprague-Dawley (Priyanka H.P. et al., 2013).

Другие авторы продемонстрировали эстроген-ассоциированное угнетение продукции ИЛ-2 и экспрессии ИЛ-2 рецептора (ИЛ-2R) в $CD4^+$ Т-клетках линии *Jurkat*, которое было связано с ингибированием факторов транскрипции: NF-каппаВ и AP-1 на фоне эстроген-индуцированного увеличения уровня белка IкВ α , ингибитора ядерной транслокации фактора NF-каппаВ (McMurray R.W. et al., 2001).

В более низких концентрациях (10^{-8} - 10^{-9} М), β -эстрадиол не оказывал влияния на секрецию ИЛ-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).

Таким образом, мы обнаружили супрессивный дозозависимый эффект β -эстрадиола на этап ранней активации Т-клеток разной степени дифференцировки, ассоциированный с системой ИЛ-2/ИЛ-2R α . Высокие концентрации β -эстрадиола (10^{-5} - 10^{-7} М) угнетали продукцию ИЛ-2 Т-клетками, и как следствие - снижалась экспрессия молекулы активации CD25. Проапоптогенный эффект высоких доз β -эстрадиола у наивных клеток, но не у примированных, был ассоциирован со стимуляцией ИЛ-2-независимого этапа

активации клеток (повышение общего числа клеток (в мл) и рост содержания лимфоцитов, несущих на своей мембране молекулу пролиферации - CD71).

Более низкие концентрации гормона (10^{-8} - 10^{-9} M), наряду с отсутствием проапоптогенного эффекта, не оказывали влияния на изменение параметров системы IL-2/IL-2Ra и пролиферативную активность (ассоциированную с мембранной экспрессией молекулы CD71) T-лимфоцитов разной степени дифференцировки.

Роль половых стероидных гормонов в регуляции экспрессии теломеразы и ее функциональной активности была идентифицирована во многих типах гормончувствительных тканей: в клетках рака молочной железы, эндометрия, предстательной железе, эпителиальных клетках яичников (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 Er β). *In vivo* выявили модификацию ERE-региона в Era - позитивных клетках после действия 17 β -эстрадиола, что свидетельствовало об эстроген-зависимом ремоделировании хроматина (Misiti S. et al., 2000; Xu D. et al., 2014).

Согласно полученным нами данным, β -эстрадиол оказывал противоположные эффекты на экспрессию мРНК гена hTERT активированными CD45RA⁺ и CD45RO⁺ T-клетками (рисунок 10,11).

На фоне активации CD45RA⁺ T-клеток, инкубация с β -эстрадиолом приводила к дозозависимому снижению экспрессии гена hTERT: высокие концентрации гормона вызывали максимальное угнетение экспрессии мРНК гена hTERT. Эти изменения носили одинаковую направленность с продукцией наивными T-клетками ростового фактора - IL-2, что позволяет предположить зависимость экспрессии гена каталитической субъединицы теломеразы hTERT от продукции IL-2 в наивных T-клетках, а также обратную зависимость с IL-2 – независимым этапом активации CD45RA⁺ T-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^{-8} - 10^{-9} 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 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^{-5} - 10^{-7} 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.

Попытки оценить эффекты эстрогенов на экспрессию теломеразы и ее активность в лимфоцитах человека были предприняты несколькими исследовательскими коллективами (Effros R.B. et al., 2005; Choi J. et al., 2008; Calado R.T. et al., 2009), противоречивы. Интересно, что коллектив авторов (Benko A.L. и соавт., 2012) 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 мнение, что эстрогены (в частности, β -эстрадиол) воздействуют на процесс развития Т-клеток, изменяя активность теломеразы в ответ на TCR-сигнализацию, в то время как зрелые периферические

T-клетки не реагируют на гормон изменениями в экспрессии или функциональной активности теломеразы (Benko A.L. et al., 2012).

Заключение. В популяции стимулированных комплексом анти-CD2/CD3/CD28 наивных T-клеток, выраженный проапоптогенный эффект высоких доз β -эстрадиола сочетался со стимуляцией IL-2-независимой активации, ассоциированной с экспрессией CD71. Эстрадиол-индуцированное дозозависимое угнетение этапа ранней активации T-клеток (система IL-2-IL-2R) с подавлением экспрессии мРНК гена hTERT в наивных клетках, позволяет предположить взаимосвязь между этими компонентами, и свидетельствуют о сокращении репликативного потенциала наивных T-клеток на фоне активации.

В популяции примированных T-клеток, проапоптогенный эффект β -эстрадиола не затрагивал IL-2-независимую активацию и был ассоциирован с подавлением ранних (IL-2-зависимых / ассоциированных с экспрессией молекулы CD25 и продукцией IL-2) фаз активации. В отличие от наивных T-клеток, экспрессия hTERT имела обратную зависимость от продукции IL-2. Следует отметить, что эффекты эстрадиола на экспрессию hTERT определялись дифференцировочным статусом T-клеток и были дозозависимы.

Влияние стероидных гормонов (дексаметазон, β -эстрадиол, тестостерон) на содержание про- (IL-2, IFN γ) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов в культурах активированных T-лимфоцитов разной степени дифференцировки

Регуляция иммунного ответа в ответ на агенты инфекционной и неинфекционной природы является сложным взаимодействием многих факторов. В настоящее время интерес к оценке состояния цитокиновой сети продиктован тем фактом, что цитокины являются наиболее многочисленной группой биологически активных веществ, участвующих в регуляции иммунного ответа. Именно сбалансированностью этих медиаторных молекул определяется форма последующего специфического ответа – преимущественно клеточного или гуморального (Pritchard D.I. et al., 2004; Симбирцев А.С., 2004; Швыдченко И.Н. и соавт., 2005).

Согласно современным представлениям, хронический дисбаланс Th1/Th2 может играть ключевую роль в иммунопатогенезе многих заболеваний (Romagnani S., 2000; Arakawa S. et al., 2004; Hui Y. et al., 2012; Lu K. et al., 2012). В частности, основным механизмом формирования аутоиммунной патологии связывают с преимущественной активацией Th2-клонов клеток (Диел Ф., 2001; Садыгов А.С. и соавт., 2001). Как уже упоминалось, стероидные гормоны оказывают мощные модулирующие эффекты на всех уровнях врожденного и адаптивного иммунитета. Хотя основное внимание уделено глюкокортикоидам, учитывая их широкое применение в клинической практике (Huard B. et al., 2001; Saint-Mezard D. et al., 2003; Maile J. et al., 2006; Liu Z. Et al., 2009; Bjelaković G., Stojanović I., 2010; Spiesa C.M. et al., 2010), становится все более очевидным, что половые стероидные гормоны, оказывают мощное воздействие на иммунный ответ (Селедцов и соавт., 2010; Литвинова и соавт., 2013; Grossman et al., 1994; Moore F.A. et al., 1996; Chang C. et al., 2013; Priyanka H.P. et al., 2013).

В связи с этим, изучение факторов, влияющих на запуск регуляторных механизмов, опосредующих Т-хелперную направленность (в условиях антигенной стимуляции), может иметь важное значение для разработки новых терапевтических подходов к лечению иммунных расстройств, опосредованных нарушением Т-клеточного баланса (Th1/Th2).

Особый интерес для нас представляла оценка влияния стероидных гормонов на продукцию ключевых цитокинов, определяющих Т-хелперную направленность иммунного ответа (IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10) активированными CD45RA⁺ и CD45RO⁺-лимфоцитами.

Дексаметазон

Глюкокортикоиды (ГК) - мощные иммуносупрессивные агенты (Ashwell J.D. et al., 2000; Wherry E.J. et al., 2003; Fedor M.E., Rubinstein A., 2006; Baschant U., Tuckermann J., 2010; Ayroldi E. et al., 2014; Gruver-Yates A.L., Cidlowski J.A., 2013; Cheng Q., Morand E., Yang Y.H., 2014). 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; Spies C.M. et al., 2010).

В нашем исследовании, дексаметазон в максимальной концентрации (10^{-5} M) снижал продукцию IL-2 активируемыми CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-клетками на 52 и 32%, соответственно. Меньшие концентрации гормона значимого эффекта не оказывали (**таблица 8**). 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} M) ($p < 0,05$) (**таблица 9**).

Нами уже приводились данные, свидетельствующие, что в системах *in vitro* под действием глюкокортикоидов наблюдается ослабление пролиферативной реакции лимфоидных клеток на митогены и антигены, что связано со снижением образования основного ростового фактора - IL-2. В связи с этим, влияние глюкокортикоидов на первичный иммунный ответ выражено сильнее, чем на вторичный, поскольку клональная экспансия клеток при вторичном ответе уже снижена в результате уменьшенной продукции IL-2 (Дейл М.М., Формен Д.К., 1998).

В дополнение к вышесказанному, одним из механизмов снижения содержания IFN- γ в супернатантах клеточных культур Т-клеток под действием дексаметазона, может быть 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 CD45RO⁺ Т-клетками имел супрессивный характер и зависел от концентрации гормона ($p < 0,05$). CD45RA⁺ Т-клетки были чувствительны только к максимальной концентрации гормона (10^{-5} M). Дексаметазон снижал продукцию IL-10 активированными наивными Т-клетками (10^{-5} M) и CD45RO⁺ Т-лимфоцитами (10^{-5} и 10^{-6} M) ($p < 0,05$) (**таблица 10,11**).

Как уже упоминалось ранее, разная чувствительность субпопуляций Th1 и Th2 к глюкокортикоидам связана с разным числом гормональных рецепторов у этих клеток. Показано, что под влиянием IL-4 в сочетании с IL-2, у лимфоцитов повышается количество рецепторов для глюкокортикоидов, а под влиянием IFN- γ –

снижается. Так, дифференцировка лимфоцитов в отсутствие IL-4, в присутствии высокой концентрации IFN- γ приводит к созреванию Th1, резистентных к глюкокортикоидам (Ashwell J.D., Frank Lu W.M., 2000; Калинина Н.М., Кетлинский С.А., 2008).

In vitro, добавление IL-2 и TNF α в культуры МНК здоровых доноров и пациентов с резистентностью к ГК, уменьшало чувствительность клеток к стероидам. Инкубация с IL-10, напротив, повышала супрессорный эффект стероидов на мононуклеарные клетки. Иммунонейтрализация или блокада рецептора IL-2, но не TNF α , IFN γ , IL-4, IL-17 или IP-10, увеличивала чувствительность клеток пациентов, резистентных к стероидной терапии к ГК (Creed T.J. et al., 2009).

Показано дозопосредованное дексаметазониндуцированное подавление LPS-стимулированной продукции: TNF α , IL-6, IL-8 и IL-10 в цельной крови у пациентов с сепсисом (Giamarellos-Bourboulis E.J. et al., 2010).

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

Тестостерон

Как упоминалось ранее, тестостерон обладает супрессивными эффектами на иммунную систему (Roden A.C. et al., 2004; Zhao S. et al., 2014).

В нашем экспериментальном блоке исследований *in vitro*, тестостерон, независимо от концентрации, равномерно (в среднем, в 1,4 раза) подавлял продукцию IL-2 ($p < 0,05$) CD45RA⁺ T-лимфоцитами. На примированные клетки мужской половой гормон действовал только в максимальной дозе - 10^{-5} М, снижая исследуемый показатель в активируемых культурах CD45RO⁺-клеток, в среднем, на 66% ($p < 0,05$).

В нашем исследовании мы не выявили супрессивного эффекта тестостерона на продукцию Т-клетками разной степени дифференцировки основного провоспалительного цитокина IFN γ ($p>0,05$) (таблица 8,9).

Наши данные *лишь* частично согласуются с результатами других исследователей. В литературе имеются сведения, что тестостерон регулирует дифференцировку Th1-хелперов через механизм подавления IL-12-индуцированного фосфорилирования STAT4. С использованием мышинных моделей было показано, что андрогеновый рецептор связывает область консервативного региона фосфатазы Ptpn1, и как следствие – повышает ее активность с последующим супрессивным эффектом на сигналинг IL-12 в CD4 Т-клетках) (Kissick H.T. et al., 2014).

Выявлено, что инкубация мононуклеарных клеток, выделенных из лимфатических узлов семенников крыс с экспериментальным орхитом, с разными концентрациями тестостерона, приводила к снижению уровня продукции IFN- γ и IL-2 (Fijak M. Et al., 2011). Angele M.K. и соавт. (2001) при геморрагическом шоке было отмечено, 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 (Angele M.K. et al., 2001). Freeman B.M. и соавт. (2014) была обнаружена взаимосвязь между низкими концентрациями тестостерона и продукцией провоспалительных цитокинов. Они предполагают, что это может быть возможным механизмом потенцирования сердечно-сосудистых заболеваний у мужчин с дефицитом андрогенов (Freeman B.M. et al., 2014).

Данные литературы в отношении действия тестостерона на продукцию Т-клетками противовоспалительных молекул также не имеют одинаковой направленности.

Наше исследование позволило выявить снижение продукции IL-4 Т-лимфоцитами с фенотипом CD45RA⁺ и CD45RO⁺ в присутствии тестостерона (10^{-5} М) (таблица 10,11). Напротив, тестостерон оказывал стимулирующее действие на продукцию IL-10 CD45RO⁺ Т-клетками (во всём исследуемом спектре концентраций) ($p<0,05$) (таблица 11). CD45RA⁺ Т-клетки были нечувствительны к действию.

Полученные нами результаты частично находят отражение в мировой литературе. Fijak M. et al. (2011) доказали, что введение тестостерона в разных концентрациях животным (крысам) с экспериментальным орхитом (ЭО), предотвращало накопление макрофагов в семенниках и значительно сокращало количество CD4⁺ Т-клеток с последующим увеличением количества регуляторных Т-клеток (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) и продукции ими IL-10, по сравнению с животными контрольной группы (Fijak M. et al., 2011).

Этими же авторами *in vitro* показано, что добавление тестостерона 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 активации комплексом анти CD2/CD3/CD28, 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 .

β -эстрадиол

В настоящее время, 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). Установлено, что самки по сравнению с особями мужского пола, имеют сильный клеточно-опосредованный иммунный ответ с более высокой продукцией антител при антигенной стимуляции (Lahita, 1997; Chang C. et al., 2013).

Супрессивное действие β -эстрадиола на уровень продукции IL-2 в *обеих популяциях Т-лимфоцитов*, активированных комплексом *анти CD2/CD3/CD28* носило выраженный дозозависимый характер (**таблица 8**).

В то же время 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^{-6} - 10^{-9} М), напротив – стимулирующий, повышая продукцию *IFN* γ , в среднем, в 1,5 раза (по сравнению с пробами только с добавлением активатора) (**таблица 9**).

Добавление женского полового гормона (10^{-5} и 10^{-6} М) в культуру активированных CD45RO⁺ Т-клеток памяти, дозозависимым образом угнетало продукцию *IFN*- γ ($p < 0,05$). Более низкие концентрации β -эстрадиола отменяли супрессивный его эффект. Культивирование лимфоцитов с фенотипом CD45RA⁺ и CD45RO⁺ в присутствии β -эстрадиола приводило к снижению продукции ИЛ-4. Супрессивный эффект наблюдался только при использовании их максимальных концентраций (10^{-5} М) (**таблица 9, 10**).

Добавление β -эстрадиола в культуру наивных и примированных Т-клеток приводило к достоверному снижению продукции провоспалительного цитокина – ИЛ-10 (**таблица 11**). Супрессивные эффекты β -эстрадиола на наивные Т-клетки были дозозависимыми ($p < 0,05$).

Наши результаты, полученные в отношении эффектов β -эстрадиола на продукцию про- и противовоспалительных цитокиновых молекул Т-клетками разной степени дифференцировки противоречат одним источникам и соответствуют другим. В связи с этим, мы попытались систематизировать разнонаправленные данные других исследователей.

Так, коллективом авторов было выявлено, что эстрадиол регулирует уровни экспрессии *IFN*- γ в лимфоцитах селезенки нормальных мышей (Karpuzoglu-Sahin E. et al., 2001), увеличивая продукцию *IFN*- γ CD4⁺ Th1 клетками (Bao M. et al., 2002). Maret A. и соавт. (2003) продемонстрировали, что эстрадиол усиливает первичный ответ антиген-специфических CD4 Т-клеток и развитие Th1 – популяций *in vivo*. Они предполагают, что ключевая роль в этих процессах принадлежит его рецептору - ER α (Maret A. et al., 2003).

В дополнение к эффектам эстрадиола, оказываемым на Th1-клетки, он также действует и на Th2 Т-клетки. Так, выявленное Faas M. и соавт. увеличение ИЛ-4 в

лютеиновой фазе (соответствующей высоким уровням P2 и E2), по их мнению, может быть опосредовано действием эстрадиола (Faas M. et al., 2000). Другие авторы также подтверждают, стимулирующее действие эстрадиола на секрецию IL-4 CD4⁺ Т-клетками, а также экспрессию GATA-3 у мышей (Lambert K.C. et al., 2005). Другие исследования демонстрируют супрессивные эффекты эстрадиола, преимущественно, на продукцию Th1 цитокинов (IFN γ , IL-2) (Burger D., Dayer J.M., 2002). 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).

Существуют работы, показывающие, что эстрогены ингибируют секрецию Th1-провоспалительных цитокинов, таких как IL-12, TNF- α и IFN γ и стимулируют выработку Th2- цитокинов с провоспалительными функциями - IL-10, IL-4, и TGF- β , обеспечивая, тем самым дисбаланс Th1/Th2 (Salem M.L., 2004).

Резюмируя вышесказанное, нужно отметить дуалистическую роль эстрадиола в поддержании баланса Th1/Th2. В связи с этим, несомненный интерес представляет парадокс, формирующийся при беременности.. Dogia и соавт. (2006) предполагают, что высокий уровень эстрадиола во время беременности тормозит развитие Th1-клеточных реакций, сдвигая поляризацию иммунного ответа в сторону Th2. Это согласуется с улучшением течения Th1-опосредованных заболеваний (ревматоидный артрит) и ухудшением патологии, обусловленной Th2- типом иммунного ответа (СКВ), наблюдаемых во время беременности (Dogia A. et al., 2006; Schumacher A. et al., 2014). Arruvito L. et al. (2004) выявили корреляцию между концентрацией эстрадиола и числом Treg у человека (Arruvito L. et al., 2007). На мышинных моделях было продемонстрировано, что добавление эстрадиола *in vitro*, конвертирует фенотип CD4⁺CD25⁻ Т-клеток в CD4⁺CD25⁺ Treg клетки с усилением экспрессии Foxp3 и продукции IL-10 (Tai P. et al., 2008).

Позже, аналогичные исследования были проведены у человека. Они подтвердили, что эстрадиол увеличивает число Treg и модулирует их функции (Valor L. et al., 2011).

Таким образом, в нашем экспериментальном блоке in vitro было выявлено разнонаправленное действие эстрадиола на продукцию ключевых про – и противовоспалительных молекул Т-клетками. На фоне активирующих TCR-сигналов

эстрогены в большей степени обладают способностью угнетать продукцию CD45RO⁺ Т-клетками памяти молекул Th1 ответа (IL-2, IFN-γ), в то время как действие эстрадиола на наивные Т-клетки, сопряжено с угнетением продукции IL-2 и IL-10, на фоне активации секреции основного провоспалительного медиатора - IFN-γ.

На наш взгляд, принципиально противоречивые результаты по исследованию эффектов стероидных гормонов на функциональную активность Т-клеток разной степени дифференцировки можно интерпретировать тем, что клеточные и молекулярные механизмы их действия на клетки-мишени при физиологических и патофизиологических процессах сильно отличаются, так же, как и отличаются цели и условия проведения экспериментальных работ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог вышесказанному, можно выделить ряд закономерностей стероид-опосредованной регуляции функциональной активности Т-клеток памяти, имеющих разную степень дифференцировки.

В целом, влияние глюкокортикоида - дексаметазона на функциональную активность CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-лимфоцитов носит угнетающий характер. Выявлено, 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 то время как в культуре примированных клеток памяти (CD45RO⁺) – на более поздние (IL-2-независимые / ассоциированные с экспрессией молекулы пролиферации CD71). На фоне CD2/CD3/CD28-активации, разнонаправленные эффекты дексаметазона на уровень экспрессии мРНК гена каталитической единицы теломеразы (hTERT) ассоциированы со степенью дифференцировки Т-клеток (**рисунок 13**).

В популяции стимулированных комплексом анти-CD2/CD3/CD28 наивных (CD45RA⁺) Т-клеток, выраженный проапоптогенный эффект супрафизиологических доз β-эстрадиола сочетался со стимуляцией *IL-2-независимой активации*, ассоциированной с экспрессией CD71. Эстрадиол-

индуцированное дозозависимое угнетение стадии ранней активации (*система IL-2-IL-2R*) с подавлением экспрессии мРНК гена hTERT в наивных (CD45RA⁺) Т-клетках, позволяет предположить взаимосвязь между этими компонентами и свидетельствует о сокращении репликативного потенциала наивных (CD45RA⁺) Т-клеток на фоне *TCR-сигнализации*.

В популяции примированных (CD45RO⁺) Т-клеток памяти, проапоптогенный эффект β-эстрадиола не затрагивал IL-2-независимую активацию и был ассоциирован с подавлением ранних (IL-2-зависимых / ассоциированных с экспрессией молекулы CD25 и продукцией IL-2) фаз активации. Экспрессия hTERT имела обратную зависимость от продукции IL-2. Возможно, супрафизиологические концентрации β-эстрадиола (10⁻⁵ и 10⁻⁷ М), подавляя ранний этап активации Т-клеток (угнетение системы IL-2/IL-2Rα), наряду с сохранением теломеразной активности на фоне IL-2 независимой пролиферации, способствуют сохранению репликативного потенциала примированных (CD45RO⁺) Т-клеток памяти. Более низкие концентрации эстрадиола (10⁻⁷ и 10⁻⁹ М) - на фоне восстановления IL-2-зависимого этапа активации – оказывают супрессорный эффект на экспрессию hTERT, что может быть связано со стойкой активацией Т-клеток и сокращением репликативного потенциала примированных (CD45RO⁺) Т-лимфоцитов (**рисунок 13**). Влияние тестостерона на функциональную активность наивных и примированных Т-клеток, в целом, носит угнетающий характер. Более чувствительными к его проапоптогенному действию оказались CD45RO⁺Т-клетки. Эффекты тестостерона на продукцию IL-2 и экспрессию молекулы активации CD25 Т-клетками носили однонаправленный характер и не зависели от концентрации гормона. Супрессивные эффекты тестостерона в отношении системы IL-2-IL2R, в большей степени, затрагивали наивные (CD45RA⁺) Т-клетки (**рисунок 13**). Эффекты тестостерона на экспрессию мРНК каталитической субъединицы фермента теломеразы hTERT определяются степенью дифференцировки Т-клеток. Выявленные нами изменения свидетельствуют о протективном влиянии тестостерона на репликативный потенциал CD2/CD3/CD28-стимулированных наивных (CD45RA⁺) Т-клеток, и напротив, его действие на примированные (CD45RO⁺) Т-клетки носит угнетающий характер.

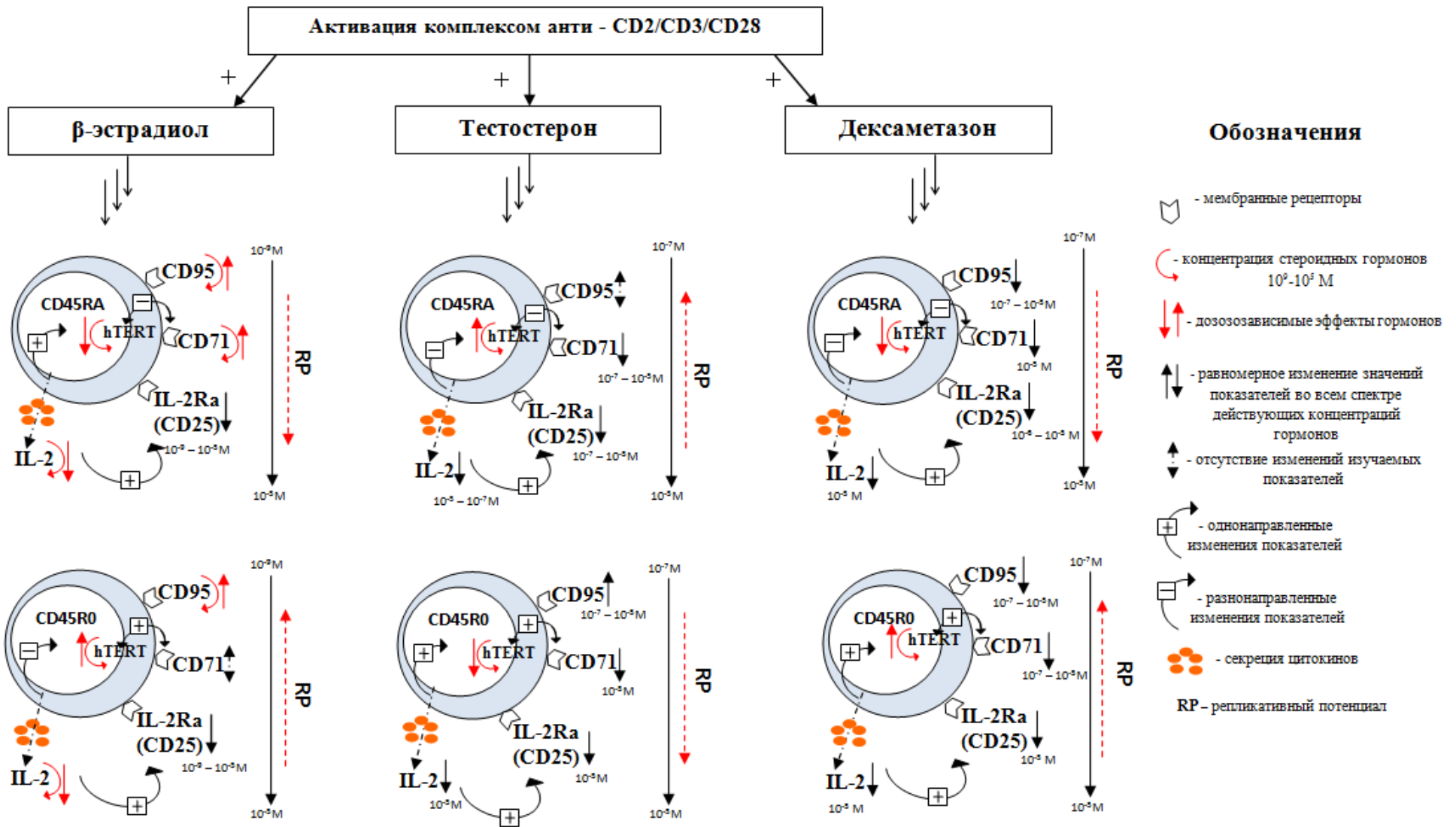
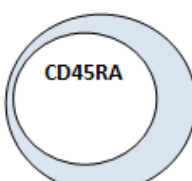



Рисунок 13. Влияние стероидных гормонов на функциональную активность Т-клеток разной степени дифференцировки (по результатам собственных исследований)

В наших экспериментах четко проявилась тенденция разнонаправленного влияния стероидных гормонов (дексаметазона, тестостерона, β -эстрадиола) на баланс продукции Th1/Th2 цитокинов Т-клетками разной степени дифференцировки.

На фоне *CD2/CD3/CD28-активации*, дексаметазон в большей степени обладает способностью угнетать продукцию наивными ($CD45RA^+$) Т-клетками Th1-цитокинов (IFN γ). Супрессорные эффекты дексаметазона на примированные ($CD45RO^+$) Т-клетки памяти затрагивают, в основном, секрецию Th2-цитокинов (IL-4, IL-10) (рисунок 14).

	β -эстрадиол + CD2/CD3/CD28-комплекс $10^9 - 10^5 M$	Тестостерон + CD2/CD3/CD28-комплекс $10^2 - 10^7 M$	Дексаметазон + CD2/CD3/CD28-комплекс $10^5 - 10^7 M$
CD45RA	 IL-2 \downarrow (red arrow) IFN γ \uparrow (black arrow) IL-10 \downarrow (red arrow) IL-4 \downarrow (red arrow)	IL-2 \downarrow (black arrow) IFN γ \uparrow (black arrow) IL-10 \uparrow (black arrow) IL-4 \downarrow (red arrow)	IL-2 \downarrow (black arrow) IFN γ \downarrow (red arrow) IL-10 \downarrow (red arrow) IL-4 \downarrow (red arrow)
CD45RO	 IL-2 \downarrow (red arrow) IFN γ \downarrow (red arrow) IL-10 \downarrow (red arrow) IL-4 \downarrow (red arrow)	IL-2 \downarrow (black arrow) IFN γ \uparrow (black arrow) IL-10 \uparrow (red arrow) IL-4 \downarrow (red arrow)	IL-2 \downarrow (black arrow) IFN γ \downarrow (red arrow) IL-10 \downarrow (red arrow) IL-4 \downarrow (red arrow)

Обозначения:





-  - концентрации стероидных гормонов $10^9-10^5 M$
-  - дозозависимые эффекты гормонов
-  - равномерное изменение значений показателей во всем спектре действующих концентраций гормонов
-  - отсутствие изменений изучаемых показателей

Рисунок 14. Влияние стероидных гормонов на баланс продукции про- и противовоспалительных цитокинов Т-клетками разной степени дифференцировки (по результатам собственных исследований)

Тестостерон, в условиях активации комплексом *анти CD2/CD3/CD28*, в основном, угнетал продукцию наивными ($CD45RA^+$) Т-клетками основного ростового фактора - IL-2. На примированные ($CD45RO^+$) Т-клетки были выявлены его стимулирующие эффекты в отношении продукции супрессорного цитокина - IL-10. Т-клетки разной степени дифференцировки оказались нечувствительны к тестостерону в отношении продукции основных медиаторов Th1/Th2 ответа – IL-4 и IFN γ .

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 14**).

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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Активность Т-лимфоцитов хелперов 2 типа у больных бронхиальной астмой и туберкулёзом лёгких / А.С. Садыгов, Т.П. Сесь, Г.Л. Мурыгина и др. // Медицинская иммунология. – 2001. – Т. 3, №4. – С. 547-550.
2. Апоптоз эозинофильных гранулоцитов, опосредованный цитокинами, при больших эозинофилиях крови / Л.С. Литвинова, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий и др. // Цитология. – 2008. - Т. 50, №1. - С.67-71.
3. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: Учебное пособие для студентов медицинских вузов / под ред. А.А. Воробьёва, А.С. Быкова. – М.: Медицинское информационное агентство, 2003. - 236 с.
4. Барышников, А. Ю. Иммунологические проблемы апоптоза / А. Ю. Барышников, Ю. В. Шишкин. – М.: Эдиториал УРСС, 2002. – 320 с.
5. Берштейн, Л.М. Феноменальный эстроген и эстрогенный феномен / Л.М. Берштейн // Природа. – 2003. - № 9. - С. 24-29.
6. Влияние дексаметазона на активацию и пролиферацию Т-клеток иммунной памяти / А.А. Гуцол, Н.А. Сохоневич, В.И. Селедцов, и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2013. - Т. 155, № 4. – С. 468-470.
7. Влияние тестостерона и β -эстрадиола на активацию Т-лимфоцитов, ассоциированную с продукцией IL-2 и экспрессией CD25 (IL-2R α) / А.А. Гуцол, Н.А. Сохоневич, К.А. Кофанова, и др. // Цитология. - 2014. – Т. 56, № 7. – С. 500–503.
8. Галактионов, В.Т. Иммунология: Учебник / В.Г. Галактионов. - М.: МГУ, 1998. – 480 с.
9. Диел, Ф. Цитокины у больных с атопией и без атопии – влияние факторов внешней среды / Ф. Диел // Медицинская иммунология. – 2001. – Т. 3, №1. – С. 15-19.
10. Дранник, Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология / Г.Н. Дранник. - Из-тво: МИА. - 1999. - 604 с.
11. Егорова, В.Н. Интерлейкин-2: опыт клинического применения / В.Н. Егорова, А.М. Попович, И.В. Бабаченко. - СПб.: Издательский дом «Новости правопорядка», 2009. - 64 с.
12. Жукова, О.Б. Молекулярные механизмы нарушения апоптоза лимфоцитов при хронической вирусной инфекции / О.Б. Жукова // Бюллетень сибирской медицины. - 2006. - № 3. - С.19-25.

13. Заболевания иммунной системы. Диагностика и фармакотерапия / Н.М. Калинина, С.А. Кетлинский, С.В. Оковитый, и др. // М.: Эксмо, 2008. - 496 с.
- 14.Ивашкин, В.Т., Основные понятия и положения фундаментальной иммунологии / В.Т. Ивашкин // РЖГГК. – 2008. – № 4. – С. 4–14.
15. Клеточные механизмы генерации иммунологической памяти / В. И. Селедцов, Л. С. Литвинова, А. Г. Гончаров и др. // Цитокины и воспаление. - 2010. - Т. 9, № 4. - С. 9-15.
16. Кожевников, В.С. Экспрессия эрготоп-ассоциированных маркеров активированными Т-лимфоцитами / В.С. Кожевников, В.В. Сеньюков, О.Ю. Королькова // Медицинская иммунология. - 2009. - № 2-3. - С. 255–260.
- 17.Королькова, О. Ю. Экспрессия теломеразы в иммунокомпетентных клетках человека в норме и при иммунопатологических состояниях. Автореферат диссертации кандидата биологических наук / О. Ю. Королькова. - Новосибирск, 2011. – 28 с.
18. Королькова, О.Ю. Динамика экспрессии мРНК каталитической субъединицы теломеразы (hTERT) в лимфоцитах периферической крови / О.Ю. Королькова, В.И. Борисов, В.С. Кожевников // Российский аллергологический журнал. - 2007. - №3, Приложение 1. - С. 25.
- 19.Кремер, Н.Ш. Теория вероятностей и математическая статистика / Н.Ш. Кремер. - М.: ЮНИТИ-ДАНА, 2004. – 573 с.
- 20.Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов / Л. С. Литвинова, А. А. Гуцол, Н. А. Сохоневич и др. // Медицинская иммунология. – 2014. – Т. 16, № 1. – С. 7-26.
- 21.Ройт, А. Основы иммунологии: учебник/ А. Ройт; Пер. с англ. Т. В. Великодворской и др.; Под ред. Р. Г. Василова, А. Ф. Киркина. - Москва: Мир, 1991. - 327 с.
22. Ройт, А. Иммунология / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл. - М.: Мир, 2000. - 592 с.
- 23.Роль апоптоза и анергии Т-клеток в патогенезе гнойно-септических заболеваний / М.Н. Норкин, О.Ю. Леплина, М.А. Тихонова и др. // Медицинская иммунология. - 2000. - Т. 2, № 1. - С. 35-42.
- 24.Руководство по иммунофармакологии: научное издание / под ред. М.М.Дейла, Д.К.Формена. - М.: Медицина, 1998. - 332 с.

25. Селедцова, Г.В. Т-клеточная вакцинация в лечении рассеянного склероза / Г.В. Селедцова, И.П. Иванова, В.И. Селедцов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2008. – Т.3, №4. – С. 31-35.
26. Симбирцев, А.С. Цитокины: классификация и биологические функции / А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. - 2004. - №2. - С. 16 - 21.
27. Стероидная регуляция иммунной памяти / Л.С. Литвинова, В.И. Селедцов, В.В. Шуплецова и др. // Вестник РГУ им. И. Канта. - 2011. - №1. – С. 77–87.
28. Татарчук, Т.Ф. Эндокринная гинекология / Т.Ф. Татарчук, Я.П. Сольский. – К.: Заповгг, 2003. - 300 с.
29. Феодоритова, Е. Защитные силы человеческого организма / Е. Феодоритова. - М.: Медицина, 2002. – 235 с.
30. Хайдуков, С.В. Ионицин-резистентная субпопуляция CD4+ Т-лимфоцитов периферической крови человека. Фенотипическая характеристика / С.В. Хайдуков, И.С. Литвинов, И.В. Холоденко // Цитология. - 2003. - N 3. - С. 249-254.
31. 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.
32. Хаитов, Р. М. Иммунология: учебник для студ. мед. вузов / Р. М. Хаитов, Г. А. Игнатъева, И. Г. Сидорович. - М.: Медицина, 2000. - 430 с.
33. Хаитов, Р.М. Иммунология: учебник для студентов медицинских вузов / Р.М. Хаитов. - М.: ГЭОТАР Медиа, 2009. - 320 с
34. Хаитов, Р.М. Роль паттернраспознающих рецепторов во врожденном и адаптивном иммунитете / Р.М. Хаитов, М.В. Пашенков, Б.В. Пинегин // Иммунология. – 2009. – № 1. – С. 66–74.
35. Хоченков, Д.А. Роль дендритных клеток в иммунном ответе на Т-независимые антигены типа 2. / Д.А. Хоченков // Биологические мембраны. – 2010. – Т. 27, № 4. – С. 307–313.
36. Чурина, Е.Г. Вторичная иммунологическая недостаточность у больных туберкулезом легких: монография. – Томск: Печатная мануфактура. – 2013. – С. 84
37. Швыдченко, И.Н. Цитокинсекретирующая функция нейтрофильных гранулоцитов / И.Н. Швыдченко, И.В. Нестерова, Е.Ю. Синельникова // Иммунология. - 2005. - №1. - С. 31 - 33.

- 38.Эффекты иммунорегуляторных цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на процессы активации, пролиферации и апоптотической гибели Т-клеток иммунной памяти *in vitro* / Литвинова Л.С., Сохоневич Н.А., Гуцол А.А. и др. // Цитология. – 2013. - Т. 55. – С. 566–571.
- 39.Ярилин, А. А. Апоптоз и его место в иммунных процессах / А.А. Ярилин // Иммунология. – 1996. – № 3. – С. 6–9.
- 40.Ярилин, А.А. Иммунология / А.А. Ярилин. – М: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с
- 41.Ярилин, А.А. Система цитокинов и принципы ее функционирования в норме и при патологии / А.А. Ярилин // Иммунология. - 1997. - №5. - С. 7 -14.
- 42.17beta-estradiol (E2) modulates cytokine and chemokine expression in human monocyte-derived dendritic cells / A.K. Bengtsson, E.J. Ryan, D. Giordano et al. // Blood. – 2004. - Vol. 104(5). - P. 1404–1410.
43. A comparative study of the calcium system in memory T cells and naive T cells / A. Sigova, E. Dedkova, V. Zinchenko // FEBS Lett. - 1999. – Vol. 447(1). – P. 1934-1938.
44. A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements / D.C. Hargreaves, P.L. Hyman, T.T. Lu et al. // J Exp Med. - 2001. – Vol. 194(1). – P. 45–56.
45. A synaptic basis for paracrine interleukin-2 signaling during homotypic T cell interaction / C.A. Sabatos, J. Doh, S. Chakravarti et al. // Immunity. – 2008. - Vol. 29(2). - P. 238-248.
46. Afferent and efferent phases of allergic contact dermatitis (ACD) can be induced after a single skin contact with haptens: evidence using a mouse model of primary ACD / P. Saint-Mezard, M. Krasteva, C. Chavagnac et al. // J Invest Dermatol. – 2003. – Vol. 120(4). – P. 641-647.
47. Age- and gender-associated changes in the concentrations of serum TGF-1 β , DHEA-S and IGF-1 in healthy captive baboons (*Papio hamadryas Anubis*) / E.L. Willis, R.F. Wolf, G.L. White et al. // Gen Comp Endocrinol. – 2014. – Vol. 195. - P. 21-27.
48. Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts male aging study / H.A. Feldman, C. Longcope, C.A. Derby et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2002. - Vol. 87(2). - P. 589–598
- 49.Age-related declines and disease-associated variation in immune cell telomere length in a wild mammal [Electronic resource] / C. Beirne, R. Delahay, M. Hares et al. // PLoS One. – 2014. - Vol. 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.>

50. Altemus, M. Immune function in PTSD / M. Altemus, F.S. Dhabhar, R. Yang // *Ann N Y Acad Sci.* – 2006. – Vol. 1071. – P. 167-183.
51. Anderson, D. J. Immunologic aspects of menopause. *Menopause* / D. Anderson J., ed by R. A. Lobo, J. Kelsey, R. Marcus // *Biology and Pathology* – San Diego, Tokyo: Acad. Press, 2000. — P. 353-356.
52. Androgen deprivation induces phenotypic and functional changes in the thymus of adult male mice / N.J. Olsen, M.B. Watson, G.S. Henderson et al. // *Endocrinology.* – 1991. - Vol. 129(5). - P. 2471-2476.
53. 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] / C. Chang, S. Yeh, S. Lee, et al. // *Nucl Recept Signal.* – 2013. - Vol.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)
54. Androgen receptor influences on body defense system via modulation of innate and adaptive immune systems: lessons from conditional AR knockout mice / J.J. Lai, K.P. Lai, W. Zeng et al. // *Am J Pathol.* – 2012. - Vol. 181(5). - P. 1504–1512.
55. Androgen receptors in thymic epithelium modulate thymus size and thymocyte development / N.J. Olsen, G. Olson, S.M. Viselli et al. // *Endocrinology.* – 2001. - Vol. 142(3). - P. 1278-1283.
56. Androgens alter B cell development in normal male mice / S.M. Viselli, K.R. Reese, J. Fan et al. // *Cell Immunol.* – 1997. – Vol. 182(2). - P. 99–104.
57. Androgens alter T-cell immunity by inhibiting T-helper 1 differentiation / H.T. Kissick, M.G. Sanda, L.K. Dunn et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2014. - Vol. 111(27). - P. 9887-9892.
58. Androgens alter the cytokine profile and reduce encephalitogenicity of myelin-reactive T cells / B.F. Bebo Jr, J.C. Schuster, A.A. Vandenbark et al. // *J Immunol.* – 1999. - Vol. 162(1). - P. 35–40

59. Arakawa, S. Differential expression of mRNA for Th1 and Th2 cytokine-associated transcription factors and suppressors of cytokine signalling in peripheral blood mononuclear cells of patients with atopic dermatitis / S. Arakawa, Y. Hatano, K. Katagiri // *Clin Exp Immunol.* – 2004. - Vol. 135(3). - P. 505-510.
60. Arends, M. J. Apoptosis: Mechanism and role in pathology / M. J. Arends, A. H. Wyllie // *Int. Rev. Exp. Pathol.* – 1991. – Vol. 32. – P. 223-254.
61. Ashwell, J.D. Glucocorticoids in T Cell Development and Function / J.D. Ashwell, F.W. Lu, M.S. Vacchio // *Annual Review of Immunology.* - 2000. - Vol. 18(1). - P. 309-345.
62. Ashwell, J.D. Glucocorticoids in T cell development and function / J.D. Ashwell, F.W. Lu, M.S. Vacchio // *Annu Rev Immunol.* - 2000. - Vol.18. - P. 309-345.
63. Association between suppressors of cytokine signaling mRNA expression and Th1/Th2 balance in children with asthma / Y. Hui, J.J. Xie, L. Li et al. // *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* – 2012. - Vol. 14(10). - P. 755-758.
64. Aubert, G. Telomeres and aging / G. Aubert, P.M. Lansdorp // *Physiol Rev.* – 2008. – Vol. 88(2). –P. 557-579.
65. Augmentation of T cell levels and responses induced by androgen deprivation / A.C. Roden, M.T. Moser, S.D. Tri et al. // *J Immunol.* – 2004. – Vol. 173(10). - P. 6098–6108
66. Ayroldi, E. Targeting glucocorticoid side effects: selective glucocorticoid receptor modulator or glucocorticoid-induced leucine zipper? A perspective [Electronic resource] / E. Ayroldi, A. Macchiarulo, C. Riccardi // *FASEB J.* – 2014. - Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25205742>. Banatvala, J. Lifelong protection against hepatitis B: the role of vaccine immunogenicity in immune memory / J. Banatvala, P. Van Damme, S. Oehen // *Vaccine.* - 2000. - Vol. 19(7-8). - P. 877-885.
67. Barsov, E.V. Telomerase and primary T cells: biology and immortalization for adoptive immunotherapy / E.V. Barsov // *Immunotherapy.* - 2011. - Vol. 3(3). - P. 407–421.
68. Baschant, U. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity / U. Baschant, J. Tuckermann // *J Steroid Biochem Mol Biol.* – 2010.- Vol. 120(2-3). - P. 69-75.
69. Baschant, U. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity / U. Baschant, J. Tuckermann // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* - 2010. - Vol. 120(2-3). - P. 69–75.
70. Baynes, R.D. Circulating transferrin receptors and assessment of iron status / R.D. Baynes, B.S. Skikne, J.D. Cook // *J. Nutr. Biochem.*- 1994.- Vol. 5(7). – P. 322–330.

71. Benczik, M. The interleukin (IL)-2 family cytokines: survival and proliferation signaling pathways in T lymphocytes / M. Benczik, S.L. Gaffen // *Immunol. Invest.* – 2004. – Vol. 33(2). – P. 109-142.
72. Benjamini, E. *Immunology, a short course* / E. Benjamini, G. Sunshine, S. Leskowitz. - New York: WILEY-LISS, 1996. - 451 p.
73. Benko, A.L. Estrogen and telomerase in human peripheral blood mononuclear cells / A.L. Benko , N.J. Olsen , W.J. Kovacs // *Mol Cell Endocrinol.* – 2012. - Vol. 364(1-2). - P. 83-88.
74. Berridge, M.J. *Lymphocyte activation in health and disease* / M.J. Berridge // *Crit Rev Immunol.* – 1997. - Vol. 17(2). - P. 155-178.
75. Binding of progestins to the glucocorticoid receptor. Correlation to their glucocorticoid-like effects on in vitro functions of human mononuclear leukocytes / K. Kontula, T. Paavonen, T. Luukkainen et al. // *Biochemical Pharmacology.* – 1983. – Vol. 32(9). - P. 1511–1518.
76. Bjelakovic, G. Metabolic correlations of glucocorticoids and polyamines in inflammation and apoptosis / G. Bjelakovic, I. Stojanovic // *Amino Acids.* -2010. – Vol. 39(1). – P. 29-43.
77. Blasco, M. A. Telomeres and human disease: aging, cancer and beyond / M. A. Blasco // *Nat.Rev. Genet.* – 2005. - Vol. 6(8). - P. 611–622.
78. Bona, C. *Textbook of immunology, second ed.* / C. Bona, F. Bonilla. - Amsterdam: Harwood Acad. Publ., 1996. - 406 p.
79. Burger, D. Cytokines, acute-phase proteins, and hormones: IL-1 and TNF-alpha production in contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes / D. Burger, J.M. Dayer // *Ann N Y Acad Sci.* – 2002. – Vol. 966. - P. 464-473.
80. Burger, D. High-density lipoprotein-associated apolipoprotein A-I: the missing link between infection and chronic inflammation? / D. Burger, J.M. Dayer // *Autoimmun Rev.* – 2002. - Vol. 1(1-2). - P. 111-117.
81. Burns, J.B. In vivo reduction of telomere length in human antigen-reactive memory T cells / J.B. Burns, S.T. Lobo, B.D. Bartholomew // *Eur J Immunol.* - 2000. - Vol. 30(7). - P. 1894–1901.
82. Buvat, J. Androgen therapy with dehydroepiandrosterone / J. Buvat // *World J Urol.* - 2003. – Vol. 21(5). – P. 346-355.

83. CD3+ CD8+ CTL activity within the human female reproductive tract: influence of stage of the menstrual cycle and menopause / H.D. White, K.M. Crassi, A.L. Givan et al. // *J Immunol.* – 1997. - Vol. 158(6). - P. 3017-3027.
84. CD4(+) T cell effectors can become memory cells with high efficiency and without further division / H. Hu, G. Huston, D. Duso et al. // *Nat Immunol.* – 2001. – Vol. 2(8). – P. 705-710.
85. Cellular and molecular mechanisms of memory T-cell survival / A. Tanel, S.G. Fonseca, B. Yassine-Diab et al. // *Expert Rev Vaccines.* - 2009. - Vol. 8(3). - P. 299–312.
86. 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.- Vol. 28(5). - P. 687–697.
87. Chan, T.D. Affinity-based selection and the germinal center response / T.D. Chan, R. Brink // *Immunol Rev.* – 2012. - Vol. 247(1). - P. 11-23.
88. Chang, C.S. Structural analysis of complementary DNA and amino acid sequences of human and rat androgen receptors / C.S. Chang, J. Kokontis, S.T. Liao // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1988. - Vol. 85(19). - P. 7211-7215.
89. Chemotactic responsiveness toward ligands for CXCR3. CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response / A.E. Hauser, G.F. Debes, S. Arce et al. // *J Immunol.* - 2002. - Vol. 169(3). – P. 1277–1282.
90. Cheng, Q. Development of novel treatment strategies for inflammatory diseases-similarities and divergence between glucocorticoids and GILZ / Q. Cheng, E. Morand, Y.H. Yang // *Front Pharmacol.* - 2014. - Vol. 5. - P. 169.
91. Choi, J. Reduced telomerase activity in human T lymphocytes exposed to cortisol / J. Choi, S.R. Fauce, R.B. Effros // *Brain Behav. Immun.* - 2008. - Vol. 22 (4). - P. 600–605.
92. Chorionic gonadotropin can enhance innate immunity by stimulating macrophage function / H. Wan, M.A. Versnel, W.Y. Cheung et al. // *J Leukoc Biol.* – 2007. - Vol. 82(4). - P. 926–933.
93. Chorionic gonadotropin induces dendritic cells to express a tolerogenic phenotype / H. Wan, M.A. Versnel, L.M. Leijten et al. // *J Leukoc Biol.* – 2008. - Vol. 83(4). - P. 894–901.
94. Compton, M.M. Glucocorticoid action on the immune system / M.M. Compton, L.A. Caron, J.A. Cidlowski // *J Steroid Biochem.* – 1987. - Vol. 27(1-3). - P. 201-208.
95. Cong, Y.S. Human telomerase and its regulation / Y.S. Cong, W.E. Wright, J.W. Shay // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2002. - Vol. 66(3). - P. 407-425.

96. Control of memory CD4 T cell activation: MHC class II molecules on APCs and CD4 ligation inhibit memory but not naive CD4 T cells / D.L. Farber, M. Luqman, O. Acuto et al. // *Immunity*. – 1995. - Vol. 2(3). - P. 249-259.
97. Corticosterone exerts immunostimulatory effects on macrophages via endoplasmic reticulum stress / J.Y. Zhou, H.J. Zhong, C. Yang et al. // *Br J Surg*. – 2010. - Vol. 97(2). - P. 281-293.
98. Coupled IL-2-dependent extracellular feedbacks govern two distinct consecutive phases of CD4 T cell activation / N. Waysbort, D. Russ, B.M. Chain et al. // *J Immunol*. – 2013.- Vol. 191(12). – P. 5822-5830.
99. Crotty, S. Immunological memory in humans / S. Crotty, R. Ahmed // *Semin. Immunol*. – 2004. – Vol. 16 (3). – P. 197-203.
100. Cunningham, M. Estrogen receptors in immunity and autoimmunity / M. Cunningham, G. Gilkeson // *Clin Rev Allergy Immunol*. – 2011. - Vol. 40(1). - P. 66–73.
101. Curtin, J.F. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis / J.F. Curtin, T.G. Cotter // *Cell Signal*. - 2003. – Vol. 15 (11). – P. 983-992.
102. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface / J. Hanna, D. Goldman-Woh, Y. Hamani et al. // *Nat Med*. – 2006. - Vol. 12(9). - P. 1065–1074.
103. Deficiency of naive T cells in patients with sudden deafness / J.R. García-Berrocal, J.A. Vargas, R.A. Ramírez-Camacho et al. // *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. – 1997. – Vol. 123(7). – P. 712-714.
104. Dehydroepiandrosterone and metyrapone partially restore the adaptive humoral and cellular immune response in endotoxin immunosuppressed mice / B. Rearte, A. Maglioco, D. Machuca et al. // *Innate Immun*. – 2013. - Vol. 20(6). - P. 585-597.
105. Dehydroepiandrosterone modulates T-cell response after major abdominal surgery / S. Pratschke, V. von Dossow-Hanfstingl, J. Dietz et al. // *J Surg Res*. – 2014. - Vol. 189(1). - P. 117-125.
106. Dehydroepiandrosterone: an ancestral ligand of neurotrophin receptors [Electronic resource] / I. Pediaditakis, I. Iliopoulos, I. Theologidis et al. // *Endocrinology*. – 2014. - Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25330101>.
107. Depletion of CD8+ cells abolishes the pregnancy protective effect of progesterone substitution with dydrogesterone in mice by altering the Th1/Th2 cytokine profile / S.M. Blois, R. Joachim, J. Kandil et al. // *J Immunol*. – 2004. – Vol. 172(10). - P. 5893–5899.

108. Depletion of endogenous tumor-associated regulatory T cells improves the efficacy of adoptive cytotoxic T cell immunotherapy in murine acute myeloid leukemia / Q. Zhou, C. Bucher, M.E. Munger et al. // *Blood*. – 2009. – Vol. 114(18). – P. 3793-3802.
109. Dexamethasone inhibits human interleukin 2 but not interleukin 2 receptor gene expression in vitro at the level of nuclear transcription / D.T. Boumpas, E.D. Anastassiou, S.A. Older. et al. // *J. Clin. Invest.* - 1991. – Vol. 87(5). – P. 1739–1747.
110. Dexamethasone inhibits the early steps of antigen receptor signaling in activated T lymphocytes / E. Baus, F. Andris, P. M. Dubois et al. // *J. Immunol.* - 1996. - Vol. 156(12). - P. 4555–4561.
111. Dexamethasone treatment has no effect on the formation of pneumococcal antibodies during community-acquired pneumonia / S.P. van Mens, S.C. Meijvis, J.C. Grutters et al. // *Clin Vaccine Immunol.* - 2012. - Vol. 19(5). - P. 811-813.
112. Differences between naive and memory T cell phenotype in Malawian and UK adolescents: a role for Cytomegalovirus? / A. Ben-Smith, P. Gorak-Stolinska, S. Floyd et al. // *BMC Infect Dis.* - 2008. - Vol. 8. - P. 139.
113. Differential effects of sex steroids on T and B cells: modulation of cell cycle phase distribution, apoptosis and bcl-2 protein levels / R.W. McMurray, S. Suwannaroj, K. Ndebele et al.// *Pathobiology.* -2001. - Vol. 69(1). - P. 44-58.
114. Differential sensitivity of human naive and memory CD4+ T cells for dexamethasone / E.W. Nijhuis, B. Hinloopen, R.A. van Lier et al. // *Int Immunol.* – 1995. - Vol. 7(4). – P. 591-595.
115. Differential sensitivity of virgin and memory T lymphocytes to calcium ionophores suggests a buoyant density separation method and a model for memory cell hyporesponsiveness to Con A / R.A. Miller, K. Flurkey, M. Molloy et al. // *J.Immunol.* - 1991. - Vol. 147(9). - P. 3080-3086.
116. Distelhorst, C. W. Role of Calcium in Glucocorticosteroid-Induced Apoptosis of Thymocytes and Lymphoma Cells: Resurrection of Old Theories by New Findings / C. W. Distelhorst, G. Dubyak // *Blood*. – 1998. – Vol. 91(3). – P. 731-734.
117. Distinct functions of autoreactive memory and effector CD4+ T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis / W. Elyaman , P. Kivisäkk , J. Reddy et al. // *Am J. Pathol.* - 2008. - Vol. 173(2). - P. 411—422
118. Dörner, T. B cells in autoimmunity / T. Dörner, A.M. Jacobi, P.E. Lipsky // *Arthritis Res Ther.* – 2009. - Vol. 11(5). - P. 247.

119. Double-blind assessment of azelastine in the treatment of perennial allergic rhinitis / J. Grossman, P.C. Halverson, E.O. Meltzer et.al. // *Ann Allergy*. – 1994. - Vol. 73(2). - P. 141-146.
120. Dowd, D. R. Evidence that glucocorticoid- and cyclic AMP-induced apoptotic pathways in lymphocytes share distal events / D. R. Dowd, R. L. Miesfeld // *Mol. Cell. Biol.* – 1992. – Vol. 12(8). – P. 3600-3608.
121. Dozmorov, I.M. Generation of antigen-specific Th2 cells from unprimed mice in vitro: effects of dexamethasone and anti-IL-10 antibody / I.M. Dozmorov, R.A. Miller // *J Immunol.* – 1998. - Vol. 160(6). - P. 2700-2705.
122. Drappa, J. The Fas protein is expressed at high levels on CD41CD81 thymocytes and activated mature lymphocytes in normal mice but not in the lupus-prone strain, MRL lpr/lpr / J. Drappa, N. Brot, K. B. Elkon // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1993. – Vol. 90(21). – P. 10340–10344
123. Druckmann, R. Review: female sex hormones, autoimmune diseases and immune response / R. Druckmann // *Gynecol Endocrinol.* – 2001. – Vol. 15(6). - P. 69-76.
124. Dual-reactive B cells are autoreactive and highly enriched in the plasmablast and memory B cell subsets of autoimmune mice / E.M. Fournier, M.G. Velez, K. Leahy et al. // *J Exp Med.* – 2012. - Vol. 209(10). - P. 1797-1812.
125. Effect of gender and sex hormones on immune responses following shock / M.K. Angele, M.G. Schwacha, A. Ayala et al. // *Shock.* – 2000. – Vol. 14(2). - P. 81–90.
126. Effect of menstrual cycle variation in female sex hormones on cellular immunity and regulation / A. Weinberg, L. Enomoto, R. Marcus et al. // *J Reprod Immunol.* – 2011. - Vol. 89(1). - P. 70–77.
127. Effects of endogenous glucocorticoids on allergic inflammation and T(H)1 /T(H)2 balance in airway allergic disease / S. Zhang, Z. Shen, G. Hu, et al. // *Ann Allergy Asthma Immunol.* - 2009. – Vol. 103(6). – P. 525-534.
128. Effects of in vitro corticosteroids on B cell activation, proliferation, and differentiation / T.R. Cupps, T.L. Gerrard, R.J. Falkoff et al. // *J Clin Invest.* – 1985. - Vol. 75(2). - P. 754-761.
129. Effects of long-term estrogen treatment on IFN-gamma, IL-2 and IL-4 gene expression and protein synthesis in spleen and thymus of normal C57BL/6 mice / E. Karpuzoglu-Sahin, Y. Zhi-Jun, A. Lengi et al. // *Cytokine.* – 2001. - Vol. 14(4). - P. 208-217.
130. Ehlers, S. Differentiation of T cell lymphokine gene expression: the in vitro

- acquisition of T cell memory / S. Ehlers, K.A. Smith // *J Exp Med.* – 1991. – Vol. 173(1). – P. 25-36.
131. Ellery, J. M. Possible mechanism for the alpha subunit of the interleukin-2 receptor (CD25) to influence interleukin-2 receptor signal transduction / J. M. Ellery, P. J. Nicholls // *Immunol Cell Biol.* – 2002. – Vol. 80(4). – P. 351-359.
132. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death / S. Elmore // *Toxicol Pathol.* - 2007. - Vol. 35(4). - P. 495–516.
133. Enrichment of CD4+ CD25high T cell population in patients with systemic lupus erythematosus treated with glucocorticoids / A. Suarez, P. López, J. Gómez et al. // *Ann Rheum Dis.* – 2006. - Vol. 65(11). - P. 1512-1517.
134. ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions / M. Razandi, P. Oh, A. Pedram et al. // *Mol. Endocrinol.* - 2002. - V. 16(1). - P. 100-115.
135. Estradiol enhances primary antigen-specific CD4 T cell responses and Th1 development in vivo. Essential role of estrogen receptor alpha expression in hematopoietic cells / A. Maret, J.D. Coudert, L. Garidou, et al. // *Eur J Immunol.* – 2003. - Vol. 33(2). - P. 512-521.
136. Estradiol-dependent perforin expression by human regulatory T-cells / L. Valor, R. Teijeiro, C. Aristimuno et al. // *Eur J Clin Invest.* – 2011. - Vol. 41(4). - P. 357-364.
137. Estrogen activates telomerase / S. Kyo, M. Takakura, T. Kanaya et al. // *Cancer Res.* – 1999. - Vol. 59(23). - P. 5917–5921
138. Estrogen inhibition of EAE involves effects on dendritic cell function / H.Y. Liu, A.C. Buenafe, A. Matejuk et al. // *J Neurosci Res.* – 2002. - Vol. 70(2). - P. 238-248.
139. Estrogen modulates in vitro T cell responses in a concentration- and receptor-dependent manner: effects on intracellular molecular targets and antioxidant enzymes / H.P. Priyanka, H.C. Krishnan, R.V. Singh et al. // *Mol Immunol.* – 2013. - Vol. 56(4). – P. 328-339
140. Estrogen receptor alpha (ERalpha) deficiency in macrophages results in increased stimulation of CD4+ T cells while 17beta-estradiol acts through ERalpha to increase IL-4 and GATA-3 expression in CD4+ T cells independent of antigen presentation / K.C. Lambert, E.M. Curran, B.M. Judy et al. // *J Immunol.* – 2005. - Vol. 175(9). - P. 5716-5723.
141. Estrogen regulates CCR gene expression and function in T lymphocytes / R. Mo, J. Chen, A. Grolleau-Julius et al. // *J Immunol.* – 2005. - Vol. 174 (10). - P. 6023–6029.

142. Estrogen regulates lymphopoiesis / P.W. Kincade, K.L. Medina, K.J. Payne et al. // *The Menopause at the Millennium*. – 2000. – Vol. 2. – P. 171-174.
143. Estrogens in pregnancy and systemic lupus erythematosus / A. Doria, L. Iaccarino, P. Sarzi-Puttini et al. // *Ann N Y Acad Sci*. – 2006. – Vol. 1069. - P. 247-256.
144. Evaluating the effects of immunosuppressants on human immunity using cytokine profiles of whole blood / Z. Liu, X. Yuan, Y. Luo et al. // *Cytokine*. – 2009. - Vol. 45(2). - P. 141-147.
145. Evaluation of the IL2/IL21, IL2RA and IL2RB genetic variants influence on the endogenous non-anterior uveitis genetic predisposition / M.C. Cénit, A. Márquez, M. Cordero-Coma et al. // *BMC Med Genet*. - 2013. - 14:52.
146. Evan, G. A matter of life and cell death / G. Evan, T. Littlewood // *Science*. – 1998. – Vol. 281(5381). – P. 1317-1322.
147. 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 / V.Y. Talayev, I.Y. Zaichenko, O.N. Babaykina et al. // *Clin Exp Immunol*. – 2005. - Vol. 141(3). - P. 440-448.
148. Expansion of CD4⁺CD25⁺and FOXP3⁺ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction / L. Arruvito, M. Sanz, A.H. Banham et al. // *J Immunol*. – 2007. - Vol. 178(4). - P. 2572-2578.
149. Expression of membrane progesterone receptors on human T lymphocytes and Jurkat cells and activation of G-proteins by progesterone / C. Dosiou, A.E. Hamilton, Y. Pang et al. // *J Endocrinol*. – 2008. - Vol. 196(1). - P. 67–77.
150. Ex-vivo effect of dexamethasone on cytokine production from whole blood of septic patients: correlation with disease severity / E.J. Giamarellos-Bourboulis, I. Dimopoulou, A. Kotanidou et al. // *Cytokine*. – 2010. - Vol. 49(1). - P. 89-94.
151. Fedor, M.E. Effects of long-term low-dose corticosteroid therapy on humoral immunity / M.E. Fedor, A. Rubinstein // *Ann Allergy Asthma Immunol*. – 2006. – Vol. 97(1). – P. 113-116.
152. Fedor, M.E. Effects of long-term low-dose corticosteroid therapy on humoral immunity / M.E. Fedor, A. Rubinstein // *Ann Allergy Asthma Immunol*. – 2006. – Vol. 97(1). – P.113-116.
153. Foradori, C.D. Non-genomic actions of androgens / C.D. Foradori, M.J. Weiser, R.J. Handa // *Front Neuroendocrinol*. – 2008. - Vol. 29(2). - P. 169-181.

154. Functional assessment of pharmacological telomerase activators in human T cells / B. Molgora, R. Bateman, G. Sweeney et al. // *Cells*. – 2013. - Vol. 2(1). - P. 57-66.
155. Functional cross-talk among cytokines, T-cell receptor, and glucocorticoid receptor transcriptional activity and action / E. Arzt, D. Kovalovsky, L.M. Igaz et al. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* - 2000. - Vol. 917. - P. 672–677.
156. Gazzaniga, F.S. An anti-apoptotic role for telomerase RNA in human immune cells independent of telomere integrity or telomerase enzymatic activity [Electronic resource] / F.S. Gazzaniga, E.H. Blackburn // *Blood*. – 2014. - Mode of access <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25320237>.
157. Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. / S. Yeh, M.Y. Tsai, Q. Xu et al. // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2002. - Vol. 99. - P. 13498–13503
158. Gilmore, W. Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolipid protein-specific T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects / W. Gilmore, L.P. Weiner, J. Correale // *J Immunol*. – 1997. - Vol. 158(1). - P. 446-451.
159. Glucocorticoid augmentation of macrophage capacity for phagocytosis of apoptotic cells is associated with reduced p130Cas expression, loss of paxillin/pyk2 phosphorylation, and high levels of active Rac / K.M. Giles, K. Ross, A.G. Rossi et al. // *J Immunol*. – 2001. - Vol. 167(2). - P. 976-986.
160. Glucocorticoid hormones upregulate interleukin 2 receptor α gene expression / M. Lamas, E. Sanz, L. Martin-Parras et al. // *Cell. Immunol.* - 1993. - Vol. 151(2). - P. 437–450.
161. Glucocorticoid mediated inhibition of interleukin-2 receptor- α and - β subunit expression by human T cells / O.A. Batuman, A.P. Ferrero, A. Diaz et al. // *Immunopharmacology*. - 1994. - Vol. 27(1). - P. 43–55.
162. Glucocorticoid receptor translational isoforms underlie maturational stage-specific glucocorticoid sensitivities of dendritic cells in mice and humans / Y. Cao, I.K. Bender, A.K. Konstantinidis et al. // *Blood*. – 2013. - Vol. 121(9). - P. 1553-1562.
163. Glucocorticoid-induced apoptosis in early B cells from human bone marrow / D. Lill-Elghanian, K. Schwartz, L. King et al. // *Exp Biol Med (Maywood)*. – 2002. - Vol. 227(9). - P. 763-770.

164. Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1 / E. Ayroldi, O. Zollo, A. Macchiarulo et al. // *Mol Cell Biol.* – 2002. - Vol. 22(22). - P. 7929-7941.
165. Glucocorticoid-mediated inhibition of Lck modulates the pattern of T cell receptor-induced calcium signals by down-regulating inositol 1,4,5-trisphosphate receptors / M.W. Harr, Y. Rong, M.D. Bootman et al. // *J Biol Chem.* – 2009. - Vol. 284(46). - P. 31860-31871.
166. Glucocorticoids accelerate anti-T cell receptor-induced T cell growth. / G.J. Wieggers, M.S. Labeur, I.E. Stec et al. // *J. Immunol.* - 1995. - Vol. 155(4). - P. 1893–1902.
167. Glucocorticoids cause rapid dissociation of a T-cell-receptor-associated protein complex containing LCK and FYN / M. Löwenberg, A.P. Verhaar, J. Bilderbeek et al. // *EMBO Rep.* – 2006. - Vol. 7(10). - P. 1023-1029.
168. Glucocorticoids inhibit activation-induced cell death (AICD) via direct DNA-dependent repression of the CD95 ligand gene by a glucocorticoid receptor dimer / S. Baumann, A. Dostert, N. Novac et al. // *Blood.* – 2005. - Vol. 106(2). - P. 617-625.
169. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma / C. Karagiannidis, M. Akdis, P. Holopainen et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 2004. - Vol. 114(6). - P. 1425–1433.
170. Goleva, E. A role for STAT5 in the pathogenesis of IL-2-induced glucocorticoid resistance / E. Goleva, K.O. Kisich, D.Y. Leung // *J. Immunol.* - 2002. - Vol. 169(10). - P. 5934–5940.
171. Graca, L. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts / L. Graca, S.P. Cobbold // *J Exp Med.* – 2002. – Vol. 195(12). – P. 1641-1646.
172. Graff, R.J. The influence of the gonads and adrenal glands on the immune response to skin grafts / R.J. Graff, M.A. Lappé, G.D. Snell // *Transplantation.* – 1969. - Vol. 7(2). - P. 105-111.
173. Greil, R. On the role and significance of Fas (Apo-1/CD95) ligand (FasL) expression in immune privileged tissues and cancer cells using multiple myeloma as a model / R. Greil, A. Egle, A. Villunger // *Leukemia Lymphoma.* – 1998. – Vol. 31(5-6). – P. 477–490
174. Gruver-Yates, A.L. Tissue-specific actions of glucocorticoids on apoptosis: a double-edged sword / A.L. Gruver-Yates, J.A. Cidlowski // *Cells.* - 2013. - Vol. 2(2). - P. 202-223.

175. Hamel, K.M. Germinal center B-cells / K.M. Hamel, V.M. Liarski, M.R. Clark // *Autoimmunity*. – 2012. - Vol. 45(5). - P. 333-347.
176. Hazeldine, J. Dehydroepiandrosterone as a regulator of immune cell function / J. Hazeldine, W. Arlt, J.M. Lord // *J Steroid Biochem Mol Biol*. – 2010. - Vol. 120(2-3). - P. 127-136.
177. Heinlein, C.A. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions / C.A. Heinlein, C. Chang // *Mol Endocrinol*. – 2002. - Vol. 16(10). - P. 2181-2187.
178. High-dose methylprednisolone therapy in multiple sclerosis induces apoptosis in peripheral blood leukocytes / V.I. Leussink, S. Jung, U. Merschdorf et al. // *Arch Neurol*. – 200. - Vol. 58(1). - P. 91-97.
179. Horikawa, I. Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms / I. Horikawa, J.C. Barrett // *Carcinogenesis*. - 2003. - Vol. 24(7). - P. 1167–1176.
180. Horikawa, I. Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms / I. Horikawa , J.C. Barrett // *Carcinogenesis*. - 2003. - Vol. 24(7). - P.1167–1176.
181. Hormone replacement therapy affects various immune cell subsets and natural cytotoxicity / R. Brunelli, D. Frasca, G. Perrone et al. // *Gynecol Obstet Invest*. – 1996. - Vol. 41(2). - P. 128-131.
182. Human chorionic gonadotropin (HCG) activates monocytes to produce interleukin-8 via a different pathway from luteinizing hormone/HCG receptor system / K. Kosaka, H. Fujiwara, K. Tatsumi et al. // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2002. - Vol. 87(11). - P. 5199–5208.
183. Human chorionic gonadotropin as a central regulator of pregnancy immune tolerance / A. Schumacher, K. Heinze, J. Witte et al. // *J Immunol*. – 2013. - Vol. 190(6). - P. 2650–2658.
184. Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into the fetal-maternal interface during early human pregnancy / A. Schumacher, N. Brachwitz, S. Sohr et al. // *J Immunol*. – 2009. - Vol. 182(9). - P. 5488–5497.
185. Human chorionic gonadotropin is an immune modulator and can prevent autoimmune diabetes in NOD mice / L.Y. Khil, H.S. Jun, H. Kwon et al. // *Diabetologia*. – 2007. - Vol. 50(10). - P. 2147-2155.

186. Human naive and memory T lymphocytes differ in telomeric length and replicative potential / N.P. Weng, B.L. Levine, C.H. June et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 1995. - Vol. 92(24). - P. 11091–11094.
187. Humoral immunity and long-lived plasma cells / R.A. Manz, S. Arce, G. Cassese et al. // *Curr Opin Immunol.* - 2002. – Vol. 14(4). – P. 517–521.
188. Humoral immunity due to long-lived plasma cells / M.K. Slifka, R. Antia, J.K. Whitmire et al. // *Immunity.* - 1998. – Vol. 8(3). - P. 363–372.
189. Identification of two distinct elements mediating activation of telomerase (hTERT) gene expression in association with cell growth in human T cells / Y. Matsumura-Arioka, K. Ohtani, T. Hara et al. // *Int Immunol.* – 2005. - Vol. 17(2). - P. 207-215.
190. Identification of two distinct elements mediating activation of telomerase (hTERT) gene expression in association with cell growth in human T cells / Y. Matsumura-Arioka, K. Ohtani, T. Hara et al. // *Int Immunol.* – 2005. – Vol. 17(2). – P. 207–215.
191. IL-15 enhances the function and inhibits CD95/Fas-induced apoptosis of human CD4⁺ and CD8⁺ effector-memory T cells / Y.M. Mueller, V. Makar, P.M. Bojczuk et al. // *Int Immunol.* – 2003. - Vol. 15(1). - P. 49-58.
192. IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets / S. Letourneau, C. Krieg, G. Pantaleo et.al. // *J Allergy Clin Immunol.* - 2009. - Vol. 123(4). - P. 758-762.
193. IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets / S. Letourneau, C. Krieg, G. Pantaleo et.al. // *J AllergyClinImmunol.* - 2009. - Vol. 123(4). - P. 758-762.
194. Immune disorders in Women with premature ovarian failure in initial period / V.P. Chernyshov, T.V. Radysh, I.V. Gura et al. // *Am. J. of Reprod. Immunology.* – 2001. – Vol. 46. – P. 220-225.
195. Immune responses in human necatoriasis: association between interleukin-5 responses and resistance to reinfection / R.J. Quinnell, D.I. Pritchard, A. Raiko et al. // *J Infect Dis.* – 2004. - Vol. 190(3). - P. 430-438.
196. Immunobiology: the immune system in health and disease / Ch. Janeway P. Travers, M. Walport et al. - New York: Garland Science, 2004. - 848 p.
197. Immunochemical and flow cytometric analysis of androgen receptor expression in thymocytes / S.M. Viselli, N.J. Olsen, K. Shults et al. // *Mol Cell Endocrinol.* – 1995. - Vol. 109(1). - P. 19-26.

198. In vitro generated human memory-like T cells are CD95 type II cells and resistant towards CD95-mediated apoptosis / S.C. Fas, S. Baumann, A. Krueger et al. // *Eur J Immunol.* – 2006. - Vol. 36(11). - P. 2894-2903.
199. Inducible nitric oxide synthase in T cells regulates T cell death and immune memory / M. Vig, S. Srivastava, U. Kandpal et al. // *J Clin Invest.* – 2004. – Vol. 113(12). – P. 1734-1742.
200. Induction of hTERT expression and telomerase activity by estrogens in human ovary epithelium cells / S. Misiti, S. Nanni, G. Fontemaggi et al. // *Mol Cell Biol.* – 2000. - Vol. 20(11). - P. 3764-3771.
201. Induction of regulatory T cells by physiological level estrogen / P. Tai, J. Wang, H. Jin et al. // *J Cell Physiol.* – 2008. - Vol. 214(2). - P. 456-464.
202. Inhibition of diabetes in NOD mice by human pregnancy factor / N.A. Khan, A. Khan, H.F. Savelkoul et al. // *Hum Immunol.* – 2001. - Vol. 62(12). - P. 1315–1323.
203. Interferon-related and other immune genes are downregulated in peripheral blood leukocytes in the luteal phase of the menstrual cycle / C. Dosiou, R.B. Lathi, S. Tulac et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2004. - Vol. 89(5). - P. 2501–2504.
204. Interleukin-2 expression by a subpopulation of primary T cells is linked to enhanced memory/effector function / A. Saporov, F.H. Wagner, R. Zheng et al. // *Immunity.* – 1999. - Vol. 11(3). - P. 271-280.
205. Interleukin-2 gene variation impairs regulatory T cell function and causes autoimmunity / J. Yamanouchi, D. Rainbow, P. Serra et al. // *Nat Genet.* – 2007. – Vol. 39. – P. 329–337.
206. Ishida, Y. Heterogeneity of lymphocyte calcium metabolism is caused by T cell-specific calcium-sensitive potassium channel and sensitivity of the calcium ATPase pump to membrane potential / Y. Ishida, T.M. Chused // *J Exp Med.* – 1988. – Vol. 168(3). – P. 839-852.
207. Kofler, R. The molecular basis of glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoblastic leukemia cells / R. Kofler // *Histochem. Cell Biol.* – 2000. – Vol. 114(1). – P. 1-7.
208. Kovacs, W.J. Androgen receptors in human thymocytes / W.J. Kovacs, N.J. Olsen // *J Immunol.* – 1987. – Vol. 139(2). - P. 490–493.
209. Lahita, R.G. Effects of gender on the immune system. Implications for neuropsychiatric systemic lupus erythematosus / R.G. Lahita // *Ann N Y Acad Sci.* – 1997. - Vol. 823. - P. 247-251.

210. Lash, G.E. Review: functional role of uterine natural killer (uNK) cells in human early pregnancy decidua / G.E. Lash, S.C. Robson, J.N. Bulmer // *Placenta*. – 2010. – Vol. 31. – P. 87–92.
211. Lee, J.H. Progesterone suppresses the mTOR pathway and promotes generation of induced regulatory T cells with increased stability / J.H. Lee, J.P. Lydon, C.H. Kim // *Eur J Immunol*. – 2012. – Vol. 42(10). – P. 2683–2696.
212. Leimola-Virtanen, R. Hormone replacement therapy and some salivary antimicrobial factors in post- and perimenopausal women / R. Leimola-Virtanen, H. Helenius, M. Laine // *Maturitas*. – 1997. – Vol. 27(2). – P. 145-151.
213. Leposavic, G. Age-associated remodeling of thymopoiesis: role for gonadal hormones and catecholamines / G. Leposavic, M. Perisic // *Neuroimmunomodulation*. – 2008. – Vol. 15(4-6). – P. 290-322.
214. Lin, J. T cell receptor signaling / J. Lin, A. Weiss // *J. Cell Sci*. – 2001. – Vol. 114(2). – P. 243-244
215. Lindenmann, M.J. Anti-apoptotic signaling by the interleukin-2 receptor reveals a function for cytoplasmic tyrosine residues within the common γ (gc) receptor subunit / M.J. Lindenmann, M. Benczik, S.L. Gaffen // *J. Biol. Chem*. – 2003. – Vol. 278(12). – P. 10239-10249.
216. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets / E.J. Wherry, V. Teichgräber, T.C. Becker et al. // *Nature Immunology*. – 2003. – Vol. 4(3). – P. 225 – 234.
217. Localization of androgen receptor expression in human bone marrow / A. Mantalaris, N. Panoskaltsis, Y. Sakai et al. // *J Pathol*. – 2001. – Vol. 193(3). – P. 361–366.
218. Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. Baltimore longitudinal study of aging / S.M. Harman, E.J. Metter, J.D. Tobin et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab*. – 2001. – Vol. 86(2). – P. 724–731
219. Low testosterone elevates interleukin family cytokines in a rodent model: a possible mechanism for the potentiation of vascular disease in androgen-deficient males / B.M. Freeman, D.J. Mountain, T.C. Brock et al. // *J Surg Res*. – 2014. – Vol. 190(1). – P. 319-327.
220. Lowering effect of estrogen replacement treatment on immunoglobulins in menopausal women / M. Blum, D. Zacharovich, J. Pery et al. // *Rev. Fr. Gynecol*. – 1990. – Vol. 85(4). – P. 207-209.

221. Lu, N.Z. The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms / N.Z. Lu, J.A. Cidlowski // *Ann N Y Acad Sci.* – 2004. – Vol. 1024. - P. 102-123.
222. Lymphopenia-induced homeostatic proliferation of CD8+ T cells is a mechanism for effective allogeneic skin graft rejection following burn injury / R. Maile, C.M. Barnes, A.I. Nielsen et al. // *J Immunol.* – 2006. - Vol. 176(11). - P. 6717-6726.
223. Malek, T.R. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2 / T.R. Malek, A.L. Bayer // *Nat. Rev. Immunol.* - 2004. – Vol. 4(9). - P. 665–674.
224. McCrudden, A.B. Androgen receptor in the human thymus / A.B. McCrudden, W.H. Stimson // *Immunol Lett.* – 1984. - Vol. 8(1). - P. 49-53.
225. Mechanism of human chorionic gonadotrophin-mediated immunomodulation in pregnancy / A.S. Bansal, S.A. Bora, S. Saso et al. // *Expert Rev Clin Immunol.* – 2012. - Vol. 8(8). - P. 747–753.
226. Mechanism of telomerase induction during T cell activation / A.G. Bodnar, N.W. Kim R.B., Effros et al.// *Exp Cell Res.* – 1996. – Vol. 228 (1). – P. 58–64.
227. Mechanisms of androgen receptor activation and function / A.O. Brinkmann, L.J. Blok, P.E. de Ruiter et al. // *J Steroid Biochem Mol Biol.* – 1999. - Vol. 69(1-6). - P. 307-313.
228. Mechanisms of Glucocorticoid-mediated Apoptosis in Hematological Malignancies / S. Greenstein, K. Ghias, N.L. Krett et al. // *Clinical Cancer Research.* – 2002. – Vol. 8(7). – P. 1681-1694.
229. Mechanisms regulating the susceptibility of hematopoietic malignancies to glucocorticoid-induced apoptosis / R.V. Sionov, R. Spokoini, S. Kfir-Erenfeld et al. // *Adv Cancer Res.* - 2008. - Vol. 101. - P. 127-248.
230. Meeker, A.K. Telomerase is activated in the prostate and seminal vesicles of the castrated rat / A.K. Meeker, H.J. Sommerfeld, D.S. Coffey // *Endocrinology.* – 1996. - Vol. 137(12). - P. 5743–5746
231. Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis / B. Bartholome, C.M. Spies, T. Gaber et al. // *FASEB J.* – 2004. - Vol. 18(1). - P. 70-80.
232. Memory CD4 T cells emerge from effector T-cell progenitors / L.E. Harrington, K.M. Janowski, J.R. Oliver et al. // *Nature.* – 2008. – Vol. 452(7185). – P. 356-360.

233. Menstrual cycle and reproductive aging alters immune reactivity, NGF expression, antioxidant enzyme activities, and intracellular signaling pathways in the peripheral blood mononuclear cells of healthy women / H.P. Priyanka, U. Sharma, S. Gopinath et al. // *Brain Behavior and Immunity*. – 2013. – Vol. 32. - P. 131-143.
234. Michie, C.A. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms / C.A. Michie, A. McLean, C. Alcock et al. // *Nature*. - 1992. - Vol. 360(6401). – P. 264-265.
235. Miesfeld, R. L. Molecular genetics of corticosteroid action / R. L. Miesfeld // *Am. Rev. Respir. Dis.* – 1990. – Vol. 141(2). – P. 511-517.
236. Miyaura, H. Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids / H. Miyaura, M. Iwata // *J Immunol.* – 2002. - Vol. 168(3). - P. 1087–1094.
237. Moffett, A. Uterine NK cells: active regulators at the maternal-fetal interface / A. Moffett, F. Colucci // *J Clin Invest.* – 2014. - Vol. 124(5). - P. 1872–1879.
238. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation / S.M. Kaech, S. Hemby, E. Kersh et al. // *Cell*. 2002. - Vol. 111(6). – P. 837-851.
239. Molecular mechanisms for gender differences in susceptibility to T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice / M. Bao, Y. Yang, H.S. Jun // *J Immunol.* – 2002. - Vol. 168(10). - P. 5369-5375.
240. Mucosal immunity in the human female reproductive tract: cytotoxic T lymphocyte function in the cervix and vagina of premenopausal and postmenopausal women / H.D. White, G.R. Yeaman, A.L. Givan et al. // *Am J Reprod Immunol.* – 1997. - Vol. 37(1). - P. 30-38.
241. Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people / S. Koch, A. Larbi, E. Derhovanessian et al. // *Immun Ageing.* - 2008. - Vol. 5. - P. 6.
242. Nadkarni, S. Oestrogen and immunomodulation: new mechanisms that impact on peripheral and central immunity / S. Nadkarni, S. McArthur // *Curr Opin Pharmacol.* – 2013. - Vol. 13(4). - P. 576-581.
243. Natural killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth? / J. Zhang, Z. Chen, G.N. Smith et al. // *Cell Mol Immunol.* – 2011. - Vol. 8(1). - P. 1–11.
244. Nelson, B.H. IL-2, regulatory T cells, and tolerance / B.H. Nelson // *J. Immunol.* - 2004. - Vol. 172(7). - P. 3983–3988.

245. Novel mechanism for inhibition of human T cells by glucocorticoids. Glucocorticoids inhibit signal transduction through IL-2 receptor. / F. Paliogianni, S.S. Ahuja, J.P. Balow et al. // *J. Immunol.* - 1993. - Vol. 151(8). - P. 4081–4089.
246. Oakley, R.H. The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function / R.H. Oakley, M. Sar, J.A. Cidlowski // *J Biol Chem.* – 1996. - Vol. 271(16). - P. 9550-9559.
247. Oestrogen increases haematopoietic stem-cell self-renewal in females and during pregnancy / D. Nakada, H. Oguro, B.P. Levi et al. // *Nature.* – 2014. - Vol. 505(7484). - P. 555-558.
248. Olsen, N.J. Effects of androgens on T and B lymphocyte development / N.J. Olsen, W.J. Kovacs // *Immunol Res.* – 2001. - Vol. 23(2-3). - P. 281-288.
249. Olsen, N.J. Evidence that androgens modulate human thymic T cell output / N.J. Olsen, W.J. Kovacs // *J Investig Med.* – 2011. - Vol. 59(1). - P. 32-35
250. Ontogeny and localization of the cells produce IL-2 in healthy animals / M. Yamamoto, Y. Seki, K. Iwai et al. // *Cytokine.* – 2013. - Vol. 61(3). - P. 831-41.
251. Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes / L.C. Meagher, J.M. Cousin, J.R. Seckl et al. // *J Immunol.* – 1996. - Vol. 156(11). - P. 4422-4428.
252. Osterhage, J.L. Chromosome end maintenance by telomerase / J.L. Osterhage, K.L. Friedman // *J Biol Chem.* – 2009. - Vol. 284(24). - P. 16061-16065.
253. Oxidant-Mediated Mitochondrial Injury in Eosinophil Apoptosis: Enhancement by Glucocorticoids and Inhibition by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor / S.J. Gardai, R. Hoontrakoon, C.D. Goddard et al. // *J. Immun.* – 2003. – Vol. 170(1). – P. 556-566.
254. Paiva, R.M. Telomere dysfunction and hematologic disorders / R.M. Paiva, R.T. Calado // *Prog Mol Biol Transl Sci.* – 2014. - Vol. 125. - P. 133-157.
255. Palacios, S. Androgens and female sexual function / S. Palacios // *Maturitas.* - 2007. – Vol. 57(1). - P. 61–65.
256. Peripheral T cells are the therapeutic targets of glucocorticoids in experimental autoimmune encephalomyelitis / S. Wüst, J. van den Brandt, D. Tischner et al. // *J Immunol.* - 2008. – Vol. 180(12). – P. 8434-8443.
257. Pharmacokinetic variability caused by gender: do women have higher indinavir exposure than men? / D.M. Burger, M.C. Siebers, P.W. Hugen et al. // *J Acquir Immune Defic Syndr.* – 2002. - Vol. 29(1). - P. 101-102.

258. Pharmacology of glucocorticoids in rheumatoid arthritis / C.M. Spies, J.W. Bijlsma, G.R. Burmester et al. // *Curr Opin Pharmacol.* – 2010. - Vol. 10(3). - P. 302-307.
259. Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells / I. Sanz, C. Wei, F.E. Lee et al. // *Semin Immunol.* – 2008. - Vol. 20(1). - P. 67-82.
260. Poole, J.C. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT) / J.C. Poole, L.G. Andrews, T.O. Tollefsbol // *Gene.* – 2001. - Vol. 269(1-2). - P. 1-12.
261. Postinjury multiple organ failure: a bimodal phenomenon / F. A. Moore, A. Sauaia, E. E. Moore et al. // *J Trauma.* – 1996. – Vol. 40(4). - P. 501–510
262. Preferential cell death of CD8⁺ effector memory (CCR7-CD45RA⁻) T cells by hydrogen peroxide-induced oxidative stress / A. Takahashi, M.G. Hanson, H.R. Norell et al. // *J Immunol.* - 2005. - Vol. 174(10). - P. 6080-6087.
263. Premature senescence of T lymphocytes from patients with β -thalassemia major / M. Gharagozloo, B. Bagherpour, M. Tahanian et al. // *Immunol Lett.* – 2009. – Vol. 122(1). –P. 84–88.
264. Pritchard, D.I. Is *Necator americanus* approaching a mutualistic symbiotic relationship with humans? / D.I. Pritchard, A. Brown // *Trends Parasitol.* – 2001. - Vol. 17(4). - P. 169-172.
265. Pritchard, D.I. The relationship between immunological responsiveness controlled by T-helper 2 lymphocytes and infections with parasitic helminths / D.I. Pritchard, C. Hewitt, R. Moqbel // *Parasitology.* – 1997. – Vol. 115. - P. 33-44.
266. Progesterone and maintenance of pregnancy: is progesterone nature's immunosuppressant? / P.K. Siiteri, F. Febres, L.E. Clemens et al. // *Ann N Y Acad Sci.* – 1977. – Vol. 286. - P. 384–397.
267. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones / M.P. Piccinni, M.G. Giudizi, R. Biagiotti et al. // *J Immunol.* – 1995. - Vol. 155(1). - P. 128–133
268. Progesterone increases systemic and local uterine proportions of CD4⁺CD25⁺ Treg cells during midterm pregnancy in mice / G. Mao, J. Wang, Y. Kang et al. // *Endocrinology.* – 2010. - Vol. 151(11). - P. 5477–5488.

269. Progesterone promotes differentiation of human cord blood fetal T cells into T regulatory cells but suppresses their differentiation into Th17 cells / J.H. Lee, B. Ulrich, J. Cho et al. // *J Immunol.* – 2011. - Vol. 187(4). - P. 1778–1787.
270. Progesterone suppresses Th17 cell responses, and enhances the development of regulatory T cells, through thymic stromal lymphopoietin-dependent mechanisms in experimental gonococcal genital tract infection / L. Xu, B. Dong, H. Wang et al. // *Microbes Infect.* – 2013. - Vol. 15(12). - P. 796–805.
271. Progesterone-induced blocking factor activates STAT6 via binding to a novel IL-4 receptor / N. Kozma, M. Halasz, B. Polgar et al. // *J Immunol.* – 2006. - Vol. 176(2). - P. 819–826.
272. Prognostic role of serum cytokines in patients with nasopharyngeal carcinoma / K. Lu, X. Feng, Q. Deng et al. // *Onkologie.* – 2012. - Vol. 35(9). - P. 494-498.
273. Proliferation of uterine natural killer cells is induced by human chorionic gonadotropin and mediated via the mannose receptor / N. Kane, R. Kelly, P.T. Saunders et al. // *Endocrinology.* – 2009. - Vol. 150(6). - P. 2882–2888.
274. Prossnitz, E.R. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease / E.R. Prossnitz, M. Barton. // *Nature Reviews Endocrinology.* - 2011. - Vol. 7(12). - P. 715–726
275. Radbruch, A. Cell therapy for autoimmune diseases: does it have a future? / A. Radbruch, A. Thiel // *Ann Rheum Dis.* – 2004. – Vol. 63(2). – P.96-101.
276. Rat thymic dihydrotestosterone receptor: preparation, location and physiochemical properties / C.J. Grossman, P. Nathan, B.B. Taylor et al. // *Steroids.* – 1979. - Vol. 34(5). - P. 539-553.
277. Redondo, J.M. Inhibition of interleukin 2-induced proliferation of cloned murine T cells by glucocorticoids. Possible involvement of an inhibitory protein / J.M. Redondo, M. Fresno, A. López-Rivas // *Eur J Immunol.* - 1988. - Vol. 18(10). - P. 1555–1559.
278. Regulated expression of telomerase activity in human T lymphocyte development and activation / N.P. Weng, B.L. Levine, C.H. June et al. // *J. Exp. Med.* - 1996. -Vol. 183(6). - P. 2471–2479
279. Regulation of T cell subsets from naive to memory / L.L. Carter, X. Zhang, C. Dubey et al. // *J Immunother.* – 1998. – Vol. 21(3). – P. 181-187.
280. Regulatory and effector T-cells are differentially modulated by Dexamethasone / J. Pandolfi, P. Baz, P. Fernández et al. // *Clin Immunol.* - 2013. – Vol. 149. - P. 400–410.

281. Role of apoptosis-inducing factor (Aif) in the T cell lineage / S.B. Prabhu, J.K. Khalsa, H. Banerjee et al. // *Indian J Med Res.* – 2013. - Vol. 138(5). - P. 577-590
282. Role of Ox-LDL/LOX-1/NF- κ B signaling pathway in regulation of atherosclerotic plaque growth by testosterone in male rabbits / S. Li, Y. Guo, P. Zhu et al. // *Vascul Pharmacol.* – 2013. - Vol. 59(5-6). - P. 131-137.
283. Romagnani, S. T-cell subsets (Th1 versus Th2) / S. Romagnani // *Ann Allergy Asthma Immunol.* – 2000. – Vol. 85(1). – P. 9-18.
284. Saffar, A.S. The molecular mechanisms of glucocorticoids-mediated neutrophil survival / A.S. Saffar, H. Ashdown, A.S. Gounni // *Curr Drug Targets.* – 2011. - Vol. 12(4). - P. 556-562.
285. Salem, M.L. Estrogen, a double-edged sword: modulation of TH1- and TH2-mediated inflammations by differential regulation of TH1/TH2 cytokine production / M.L. Salem // *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* – 2004. - Vol. 3(1). - P. 97-104.
286. Sallusto, F. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance / F. Sallusto, J. Geginat, A. Lanzavecchia // *Annu Rev Immunol.* – 2004. – Vol. 22. – P. 745-763.
287. Sallusto, F. Monocytes join the dendritic cell family / F. Sallusto, A. Lanzavecchia // *Cell.* – 2010. – Vol. 143. – P. 339–340.
288. Sanders, M.E. Alterations in T cell subsets in multiple sclerosis and other autoimmune diseases / M.E. Sanders, M.W. Makgoba, S.Shaw // *Lancet.* – 1988. – Vol. 2(8618). – P. 1021.
289. Sanders, M.E. Human naive and memory T cells: reinterpretation of helper-inducer and suppressor-inducer subsets / M.E. Sanders, M.W. Makgoba, S.Shaw // *Immunol Today.* – 1988. - Vol. 9(7-8). - P. 195-199.
290. SAP is required for generating long-term humoral immunity / S. Crotty, E.N. Kersh, J. Cannons et al. // *Nature.* – 2003. – Vol. 421. – P. 282–287.
291. Prevention of critical telomere shortening by oestradiol in human normal hepatic cultured cells and carbon tetrachloride induced rat liver fibrosis / R. Sato, C. Maesawa, K. Fujisawa et al. // *Gut.* – 2004. - Vol. 53(7). - P. 1001-1009.
292. Schluns, K.S. Cytokine control of memory T-cell development and survival / K.S. Schluns, L. Lefrançois // *Nat Rev Immunol.* – 2003. - Vol. 3(4). - P. 269-279.
293. Schmidlin, H. New insights into the regulation of human B-cell differentiation / H. Schmidlin, S.A. Diehl, B. Blom // *Trends Immunol.* – 2009. - Vol. 30(6). - P. 277-285.

294. Selective expansion of memory CD4(+) T cells by mitogenic human CD28 generates inflammatory cytokines and regulatory T cells / M. Singh, S. Basu, C. Camell et al. // *Eur J Immunol.* - 2008. – Vol. 38(6). - P.1522-1532.
295. Selective regulation of bone cell apoptosis by translational isoforms of the glucocorticoid receptor / N.Z. Lu, J.B. Collins, S.F. Grissom et al. // *Mol Cell Biol.* – 2007. - Vol. 27(20). - P. 7143-7160.
296. Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity / M. Cutolo, A. Sulli, S. Capellino et al. // *Lupus.* – 2004. - Vol. 13(9). - P. 635-638.
297. Sex hormones, acting on the Tert gene, increase telomerase activity in human primary hematopoietic cells / R.T. Calado, W.T. Yewdell, K.L. Wilkerson et al. // *Blood.* – 2009. - Vol. 114(11). - P. 2236–2243.
298. Sex steroid receptors in peripheral T cells: absence of androgen receptors and restriction of estrogen receptors to OKT8-positive cells / J.H. Cohen, L. Danel, G. Cordier et al. // *J Immunol.* – 1983. - Vol. 131(6). - P. 2767–2771.
299. Shay, J.W. Hallmarks of telomeres in ageing research / J.W. Shay, W.E. Wright // *J Pathol.* - 2007. - Vol. 211(2). - P. 114-123.
300. Shipkova, M. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation / M. Shipkova, E. Wieland // *Clin Chim Acta.* – 2012. – Vol. 413(17-18). – P. 1338-1349.
301. Shlomchik, M.J. Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells / M.J. Shlomchik, F. Weisel // *Immunol Rev.* – 2012. - Vol. 247(1). - P. 52-63.
302. Smith, L.K. Glucocorticoid-induced apoptosis of healthy and malignant lymphocytes / L.K. Smith, J.A. Cidlowski // *Prog Brain Res.* – 2010. – Vol. 182. - P. 1-30.
303. Spaulding, C. Resistance to apoptosis in human CD8⁺ T cells that reach replicative senescence after multiple rounds of antigen-specific proliferation / C. Spaulding, W. Guo, R.B. Effros // *Exp Gerontol.* - 1999. - Vol. 34(5). - P. 633–644.
304. Specific estrogen binding sites in human lymphoid cells and thymic cells / L. Danel, G. Souweine, J.C. Monier et al. // *J Steroid Biochem.* - 1983. - V. 18(5). - P. 559–563.
305. Sprent, J. Cytokines and T cell homeostasis / J. Sprent, C.D. Surh // *Immunol Lett.* – 2003. - Vol. 85(2). - P. 145-149.

306. Stahn, C. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids / C. Stahn, F. Buttgereit // *Nat Clin Pract Rheumatol.* – 2008. - Vol. 4(10). - P. 525-533.
307. Starka, L. Dehydroepiandrosterone: A neuroactive steroid / L. Starka, M. Duškova, M. Hill // *J Steroid Biochem Mol Biol.* – 2014. - Vol. 0960-0760(14). - P. 68-65.
308. Stimson, W.H. Oestrogen and human T lymphocytes: presence of specific receptors in the T-suppressor/cytotoxic subset / W.H. Stimson // *Scand J Immunol.* – 1988. - Vol. 28(3). - P. 345–350.
309. Strasser, A. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system / A. Strasser, P.J. Jost, S.Nagata // *Immunity.* – 2009. - Vol. 30(2). - P. 180-192
310. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2 / Taniguchi T., Matsui H., Fujita T. et al. // *Nature.* - 1983. - Vol. 302(5906). - P. 305–310.
311. Subfertility and defective folliculogenesis in female mice lacking androgen receptor / Y.C. Hu, P.H. Wang, S. Yeh et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2004. - Vol. 101(31). - P. 11209–11214.
312. Systemic reduction of functionally suppressive CD4^{dim}CD25^{high}Foxp3⁺ Tregs in human second trimester pregnancy is induced by progesterone and 17beta-estradiol / J. Mjosberg, J. Svensson, E. Johansson et al. // *J Immunol.* – 2009. - Vol. 183(1). - P. 759–769.
313. Szekeres-Bartho, J. A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance / J. Szekeres-Bartho, T.G. Wegmann // *J Reprod Immunol.* – 1996. - Vol. 31(1–2). - P. 81–95.
314. Szekeres-Bartho, J. Progesterone in pregnancy; receptor-ligand interaction and signaling pathways / J. Szekeres-Bartho, M. Halasz, T. Palkovics // *J Reprod Immunol.* - 2009. - Vol. 83(1–2). - P. 60–64.
315. T cell costimulation by the TNF ligand BAFF / B. Huard, P. Schneider, D. Mauri et al. // *J Immunol.* – 2001. - Vol. 167(11). - P. 6225-6231.
316. T cell vaccination benefits relapsing progressive multiple sclerosis patients: a randomized, double-blind clinical trial [Electronic resource] / D. Karussis, H. Shor, J. Yachnin et al. // *PLoS One.* – 2012. - Vol. 7(12). - Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23272061>.
317. T cell vaccination in multiple sclerosis relapsing-remitting nonresponders patients / A. Achiron, G. Lavie, I. Kishner et al. // *Clin Immunol.* - 2004. - Vol. 113(2). - P. 155-60.

318. T cells use two directionally distinct pathways for cytokine secretion / M. Huse, B.F. Lillemeier, M.S. Kuhns et al. // *Nat Immunol.* – 2006. - Vol. 7(3). - P. 247-255.
319. T cells translate individual, quantal activation into collective, analog cytokine responses via time-integrated feedbacks [Electronic resource] / K.E.Tkach, D. Barik, G. Voisinne et al. // *Elife (Cambridge).* – 2014. – Vol. 3. - Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24719192>.
320. T-cell activation and the development of an apoptosis-resistant CD45RO+ T-cell population / M. Müller, J. Grunewald, D. Gigliotti et al. // *Scand J Immunol.* – 2003. – Vol. 57(3). – P. 254-260.
321. TCR-mediated activation promotes GITR upregulation in T cells and resistance to glucocorticoid-induced death / Y. Zhan, D.P. Funda, A.L. Every et al. // *Int Immunol.* - 2004. - Vol. 16(9). - P. 1315-1321.
322. Telomerase activity in human endometrium // S. Kyo, M. Takakura, T. Kohama et al. // *Cancer Res.* – 1997. - Vol. 57(4). - P. 610–614.
323. Telomere length of in vivo expanded CD4(+)CD25 (+) regulatory T-cells is preserved in cancer patients / D. Wolf, H. Rumpold, C. Koppelstätter et al. // *Cancer Immunol Immunother.* - 2006. - Vol. 55(10). - P. 1198–1208.
324. Telomere length of in vivo expanded CD4(+)CD25 (+) regulatory T-cells is preserved in cancer patients / D. Wolf, H. Rumpold, C. Koppelstätter et al. // *Cancer Immunol Immunother.* - 2006. - Vol. 55(10). - P. 1198–1208.
325. Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity / S. Zhao, W. Zhu, S. Xue et al. // *Cell Mol Immunol.* - 2014. - Vol. 11(5). - P. 428-437.
326. Testosterone and estrogen differently effect Th1 and Th2 cytokine release following trauma-haemorrhage / M.K. Angele, M.W. Knöferl, A. Ayala et al. // *Cytokine.* – 2001. - Vol. 16(1). - P. 22-30.
327. Testosterone receptor blockade restores cellular immunity in male mice after burn injury / K.A. Messingham, M. Shirazi, L.A. Duffner et al. // *J Endocrinol.* – 2001. – Vol. 169(2). - P. 299–308.
328. Testosterone replacement effectively inhibits the development of experimental autoimmune orchitis in rats: evidence for a direct role of testosterone on regulatory T cell expansion / M. Fijak, E. Schneider, J. Klug et al. // *J Immunol.* – 2011. - Vol. 186(9). - P. 5162-5172.

329. 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. - Vol. 183(1). - P. 164–171.
330. The Endocrine Milieu and CD4 T-Lymphocyte Polarization during Pregnancy / B. Polese, V. Gridelet, E. Araklioti et al. // *Front Endocrinol (Lausanne)*. – 2014. – Vol. 5. - P. 106.
331. The immune response during the luteal phase of the ovarian cycle: a Th2-type response? / M. Faas, A. Bouman, H. Moesa et al. // *Fertil Steril.* – 2000. - Vol. 74(5). - P. 1008–1013.
332. The kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system / M. Zen, M. Canova, C. Campana et al. // *Autoimmun Rev.* – 2011. - Vol. 10(6). - P. 305-310.
333. The molecular program induced in T cells undergoing homeostatic proliferation / A.W. Goldrath, C.J. Luckey, R. Park et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2004. – Vol. 101(48). – P. 16885-16890.
334. The role of Cd8+ T-cell replicative senescence in human aging / R.B. Effros, M. Dagarag, C. Spaulding et al. // *Immunol. Rev.* – 2005. - Vol. 205. - P. 147–157.
335. The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis / A. Krueger, S.C. Fas, S. Baumann et al. // *Immunol Rev.* – 2003. - Vol. 193. - P. 58-69.
336. The role of sex steroids and gonadectomy in the control of thymic involution / M. Hince, S. Sakkal, K. Vlahos et al. // *Cell Immunol.* - 2008. - Vol. 252 (1-2). - P. 122–138.
337. The wedelolactone derivative inhibits estrogen receptor-mediated breast, endometrial, and ovarian cancer cells growth [Electronic resource] / D. Xu, T.H. Lin, C.R. Yeh et al. // *Biomed Res Int.* – 2014. - Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25221777>.
338. 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 / J.F. Couse, J. Lindzey, K. Grandien et al. // *Endocrinology.* – 1997. - Vol. 138(11). - P. 4613–4621.
339. Tough, D.F. Immunological memory / D.F. Tough, J. Sprent, In: W.E. Paul, editor. // *Fundamental immunology*. 5th Ed. - Philadelphia: PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2003. – P. 865-899.

340. Transient corticosteroid treatment permanently amplifies the Th2 response in a murine model of asthma / R.E. Wiley, M. Cwiartka, D. Alvarez et al. // *J Immunol.* – 2004. – Vol. 172(8). – P. 4995-5005.
341. Treatment with methylprednisolone in relapses of multiple sclerosis patients: immunological evidence of immediate and short-term but not long-lasting effects / E.M. Martínez-Cáceres, M.A. Barrau, L. Brieva et al. // *Clin. Exp. Immunol.* - 2002. - Vol. 127(1). - P. 165-171.
342. Triggering of the T3-Ti antigen-receptor complex results in clonal T-cell proliferation through an interleukin 2-dependent autocrine pathway / S.C. Meuer, R.E. Hussey, D.A. Cantrell et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.* - 1984. - Vol. 81(5). – P. 1509–1513.
343. Triggering of the T3-Ti antigen-receptor complex results in clonal T-cell proliferation through an interleukin 2-dependent autocrine pathway / S.C. Meuer, R.E. Hussey, D.A. Cantrell et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1984. – Vol. 81(5). – P. 1509-1513.
344. TTP specifically regulates the internalization of the transferrin receptor / D. Tosoni, C. Puri, S. Confalonieri et al. // *Cell.* - 2005. – Vol. 123(5). - P. 875–888.
345. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in T cell development: sensitivity of human thymocytes / A.K. Simon, O. Williams, J. Mongkolsapaya et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2001. - Vol. 98(9). - P. 5158-5163.
346. Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood / S. Kimmig, G.K. Przybylski, C.A. Schmidt et al. // *J Exp. Med.* – 2002. – Vol. 195(6). – P. 789-794.
347. Wang, E. Regulation of apoptosis resistance and ontogeny of age-dependent diseases / E. Wang // *Exp Gerontol.* - 1997. – Vol. 32(4-5). - P. 471–484.
348. Weng, N.P. Telomere and adaptive immunity / N.P. Weng // *Mech Ageing Dev.* – 2008. - Vol. 129(1-2). - P. 60-66.
349. Whitacre, C. C. A gender gap in autoimmunity / C. C. Whitacre, S. C. Reingold, P. A. O’Looney // *Science.* – 1999. - Vol. 283(5406). - P. 1277–1278
350. Xu, Z. Negative regulation of CD45 by differential homodimerization of the alternatively spliced isoforms / Z. Xu, A. Weiss // *Nat. Immunol.* - 2002. - Vol. 3(8). - P. 764–771.
351. Yagel, S. The developmental role of natural killer cells at the fetal-maternal interface / S. Yagel // *Am J Obstet Gynecol.* – 2009. - Vol. 201(4). - P. 344–350.

352. Yakimchuk, K. Estrogen receptor α and β in the normal immune system and in lymphoid malignancies / K. Yakimchuk, M. Jondal, S. Okret // *Mol Cell Endocrinol.* - 2013. - Vol. 375(1-2). - P. 121-129.
353. Youinou, P. The late news on baf in autoimmune diseases / P. Youinou, J.O. Pers // *Autoimmun Rev.* – 2010. - Vol. 9(12). - P. 804-806.