

На правах рукописи

ЮРОВА
Кристина Алексеевна

**РОЛЬ ЦИТОКИНОВ, ИМЕЮЩИХ ОБЩУЮ γ -ЦЕПЬ РЕЦЕПТОРОВ
(IL-2, IL-7, IL-15), В РЕГУЛЯЦИИ МЕХАНИЗМОВ МОЛЕКУЛЯРНО-
ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ Т-КЛЕТОК**

03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2015

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

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Литвинова Лариса Сергеевна

Официальные оппоненты:

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

Воронкова Ольга Владимировна

доктор медицинских наук,
профессор, директор ФГУП «Гос.
НИИ ОЧБ» ФМБА России

Симбирцев Андрей Семенович

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения российской академии наук (г. Екатеринбург)

Защита состоится 25 июня в ___ на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, г. Томск, Московский тракт, 2)

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

Автореферат разослан «___» _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Петрова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Для нормального функционирования иммунной системы требуется как значительное разнообразие составляющих ее клеток, так и быстрая способность клеточного звена адаптироваться и реагировать на изменение условий окружающей среды. Цикл функциональных преобразований иммунокомпетентных клеток в ответ на их антигенную стимуляцию требует изменения экспрессии множества белков. В связи с этим, приоритетной задачей физиологии иммунного ответа является выяснение механизмов регуляции генной активности клеток врожденного и адаптивного иммунитета (Mustelin T., Tasken K., 2003; De Arras L., Alper S., 2013). Одним из таких механизмов является альтернативный сплайсинг. Современные исследования показывают, что первичные транскрипты почти 95% всех генов человека подвергаются альтернативному сплайсингу, причем с уклоном в сторону генов, экспрессирующихся в нервной и иммунной системах (Evsyukova I. et al., 2010). Сплайсинг мРНК предполагает точное удаление интронов и присоединение экзонов для получения белок-кодирующих мРНК (Ip Y.J. et al., 2007). У высших эукариот последовательности сайта сплайсинга сильно вырождены, и, как правило, не содержат достаточной информации для точного определения места расщепления и лигирования (Motta-Mena V.L. et al., 2010). Несмотря на то, что изучение механизмов альтернативного сплайсинга в иммунокомпетентных клетках находится на начальных стадиях исследований, поиск литературы в интернет базе данных NCBI по ключевым словам «альтернативных сплайсинг» и «иммунная система» выдает почти две тысячи работ. Однако только сейчас научное сообщество начало осознавать важность альтернативного сплайсинга в регуляции функций иммунной системы (Heyd F. et al., 2006, 2010; Whistler T. et al., 2010; Martinez M.N., Lynch W.K., 2013; Rodrigues R. et al., 2013).

Степень проработанности темы. В последнее десятилетие удалось выявить некоторые механизмы, посредством которых сплайсинг генов может изменяться в ответ на антигенную стимуляцию (Ip Y. J. et al., 2007; Melton A.A. et al., 2007; Rodrigues R. et al., 2013). Показано, что сходные или перекрывающиеся механизмы могут определять сплайсинг множества генов, координируя регуляцию функционально близких белков. В частности, сплайсинг транскриптов, кодирующих молекулу CD45, значительно изменяется в ответ на продолжительную активацию Т-клеток (Hess K. et al., 2004; Motta-Mena V.L. et al., 2010; Butte J.M. et al., 2012). Важность регуляции альтернативного сплайсинга у человека иллюстрируется геном *Ptpnc*, пре-мРНК которого состоит из 33 экзонов. *Ptpnc* кодирует лейкоцитарный рецептор CD45, крайне важный для функциональной активности Т-клеток человека (Wu Z. et al., 2010). В частности, молекула CD45 - трансмембранная тирозиновая протеинфосфатаза, на иммунокомпетентных клетках признана критическим регулятором сигнализации, опосредованной Т-клеточным рецептором (TCR) (Mustelin T. et al., 2003; McNeill L. et al., 2007).

В настоящее время выявлено три гена (*U2af114*, *Gfi1*, *hnRNPLL*), продукты которых, взаимодействуя, регулируют процесс дифференцировки иммунокомпетентных клеток (Heyd F. et al., 2006; Melton A.A. et al., 2007; Heyd F., Lynch W. K., 2010; Butte J.M. et al., 2012). Известны мутации в гене *Ptpnc*, вносящие вклад в эффективность альтернативного сплайсинга молекулы CD45, и как следствие, в процесс дифференцировки Т-клеток (Tong A. et al., 2005; Topp D.J. et al., 2008; Evsyukova I. et al., 2012).

Цитокины семейства I типа (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 и IL-21), имеющие общую γ -цепь рецепторов, способны оказывать комплексное воздействие на клеточный гомеостаз Т-лимфоцитов разной степени дифференцировки (Schluns K. S., Lefrançois L., 2003; Ma A. et al., 2006; Tanel A. et al., 2009; Литвинова Л.С. и соавт., 2013). Мы предполагаем, что одним из механизмов, посредством которого цитокины, имеющие общую β -цепь рецепторов (IL-2, IL-7 и IL-15) принимают непосредственное участие в дифференцировке Т-клеток, может быть регуляция альтернативного сплайсинга гена *Ptprc*, что может определять исход как первичных, так и вторичных иммунных реакций.

В связи с вышесказанным, **целью исследования** явилось установление роли цитокинов, имеющих общую β -цепь рецепторов (IL-2, IL-7 и IL-15) в регуляции механизма молекулярно-генетического контроля дифференцировки Т-клеток, сопряженного с альтернативным сплайсингом гена *Ptprc*, кодирующего общелейкоцитарный рецептор - CD45.

Задачи исследования:

1. Оценить влияние цитокинов, имеющих общую γ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7 и IL-15) на уровни относительной экспрессии мРНК генов *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL*, регулирующих альтернативный сплайсинг гена *Ptprc* (кодирующего молекулу CD45) в Т-клетках, имеющих разную степень дифференцировки, в моделях гомеостатической и антигеннезависимой CD2/CD3/CD28 – стимуляции.
2. Исследовать влияние иммунорегуляторных цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) на взаимосвязь между транскрипцией мРНК гена *hnRNPLL* и мембранной экспрессией костимуляторной молекулы - CD28 в Т-клетках, имеющих разную степень дифференцировки, на фоне гомеостатической и антигеннезависимой CD2/CD3/CD28 – стимуляции.
3. Изучить влияние цитокинов, имеющих общую γ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7 и IL-15) на взаимосвязь между изменением уровней экспрессии генов *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL* и данными, характеризующими конверсию фенотипа наивных Т-лимфоцитов ($CD45RA^+CD62L^+$) и примированных ($CD45RO^+$) Т-клеток иммунной памяти на фоне гомеостатической и антигеннезависимой CD2/CD3/CD28 – стимуляции.
4. Установить общие закономерности и особенности влияния цитокинов, имеющих общую γ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7 и IL-15) на молекулярно-генетические аспекты дифференцировки Т-клеток, ассоциированные с механизмом альтернативного сплайсинга рецептора CD45 в условиях гомеостатической и активационной модели клеточного культивирования.

Научная новизна. Впервые показано, что процессы созревания и дифференцировки наивных ($CD45RA^+CD62L^+$) и примированных ($CD45RO^+$) Т-клеток, опосредованные действием цитокинов, имеющих общую β -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15), осуществляются за счет изменения экспрессии генов - *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL*, регулирующих альтернативный сплайсинг гена *Ptprc* (кодирующего молекулу CD45). Приоритетными являются данные, что изменения активности генов, регулирующих альтернативный сплайсинг гена *Ptprc*, фенотипически сопровождаются увеличением числа $CD45RA^+CD45RO^+$ Т-клеток и снижением количества $CD28^+$ Т-лимфоцитов. Впервые продемонстрировано, что влияние цитокинов, имеющих общую β -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15) на созревание и дифференцировку наивных ($CD45+CD62L^+$) и примированных ($CD45RO^+$) Т-лимфоцитов *in vitro* носит дозозависимый характер и зависит от функционального состояния Т-клеток. Впервые установлено, что в культурах наивных ($CD45RA^+ CD62L^+$) Т-клеток, эффекты IL-2 ($1,0 \times 10^{-9}$ г/мл) и IL-15 ($0,1 \times 10^{-9}$ г/мл) в условиях гомеостатической активации *in vitro*,

сопровождается повышением уровней экспрессии мРНК генов *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL*, что фенотипически выражается ростом числа дубль-позитивных ($CD45RA^+/CD45RO^+$) Т-клеток и $CD28^-$ Т-лимфоцитов и свидетельствует о созревании и дифференцировке наивных Т-клеток. Доказано, что действие ИЛ-7, напротив, ограничивает активацию и дифференцировку наивных Т-клеток за счет дозозависимого угнетения экспрессии гена *U2af114*, и напротив, повышения экспрессии гена *Gfi1*. Влияние ИЛ-2 ($1,0 \times 10^{-9}$ г/мл) и ИЛ-7 ($0,1 \times 10^{-9}$ г/мл) на дифференцировку примированных Т-клеток в гомеостатической модели ассоциировано с увеличением экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1* и, напротив, с угнетением - мРНК гена *hnRNPLL*; эффекты ИЛ-15 ($1,0 \times 10^{-9}$ г/мл) сопряжены с повышением уровней экспрессии мРНК гена *hnRNPLL* и угнетением экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1*.

Впервые показано, что цитокины, имеющие общую γ -цепь рецепторов, ИЛ-2 и ИЛ-15 ($1,0 \times 10^{-9}$ г/мл) и ИЛ-7 ($0,1 \times 10^{-9}$ г/мл) при действии *in vitro* на TCR-активированные наивные ($CD45RA^+CD62L^+$) Т-лимфоциты, способствуют их дифференцировке и созреванию за счет угнетения экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1* и, напротив, активации - *hnRNPLL*. Низкие концентрации ИЛ-2 и ИЛ-15 ($0,1$ и $0,5 \times 10^{-9}$ г/мл) и максимальные ИЛ-7 ($0,1 \times 10^{-9}$ г/мл), ограничивают дифференцировку Т-клеток, индуцированную TCR-активацией. Продемонстрировано, что эффекты ИЛ-2 на дифференцировку активированных $CD45RO^+$ Т-клеток сопряжены с угнетением экспрессии гена *U2af114* и повышением транскрипции генов *Gfi1* и *hnRNPLL*. Напротив, влияние ИЛ-15 ($0,1$; $0,5 \times 10^{-9}$ г/мл) ассоциировано с однонаправленным повышением экспрессии генов *hnRNPLL* и *U2af114* и не затрагивает экспрессию гена *Gfi1*. На фоне CD2/CD3/CD28-активации *in vitro*, ИЛ-7 ограничивает дифференцировку примированных Т-клеток за счет дозозависимого угнетения экспрессии генов *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL*.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные знания фундаментального характера раскрывают новые, молекулярно-генетические аспекты цитокинопосредованной дифференцировки Т-клеток, ассоциированные с механизмом альтернативного сплайсинга гена *Ptprc* (кодирующего молекулу CD45) и могут быть востребованы для создания общей модели дифференцировки иммунокомпетентных клеток с выяснением участия альтернативного сплайсинга в механизмах регуляции функций иммунной системы. Практическая значимость полученных данных о роли иммунорегуляторных цитокинов, имеющих общую γ -цепь рецепторов (ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-15) в регуляции альтернативного сплайсинга гена *Ptprc* (кодирующего общий лейкоцитарный антиген CD45), может представлять интерес для расшифровки механизмов, ассоциированных с перестройкой иммунной системы (иммунный ответ на патогены инфекционной и неинфекционной природы, возрастные перестройки и т.д.) а также для разработки патогенетически обоснованных технологий коррекции иммунных нарушений при лечении целого ряда социально значимых заболеваний.

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 Инновационного парка БФУ им. И. Канта. В качестве материала исследования использовали первичные культуры наивных ($CD45RA^+CD62L^+$) и

примированных (CD45RO⁺) Т-лимфоцитов, полученные из взвеси мононуклеарных клеток периферической венозной крови здоровых доноров.

Основные методы исследования:

- 1) Иммуномагнитная сепарация (получение монокультур CD45RA⁺CD62L⁺ и CD45RO⁺ Т-лимфоцитов из взвеси мононуклеарных клеток здоровых доноров); 2) Культуральные методы исследования *in vitro*;
- 3) Оценка жизнеспособности наивных (CD45RA⁺CD62L⁺) и примированных (CD45RO⁺) Т-клеточных культур; определение поверхностных маркеров (CD4, CD8, CD28; CD45RA/CD45RO) на Т-клетках разной степени дифференцировки методом проточной цитометрии;
- 4) Определение уровней относительной экспрессии генов *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL* методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени;
- 5) Статистический анализ результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Альтернативный сплайсинг гена *Ptprc* (кодирующего молекулу CD45) регулируется цитокинами, имеющими общую β -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15), за счет изменения активности генов - *U2af114* *Gfi1* и *hnRNPLL*.
2. Цитокин-опосредованная регуляция альтернативного сплайсинга гена *Ptprc* (кодирующего молекулу CD45) определяется степенью дифференцировки Т-клеток и их активационным статусом.
3. Фенотипическим проявлением эффектов цитокинов, имеющих общую β -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15), на процессы созревания и дифференцировки наивных (CD45RA⁺CD62L⁺) и примированных (CD45RO⁺) Т-клеток является конверсия фенотипа (рост числа дубль-позитивных CD45RA⁺CD45RO⁺ клеток) и увеличение содержания CD28 - негативных Т-лимфоцитов.

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

Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на XVIII-ой межгородской научной конференции молодых учёных «Актуальные проблемы патофизиологии 2013», (г. Санкт-Петербург, 2013 г.); Объединенном иммунологическом форуме (Нижний Новгород, 2013 г.); Международной научно-практической конференции «Перспективы развития науки и образования» (г. Москва, 2013, 2015 гг.); XX международной заочной научно-практической конференции «Научная дискуссия: вопросы медицины» (г. Москва, 2013, 2015 гг.); III-ей Международной конференции «Фундаментальные и прикладные исследования в биологии» (Fundamental and applied research in biology 3rd international scientific conference) (Украина, г. Донецк, 2014 г.); Международной научно-практической конференции «Современные направления развития медицины-2014» (г. Брянск, 2014 г.); III-ей Европейской конференции по биологии и медицинским наукам (III European Conference on Biology and Medical Sciences) (Австрия, г. Вена, 2014 г.); Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы образования и науки» (г. Тамбов, 2014 г.), а также на научно-образовательных

семинарах на базе Лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского Федерального Университета им. И. Канта (г. Калининград, 2012-2015).

В работе приводятся результаты научно-исследовательских работ «Исследование молекулярно-биологических механизмов модуляции иммунологической памяти в норме и при аутоиммунной патологии» (ГК №П1252 от 27 августа 2009 г.); "Стероидная регуляция иммунной памяти» (Грант Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых - докторов наук (МД-4999.2012.7); «Разработка технологии дозозависимого управления процессами клеточного гомеостаза и функциональным состоянием Т-клеток памяти с применением биомолекул (цитокинов)» (Соглашение 14.132.21.1778 от 01.10.12 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ, из них 6 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 133 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырёх глав, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 23 рисунками и 6 таблицами. Библиографический указатель включает 249 источников (28 - отечественных и 221 - иностранных).

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

В основу работы положены результаты комплексного исследования 58 здоровых доноров (29 мужчин и 29 женщин в возрасте от 22 до 35 лет). *Критериями исключения* из исследования являлись: возраст моложе 18 и старше 35 лет; период обострения хронических воспалительных заболеваний; инфекционные, онкологические, аутоиммунные, наследственные и психические болезни; алкогольная и наркотическая зависимости. Материалом для исследования служила венозная кровь (20 мл), взятая из локтевой вены с помощью стандартных вакуумных систем "BD VACUTAINER TM" («Greiner-bio-one», Австрия), стабилизированная К₃ЭДТА. Разрешение на проведение исследования получено в локальном этическом комитете (№ 5 от 5 ноября 2013 г.). Все экспериментальные исследования проводились на базе лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий Инновационного парка БФУ им. И.Канта (зав. лабораторией – д-р мед. наук, Л.С. Литвинова).

В соответствии с поставленными целью и задачами исследования, нами были использованы *гомеостатическая* и *активационная модели клеточного культивирования in vitro*. Последняя отражает процесс взаимодействия Т-лимфоцитов разной степени дифференцировки с антиген-презентирующими клетками (АПК) (активация Т-клеток через CD2, CD3 и CD28).

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

Подсчёт клеточности в культурах Т-клеток разной степени дифференцировки проводили с помощью автоматического счётчика клеток (CountessTM Automated Cell Counter, «Invitrogen», США) с использованием красителя Trypan blue 0,4% («Invitrogen», США). Жизнеспособность составляла не менее 95-98% от общего числа клеток. В эксперименте использовали клеточные культуры, содержание CD3⁺CD45RA⁺CD62L⁺CD14⁻CD19⁻ и CD3⁺CD45RO⁺CD14⁻CD19⁻ клеток в которых, составляло, в среднем 97,5 ± 2,12%. Полученные культуры клеток с фенотипом - CD45RA⁺CD62L⁺ и CD45RO⁺ (1×10⁶ 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 рекомбинантных форм цитокинов – IL-2, IL-7, IL-15 и клеточный активатор («Miltenyi Biotec», Германия). В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали реагент T-Cell Activation/Expansion Kit human (Ac/Exp) («Miltenyi Biotec», Германия) - антибиотиновые частицы MACSiBeadTM с биотинилированными антителами против CD2⁺, CD3⁺, CD28⁺ человека.

Для выполнения исследования были использованы следующие варианты культивирования:

1. для гомеостатической модели: интактная проба; пробы с добавлением разных концентраций цитокинов: rIL-2/rIL-7 или rIL-15 (0,1×10⁻⁹ г/мл; 0,5×10⁻⁹ г/мл; 1,0×10⁻⁹ г/мл);

2. для активационной модели: интактная проба; проба с добавлением Т-клеточного активатора - Ac/Exp; пробы с добавлением разных концентраций цитокинов: rIL-2/rIL-7 или rIL-15 (0,1×10⁻⁹ г/мл; 0,5×10⁻⁹ г/мл; 1,0×10⁻⁹ г/мл) и Т-клеточного активатора.

Регистрацию жизнеспособности и подсчёт числа клеток в исследуемых клеточных культурах проводили с использованием реагента «GuavaViaCount» (Millipore, США) и одноименной программы, методом проточной лазерной цитометрии на проточном цитометре «GuavaEasyCite Plus» (Millipore, США), согласно протоколу производителя. Определение поверхностных маркеров CD4, CD8, CD28, CD45RA/CD45RO на Т-клетках разной степени дифференцировки осуществляли методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител. Регистрацию результатов проводили на проточном цитофлуориметре MACS Quant (“Miltenyi Biotec”, Германия). Данные цитометрического анализа были проанализированы с помощью программы «KALUZA Analysis Software» (Beckman Coulter, США).

После инкубации клеточные культуры центрифугировали 5 мин при 2000 об/мин, удаляли надосадочную жидкость, оставляя 100 мкл, тщательно ресуспендировали клеточный осадок и выделяли тотальную РНК с использованием ExtractRNA (водный раствор фенола и гуанидин-изотиоцианата) (ExtractRNA kit «Евроген», Россия). Полученную РНК

растворяли в 100 мкл воды, свободной от РНКаз и ДНКаз. Чистоту препаратов выделенной РНК определяли с помощью спектрофотометра (Nanovue Plus, GE Healthcare Bio-Sciences, Швеция). Анализировали результат отношения значений поглощения на длинах волн 260 нм и 280 нм (A260 нм/280 нм). Качество (целостность) выделенных образцов тотальной РНК определяли по индексу RIN (RNA Integrity Number). Концентрацию полученной РНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoVue Plus («GE Healthcare», США). Выделенная РНК была использована в реакции обратной транскрипции с применением реагентов MMLV Kit («Евроген», Россия). Для затравки использовали oligo(dT)23-primer в концентрации 20 мкМ. Для определения уровня относительной экспрессии гена была проведена мультиплексная RT-PCR с применением реагентов qPCRmixHS («Евроген», Россия), специфических зондов TaqMan и праймеров в концентрации 10 пМ («Beagle», Россия). В качестве матрицы использовались 5 мкл кДНК, в качестве референсного гена – ген GAPDH. Последовательности праймеров были подобраны и предварительно проверены с помощью он-лайн программы BLAST (таблица 1).

Таблица 1 - Нуклеотидная последовательность праймеров и проб

GF11_for 5'-TGGAGCAGCACAAAGCC-3'
GF11_rev 5'-GACAGTGTGGATGACCTCTTG-3'
U2af114_for 5'-CTTCACAACAAGCCGACATTC-3'
U2af114_rev 5'-CAAGGTTGTCGCACACATTC-3'
hnRPLL_for 5'-CTCTCAATTCAGAATCCGCTTTATC-3'
hnRPLL_rev 5'-CCATTGCTTGTATCCCATTTCTC-3'
GAPDH_for 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'
GAPDH_rev 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'
GF11_probe FAM-5'-CGCAGGAACGGAGCTTTGACTGTA-3'~BHQ-1
U2af114_probe FAM-5'-CCAGGAGGTGTTACAGAACTGCA-3'~BHQ-1
hnRPLL_probe FAM-5'-TATGCAACCCTGTTGGCAAAGTGC-3'~BHQ-1
GAPDH_probe HEX-5'-CAAGCTTCCCCTTCTCAGCC-3'~BHQ-1

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

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

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

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences). Оценку полученных результатов проводили методами статистического описания и проверки статистических гипотез (Кремер Н.Ш., 2004). При анализе имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (Колмогорова-Смирнова). Для каждой выборки вычисляли средневывборочные характеристики: для нормально распределенных выборок вычисляли среднее арифметическое (\bar{X}), ошибку среднего (m); для выборок, распределение которых отличалось от нормального: медиану (M), первый и третий квартили (Q₁, Q₃). Для оценки достоверности различий выборок, использовали

параметрический (критерий Стьюдента) или непараметрический (Вилкоксона) для зависимых выборок. С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный и регрессионный анализы. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ (Кремер Н.Ш., 2004).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изоформы молекулы CD45, генерированные путем альтернативного сплайсинга экзонов, отражают процесс дифференцировки Т-клеток во время антигензависимой активации иммунокомпетентных клеток и обладают разными свойствами при взаимодействии с лигандом (Lynch W.K., Weiss A, 2000, Alexander D.R., 2000; Tong A. et al., 2005; Литвинова Л.С. и соавт., 2013).

Продукты генов *hnRNPLL* (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein), вспомогательного фактора сплайсинга *U2AF26* (U2 smallnuclear RNA auxiliary factor 1 like 4, *U2af114*) и фактора транскрипции *Gfi1* (growth factor independent 1) участвуют в регуляции альтернативного сплайсинга молекулы CD45. Предполагают, что *U2AF26* и *hnRNPLL* способствуют исключению 4 экзона, что приводит к формированию коротких изоформ - CD45RO, тогда как *Gfi1* приводит к образованию более активной, высокомолекулярной формы рецептора - CD45RB или RA (Heyd F. et al., 2006).

Культивирование наивных ($CD45RA^+CD62L^+$) Т-клеток в присутствии rIL-2 сопровождалось однонаправленным (разной степени выраженности), дозопосредованным увеличением экспрессии мРНК изучаемых генов - *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL* ($r^2=0,83$, $r^2=0,77$, $r^2=0,80$, соответственно; $p \leq 0,05$) (рисунок 1).

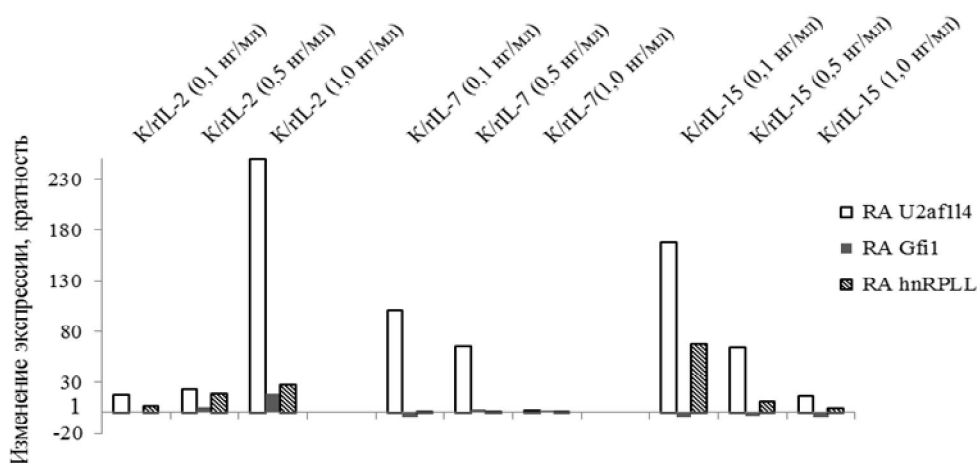


Рисунок 1 - Изменение относительных уровней транскрипции генов *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL* в $CD45RA^+CD62L^+$ Т-клетках в условиях культивирования *in vitro* с добавлением цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) в различной концентрации (к-кратность); к IL2-0,1–0,5-1,0/ к IL7-0,1–0,5-1,0/ к IL15-0,1–0,5-1,0 отношение уровня экспрессии мРНК в контрольных образцах (без воздействия) и пробах с добавлением rIL-2/IL-7/IL-15 (0.1 нг/мл; 0.5 нг/мл; 1.0 нг/мл).

Одновременное повышение экспрессии мРНК всех изучаемых генов *hnRNPLL*, *U2af114* и *Gfi1* в наивных Т-клетках, ассоциированное с увеличением действующей концентрации IL-2, сопровождалось ростом числа дубль-позитивных $CD45RA^+/CD45RO^+$ Т-клеток (рисунок 2). Функциональную активность гена *hnRNPLL* ассоциируют с экспрессией мембранной костимулирующей молекулы

CD28. Предполагают, что это является дополнительным механизмом регуляции альтернативного сплайсинга рецептора CD45 (Butte J.M. et al, 2012).

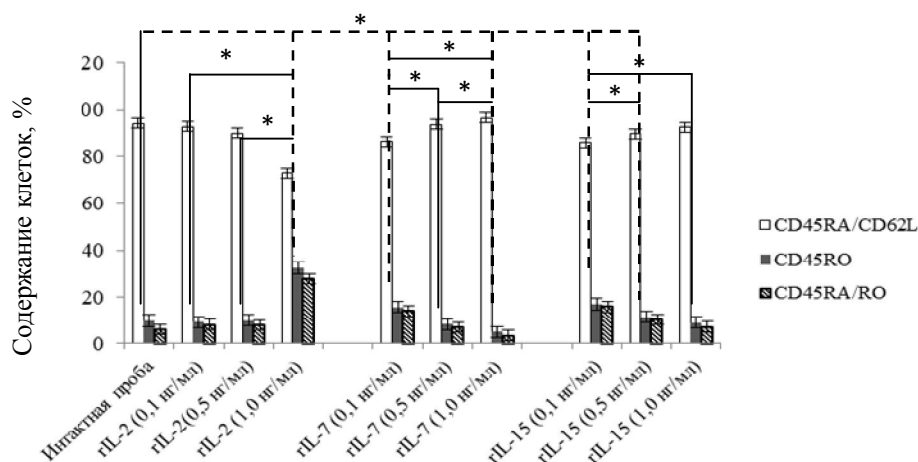


Рисунок 2 – Изменение содержания CD45RO⁺ и дубль-позитивных CD45RA⁺/CD45RO⁺ Т-клеток (%) в культурах CD45RA⁺CD62L⁺ Т-лимфоцитов в условиях инкубации *in vitro* с цитокинами, имеющими общую α -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15) с использованием гомеостатической модели клеточного культивирования *in vitro*. Примечание: * - достоверность различий ($p \leq 0,05$).

Выявленное нами снижение числа CD28⁺ Т-клеток в культурах наивных (CD45RA⁺CD62L⁺) Т-клеток (**таблица 2**), ассоциированное с дозопосредованным повышением экспрессии мРНК гена *hnRNPLL* ($r^2=0,83$, $p \leq 0,05$), наряду с эффективной конверсией их фенотипа (увеличение числа переходных изоформ CD45RA⁺/CD45RO⁺) может свидетельствовать о созревании и дифференцировке наивных Т-клеток под действием высоких концентраций rIL-2. Изменения равномерно затрагивали CD4⁺ и CD8⁺ субпопуляции наивных Т-клеток (**таблица 2**). Противоположным действием на наивные Т-клетки обладали rIL-7 и rIL-15. Снижение транскрипции мРНК гена *U2af114*, регистрируемое после окончания срока инкубации, в культурах наивных (CD45RA⁺CD62L⁺) Т-клеток коррелировало с повышением концентраций IL-7 ($r^2= -0,81$, $p \leq 0,05$) и IL-15 ($r^2= -0,86$, $p \leq 0,05$) в среде инкубации. Экспрессия гена *Gfi1* увеличивалась пропорционально возрастанию дозы IL-7 в среде культивирования ($r^2=0,78$, $p \leq 0,05$) и равномерно повышалась (в среднем, в 2,5 раза) при добавлении IL-15 в широком диапазоне концентраций (**рисунок 1**). Повышение числа Т-лимфоцитов, несущих двойную позитивную метку CD45RA⁺/CD45RO⁺ регистрировалось в культурах наивных Т-клеток при инкубации с минимальными концентрациями rIL-7 ($0,1 \times 10^{-9}$ г/мл) и rIL-15 ($0,1$ и $0,5 \times 10^{-9}$ г/мл) (**рисунок 2**).

Возможно, что рост числа дубль-позитивных CD45RA⁺/CD45RO⁺ Т-клеток при добавлении rIL-7 и rIL-15 может быть обусловлен способностью этих цитокинов увеличивать синтез IL-2 и экспрессию его рецептора (IL-2Ra, CD25) на поверхности Т-лимфоцитов, что способствует повышению восприимчивости клеток к активационным сигналам (Бойчук С.В., Дунаев П.Д., 2008; Литвинова Л.С., 2013). Высокие концентрации rIL-7 ($1,0 \times 10^{-9}$ г/мл), но не rIL-15, наряду с подавлением экспрессии гена *U2af114* и увеличением *Gfi1*, способствовали снижению числа дубль-позитивных CD45RA⁺/CD45RO⁺ Т-клеток ($r^2=-0,80$, $p \leq 0,05$) (**рисунок 2**). Одним из механизмов действия rIL-7, направленного на ограничение

активации наивных Т-клеток может быть индукция экспрессии гена *Gfi1*, который обладает способностью подавлять экспрессию генов, ответственных за пролиферацию клеток (van der Meer L.T. et al., 2010). Действие rIL-15 на транскрипцию мРНК гена *hnRNPLL* наивными (CD45RA⁺CD62L⁺) Т-клетками носило дозозависимый характер ($r^2 = -0,88$, $p \leq 0,05$) и было противоположным rIL-2 (**рисунок 1**). Повышение экспрессии гена *hnRNPLL*, индуцированное rIL-15 (0,1; 0,5x10⁻⁹ г/мл), имело четкую ассоциацию со снижением содержанием числа CD28⁺ Т-клеток (**таблица 2**).

Добавление IL-2 в среду инкубации CD45RO⁺ Т-лимфоцитов также индуцировало транскрипцию мРНК генов *U2af114* и *Gfi1*. Эффекты rIL-2 носили дозозависимый характер ($r^2 = 0,85$, $r^2 = 0,76$ соответственно; $p \leq 0,05$) (**рисунок 3**). rIL-2, напротив, угнетал экспрессию мРНК гена *hnRNPLL* в примированных (CD45RO⁺) Т-клетках (**рисунок 3**). Следует отметить, что после инкубации с IL-2, содержание дубль-позитивных CD45RA⁺/CD45RO⁺ Т-лимфоцитов увеличивалось (в среднем, в 2 раза) по сравнению с контролем. В тоже время снижение экспрессии мРНК гена *hnRNPLL*, коррелирующее с уменьшением числа CD8⁺CD28⁺ Т-клеток в культурах примированных (CD45RO⁺) лимфоцитов может свидетельствовать о цитокининдуцированной дифференцировке примированных Т-клеток, что подтверждено данными литературы (Ярилин А.А., 2010; Кудрявцев И.А., 2014).

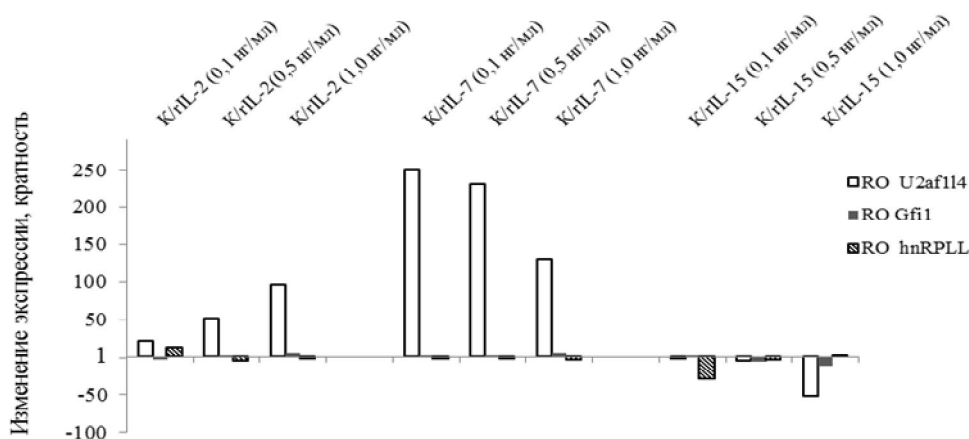


Рисунок 3 - Изменение относительных уровней транскрипции генов *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL* в CD45RO⁺ Т-клетках под влиянием цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) (кратность). Обозначения как в **рисунок 1**.

Добавление в среду культивирования Т-клеток памяти rIL-7, аналогично как в случае наивных (CD45RA⁺CD62L⁺) Т-клеток, приводила к снижению уровней экспрессии мРНК гена *U2af114* с увеличением действующей дозы цитокина ($r^2 = -0,82$, $p \leq 0,05$) (**рисунок 3**), а также равномерно угнетала экспрессию мРНК гена *hnRNPLL* (**рисунок 3**); число CD28⁺ Т-клеток снижалось только при инкубации CD45RO⁺ Т-клеток с минимальной концентрацией rIL-7 (0,1x10⁻⁹ г/мл), в основном, за счет популяции CD4⁺ Т-клеток (**таблица 2**). Дозозависимая динамика изменений экспрессии гена *U2af114* была противоположной *hnRNPLL* и *Gfi1*. Как уже упоминалось, rIL-7 обладает способностью активировать синтез Т-клетками IL-2, который, действуя аутокринно, может способствовать дифференцировке Т-клеток памяти в «зрелые эффекторы», для которых характерна потеря экспрессии молекулы костимуляции CD28. Тогда как высокие дозы rIL-7, блокируя экспрессию генов

системы IL-2, проявляют свое протективное биологическое действие в отношении гомеостаза Т-клеток.

Эффекты гIL-15 на CD45RO⁺ Т-клетки сопровождались дозозависимым снижением экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1* с увеличением концентрации цитокина ($r^2 = -0,78$, $r^2 = -0,76$ соответственно; $p \leq 0,05$) (рисунок 3). Культивирование Т-клеток (CD45RO⁺) памяти с IL-15, в целом, сопровождалось положительной динамикой изменения экспрессии мРНК гена *hnRNPLL* (рисунок 3). Достоверное снижение числа цитотоксических CD8⁺CD28⁺ Т-лимфоцитов регистрировалось при добавлении гIL-15 ($1,0 \times 10^{-9}$ г/мл) (таблица 2). Эффекты гIL-7 и IL-15 на примированные Т-клетки не сопровождались изменением числа лимфоцитов, несущих маркеры - CD45RA⁺CD62L⁺ и дубль-позитивных - CD45RA⁺/CD45RO⁺.

Таким образом, в гомеостатической модели активации *in vitro*, инкубация наивных (CD45RA⁺CD62L⁺) Т-клеток с цитокинами, имеющими общую α -цепь рецепторов (IL-2 - $1,0 \times 10^{-9}$ г/мл; IL-15 - $0,1 \times 10^{-9}$ г/мл), приводит к однонаправленному повышению экспрессии мРНК генов *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL* и сопровождается ростом числа дубль-позитивных (CD45RA⁺/CD45RO⁺) Т-клеток и CD28⁺ Т-лимфоцитов, что свидетельствует о цитокиноопосредованном созревании и дифференцировке наивных Т-клеток.

Данный тезис подтверждается фактами позитивной корреляции между уровнями относительной экспрессии мРНК генов *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL* и числом дубль-позитивных (CD45RA⁺/CD45RO⁺) Т-клеток ($r = 0,549$; $r = 0,620$; $r = 0,661$, $p < 0,05$ во всех случаях при действии IL-2 (IL-2 - $1,0 \times 10^{-9}$ г/мл) и $r = 0,631$; $r = 0,569$; $r = 0,554$, $p < 0,05$ во всех случаях при действии IL-15 ($0,1 \times 10^{-9}$ г/мл), соответственно) и отрицательной и содержанием CD28⁺ ($r = -0,623$; $r = -0,540$; $r = -0,451$, $p < 0,05$ во всех случаях при действии IL-2 ($1,0 \times 10^{-9}$ г/мл) и $r = -0,456$; $r = -0,720$; $r = -0,591$ $p < 0,05$ во всех случаях при действии IL-15 ($0,1 \times 10^{-9}$ г/мл), соответственно). IL-7 в гомеостатической модели *in vitro* ограничивает активацию и дифференцировку наивных Т-клеток за счет дозозависимого угнетения экспрессии гена *U2af114* ($r^2 = -0,81$, $p \leq 0,05$), и напротив, повышения мРНК гена транскрипционного фактора *Gfi1* и не влияет на экспрессию гена *hnRNPLL*. IL-7-индуцированные изменения ассоциированы со снижением числа CD45RA⁺/CD45RO⁺ Т-клеток на фоне неизменного количества CD28⁺ Т-лимфоцитов.

Действие цитокинов: IL-2 ($1,0 \times 10^{-9}$ г/мл) и IL-7 ($0,1 \times 10^{-9}$ г/мл) *in vitro* на культуры CD45RO⁺ Т-клеток (в гомеостатической модели клеточного культивирования *in vitro*) ассоциировано с увеличением экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1* и, напротив, с угнетением - мРНК гена *hnRNPLL* и сопровождается снижением числа CD28⁺ Т-лимфоцитов. В подтверждение вышесказанному, выявлены отрицательные ассоциации между уровнями экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1* и числом CD28⁺ Т-клеток ($r = -0,450$; $r = -0,620$; $p < 0,05$ при действии IL-2 ($1,0 \times 10^{-9}$ г/мл) и $r = -0,480$; $r = -0,540$; $p < 0,05$ при действии IL-7 ($0,1 \times 10^{-9}$ г/мл)), и, напротив, положительные между транскрипцией гена *hnRNPLL* с содержанием CD28⁺ Т-клеток ($r = 0,650$; $p < 0,05$ при действии IL-2 ($1,0 \times 10^{-9}$ г/мл) и $r = 0,440$; $p < 0,05$ при действии IL-7 ($0,1 \times 10^{-9}$ г/мл), соответственно). Влияние IL-15 ($1,0 \times 10^{-9}$ г/мл) на дифференцировку CD45RO⁺ Т-лимфоцитов, сопряжено с повышением мРНК гена *hnRNPLL* и, напротив, угнетением экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1*.

Вышесказанное подтверждается существованием зависимости, выявленной при проведении корреляционного анализа, между уровнями относительной экспрессии мРНК генов *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL* и числом CD28⁺ Т-клеток (соответственно $r = 0,736$; $r = 0,561$ и $r = -0,651$, $p < 0,05$ во всех случаях).

Таблица 2 - Содержание CD4⁺CD28⁺ и CD8⁺CD28⁺ Т-клеток (%) в культурах CD45RA⁺CD62L⁺ и CD45RO⁺Т-лимфоцитов в условиях инкубации с цитокинами, имеющими общую γ-цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15) с использованием гомеостатической модели (Me (Q₁-Q₃))

Варианты культивирования	CD45RA			CD45RO		
	CD28	CD4/28	CD8/28	CD28	CD4/28	CD8/28
Интактная проба	92,05 (85,02-97,31)	66,56 (58,81-69,21)	26,49 (22,51-29,52)	60,19 (56,89-65,56)	44,39 (38,05-48,56)	15,80 (10,38-17,18)
IL-2 (0,1 нг/мл)	91,31 (86,30-95,44)	64,62 (59,13-68,81)	28,71 (23,21-31,31)	56,36 (52,87-58,14)	44,24 (34,77-45,64)	12,34 (11,91-17,25)
IL-2 (0,5 нг/мл)	93,12 (89,13-98,36)	66,78 (61,11-71,17)	27,38 (22,12-29,66)	58,98 (56,49-61,90)	44,26 (39,45-46,06)	13,12 (10,90-14,57)
IL-2 (1,0 нг/мл)	70,34 (69,52-81,21)	53,37 (48,17-59,29)	17,44 (12,27-21,21)	48,36 (38,37-56,03)	41,01 (35,20-43,72)	6,47 (5,11-12,62)
	$p_0 < 0,05$	$p_0 < 0,05$	$p_0 < 0,05$	$p_0 < 0,05$	$p_0 < 0,05$	$p_0 < 0,05$
	$p_1 < 0,05$	$p_1 < 0,05$	$p_1 < 0,05$	$p_1 < 0,05$	$p_1 < 0,05$	$p_1 < 0,05$
	$p_2 < 0,05$	$p_2 < 0,05$	$p_2 < 0,05$	$p_2 < 0,05$	$p_2 < 0,05$	$p_2 < 0,05$
IL-7 (0,1 нг/мл)	94,56 (91,35-96,18)	67,32 (59,85-71,18)	27,09 (23,31-32,18)	52,77 (49,19-54,61)	42,62 (37,45-43,03)	10,15 (9,46-10,91)
	$p_0 < 0,05$	$p_0 < 0,05$	$p_0 < 0,05$	$p_0 < 0,05$	$p_0 < 0,05$	$p_0 < 0,05$
IL-7 (0,5 нг/мл)	90,02 (88,15-94,91)	61,34 (58,15-67,03)	29,32 (23,87-34,14)	57,88 (52,44-62,45)	43,47 (39,91-46,74)	12,19 (11,53-15,53)
IL-7 (1,0 нг/мл)	92,34 (88,15-95,43)	66,54 (61,23-69,43)	26,43 (23,75-29,59)	57,82 (50,58-62,30)	43,42 (36,30-44,71)	12,14 (11,34-16,19)
IL-15 (0,1 нг/мл)	75,32 (72,34-71,23)	58,34 (53,45-62,12)	17,43 (10,32-15,23)	55,17 (51,38-56,69)	41,71 (37,58-42,51)	12,38 (11,71-15,90)
	$p_0 < 0,05$	$p_0 < 0,05$	$p_0 < 0,05$	$p_0 < 0,05$	$p_0 < 0,05$	$p_0 < 0,05$
IL-15 (0,5 нг/мл)	71,04 (54,98-77,18)	43,69 (38,13-48,25)	18,37 (21,28-34,34)	54,95 (48,49-58,70)	42,18 (37,96-45,82)	12,16 (10,12-13,79)
	$p_0 < 0,05$	$p_0 < 0,05$	$p_0 < 0,05$	$p_0 < 0,05$	$p_0 < 0,05$	$p_0 < 0,05$
IL-15 (1,0 нг/мл)	91,72 (85,34-93,29)	66,59 (59,24-74,14)	23,13 (11,95-28,05)	49,32 (45,85-57,22)	41,98 (36,91-47,58)	8,15 (6,54-10,29)
	$p_0 < 0,05$	$p_0 < 0,05$	$p_0 < 0,05$	$p_0 < 0,05$	$p_0 < 0,05$	$p_0 < 0,05$
	$p_1 < 0,05$	$p_1 < 0,05$	$p_1 < 0,05$	$p_1 < 0,05$	$p_1 < 0,05$	$p_1 < 0,05$
	$p_2 < 0,05$	$p_2 < 0,05$	$p_2 < 0,05$	$p_2 < 0,05$	$p_2 < 0,05$	$p_2 < 0,05$

Примечание: p_0 - достоверность различий по сравнению с интактной пробой

p_1 - достоверность различий по сравнению с пробой с добавлением IL-2 (0,1 нг/мл)/IL-7(0,1 нг/мл)/IL-15 (0,1 нг/мл)

p_2 - достоверность различий по сравнению с пробой с добавлением IL-2 (0,5 нг/мл)/IL-7(0,5 нг/мл)/IL-15 (0,5 нг/мл)

p_3 - достоверность различий по сравнению с пробой с добавлением IL-2 (1,0 нг/мл)/IL-7(1,0 нг/мл)/IL-15 (1,0 нг/мл)

Таблица 3 - Содержание CD4⁺CD28⁺ и CD8⁺CD28⁺ Т-клеток (%), в культурах CD45RA⁺CD62L⁺ и CD45RO⁺ Т-лимфоцитов в условиях инкубации с цитокинами, имеющими общую γ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15) с использованием активационной модели (Me (Q₁-Q₃))

Варианты культивирования	CD45RA			CD45RO		
	CD28	CD4/28	CD8/28	CD28	CD4/28	CD8/28
Интантная проба	92,05 (85,02-97,31)	66,56 (58,81-69,21)	26,49 (22,51-29,52)	60,19 (56,89-65,56)	44,39 (38,05-48,56)	15,80 (10,38-17,18)
As/Exp	72,72 (68,38-77,85) p ₁ <0,05	56,47 (48,19-62,12) p ₁ <0,05	15,97 (13,32-19,47) p ₁ <0,05	51,09 (48,52-54,33) p ₁ <0,05	42,02 (41,97-51,67)	10,49 (7,35-12,91) p ₁ <0,05
As/Exp / IL-2 (0,1 нг/мл)	74,79 (69,02-78,18)	55,02 (49,97-61,92)	18,39 (15,58-23,45)	54,73 (51,96-56,59)	43,80 (42,16-45,60)	12,10 (9,87-17,76)
As/Exp / IL-2 (0,5 нг/мл)	71,70 (68,28-79,02)	55,63 (49,67-62,65)	16,91 (14,93-21,24)	61,05 (53,97-62,08)	45,28 (43,42-47,26)	12,00 (9,61-17,61)
As/Exp / IL-2 (1,0 нг/мл)	58,87 (47,12-63,62) p ₁ <0,05	46,94 (34,38-49,62) p ₁ <0,05	10,01 (9,19-12,67) p ₁ <0,05	45,10 (41,07-59,77) p ₁ <0,05	38,03 (34,58-41,52)	7,95 (6,05-8,29) p ₁ <0,05
As/Exp / IL-7 (0,1 нг/мл)	63,44 (57,28-68,54)	47,37 (42,98 - 51,27) p ₁ <0,05	16,68 (11,03-18,78)	57,25 (55,40-58,95)	46,12 (41,63-49,17)	12,22 (8,99-17,09)
As/Exp / IL-7 (0,5 нг/мл)	73,50 (68,86-78,08)	56,29 (51,13-61,80)	17,31 (14,67-21,98)	57,24 (53,04-58,19)	45,45 (43,49-50,03)	11,33 (7,46-16,72)
As/Exp / IL-7 (1,0 нг/мл)	73,14 (69,14-78,24)	57,32 (51,58-66,91)	16,37 (14,99-18,44)	55,28 (52,26-56,69)	42,61 (42,06-46,95)	13,84 (10,05-15,06)
As/Exp / IL-15 (0,1 нг/мл)	75,18 (68,50-78,62)	58,00 (54,38-60,66)	17,57 (16,74-20,16)	45,33 (38,78-49,57)	38,41 (35,15-42,92)	7,17 (6,62-10,07) p ₁ <0,05
As/Exp / IL-15 (0,5 нг/мл)	71,08 (67,79-76,49)	55,35 (49,39-59,65)	16,18 (12,51-18,63)	46,77 (44,34-48,82) p ₁ <0,05	39,51 (43,04-45,47)	8,20 (9,24-14,69) p ₁ <0,05
As/Exp / IL-15 (1,0 нг/мл)	62,97 (58,88-77,81) p ₁ <0,05	53,46 (48,32-64,88)	9,17 (8,58-11,04) p ₁ <0,05	55,26 (52,55-58,11)	43,23 (41,97-46,52)	12,59 (9,51-16,96)

Примечание: p₁ - достоверность различий по сравнению с интактной пробой

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

p₂ - достоверность различий по сравнению с пробой с добавлением As/Exp + rIL-2 (0,1 нг/мл) / + rIL-15 (0,1 нг/мл)

p₃ - достоверность различий по сравнению с пробой с добавлением As/Exp + rIL-2 (0,5 нг/мл) / + rIL-15 (0,5 нг/мл)

p₄ - достоверность различий по сравнению с пробой с добавлением As/Exp + rIL-2 (1,0 нг/мл) / + rIL-15 (1,0 нг/мл)

Установлено, что сплайсинг транскриптов, кодирующих молекулу CD45, значительно изменяется в ответ на продолжительную активацию Т-клеток (Motta-Mena B.L. et al., 2010; Butte J.M. et al., 2012). Добавление Т-клеточного активатора в культуры CD45RA⁺CD62L⁺ и CD45RO⁺ Т-клеток, на фоне резкого сокращения числа живых Т-клеток, и напротив, усиления пролиферативной активности, сопровождалось выраженным, особенно в популяции CD45RO⁺ Т-лимфоцитов (более чем в 50 раз), угнетением экспрессии гена *U2af114*. Уровень транскрипции мРНК гена *Gfi1* у Т-клеток (CD45RO⁺) памяти был сопоставим с контролем, а у наивных (CD45RA⁺CD62L⁺) Т-клеток, напротив, снижался более чем в 16 раз. Изменения экспрессии гена *hnRNPLL* в культурах Т-клеток, имеющих разный дифференцировочный статус, носили разнонаправленный характер (**рисунки 4, 5**).

CD2/CD3/CD28-активация наивных (CD45RA⁺CD62L⁺) Т-лимфоцитов сопровождалась резким снижением числа CD8⁺CD28⁺ и CD4⁺CD28⁺ Т-клеток и усилением транскрипции мРНК гена *hnRNPLL*. TCR-активация CD45RO⁺ Т-лимфоцитов, напротив, приводила к значимому снижению числа CD8⁺CD28⁺ - лимфоцитов, на фоне глубокого угнетения экспрессии мРНК гена *hnRNPLL* (**таблица 3**). Интересен факт, что эффективная конверсия фенотипа наивных (CD45RA⁺CD62L⁺) Т-клеток, сопряженная с мембранной экспрессией короткого варианта CD45, происходила на фоне угнетения экспрессии генов - *U2af114* и *Gfi1*, и напротив, повышенной транскрипции мРНК гена *hnRNPLL*, тесно ассоциированного с молекулой CD28, что может свидетельствовать о дифференцировке наивных Т-лимфоцитов в клетки эффекторной и/или центральной памяти.

В отношении CD45RO⁺-Т-клеток, индуцированное активацией снижение числа CD28⁺ Т-клеток на фоне протекающих противоположных процессов: повышенной гибели и пролиферации, может свидетельствовать о дифференцировке примированных Т-клеток в зрелые эффекторы и терминально-дифференцированные Т-клетки, о чем свидетельствует повышение числа дубль-позитивных CD45RA⁺/CD45RO⁺ Т-клеток (в среднем, в 3 раза).

Культивирование наивных (CD45RA⁺CD62L⁺) Т-лимфоцитов с *CD2/CD3/CD28-активатором* и rIL-2, наряду с ростом количества клеток (в мл) и увеличением их жизнеспособности, сопровождалось дозозависимым, но разнонаправленным угнетением экспрессии мРНК обоих генов - *U2af114* и *Gfi1*: транскрипция гена *U2af114* снижалась с повышением действующей концентрации цитокина ($r^2 = -0,82$, $p \leq 0,05$), и, напротив, *Gfi1* – повышалась ($r^2 = 0,89$, $p \leq 0,05$) (**рисунок 4**). IL-2 на фоне *CD2/CD3/CD28-активации* дозозависимым образом увеличивал число дубль-позитивных CD45RA⁺/CD45RO⁺ Т-лимфоцитов ($r^2 = 0,87$, $p \leq 0,05$).

В то же время добавление в среду инкубации наивных (CD45RA⁺CD62L⁺) Т-лимфоцитов комбинации *анти-CD2/CD3/CD28-частиц* и rIL-2 ($1,0 \times 10^{-9}$ г/мл) сопровождалось снижением процентного содержания CD4⁺CD28⁺ и CD8⁺CD28⁺ Т-клеток (**таблица 3**) и увеличением экспрессии гена *hnRNPLL* (**рисунок 4**), что может свидетельствовать о созревании и дифференцировке наивных лимфоцитов в Т-клетки эффекторной и центральной памяти в условиях антигеннезависимой активации.

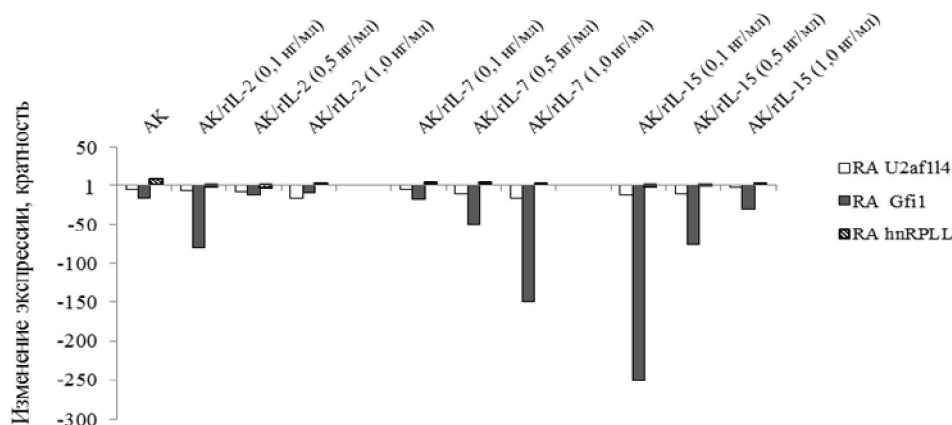


Рисунок 4 - Изменение относительных уровней транскрипции генов *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL* в $CD45RA^+CD62L^+$ Т-клетках в условиях культивирования *in vitro* с добавлением активатора и цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) в различной концентрации (кратность); АК – отношение уровня экспрессии мРНК в контрольных образцах (без воздействия) и образцах с Т-клеточным CD2/CD3/CD28-активатором; АК IL-2-0,1–0,5-1,0/ АК IL-7-0,1–0,5-1,0/ АК IL-15-0,1–0,5-1,0 отношение уровня экспрессии мРНК в образцах с Т-клеточным активатором и пробах с добавлением rIL-2/IL-7/IL-15 (0.1 нг/мл; 0.5 нг/мл; 1.0 нг/мл).

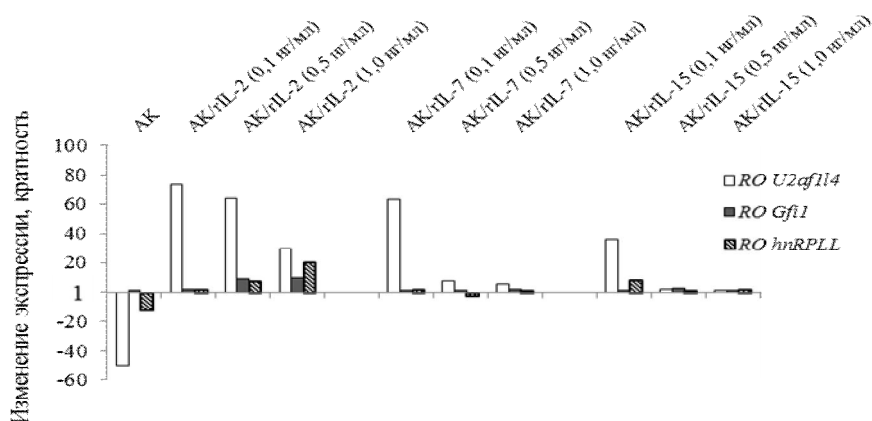


Рисунок 5 - Изменение относительных уровней транскрипции генов *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL* в $CD45RO^+$ Т-клетках в условиях культивирования *in vitro* с добавлением активатора и цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) (кратность). Обозначения как в **рисунке 4**.

IL-2 оказывал противоположные эффекты на $CD2/CD3/CD28$ -активированные примированные Т-клетки: дозозависимые эффекты IL-2 на $CD45RO^+$ Т-клетки были ассоциированы с их повышенной гибелью и сопровождались угнетением экспрессии *U2af114* ($r^2 = -0,81$, $p \leq 0,05$) с одновременным повышением транскрипции гена *Gfi1* ($r^2 = 0,83$, $p \leq 0,05$) (**рисунок 5**). Динамика изменений экспрессии гена *hnRNPLL* имела четкую зависимость от концентрации цитокина в среде культивирования: повышалась с увеличением дозы rIL-2 ($r^2 = 0,85$, $p \leq 0,05$) (**рисунок 5**). Добавление в среду культивирования наивных ($CD45RA^+CD62L^+$) Т-клеток комбинаций анти- $CD2/CD3/CD28$ -частиц и rIL-7, сопровождалось дозозависимым угнетением уровней экспрессии обоих генов *U2af114* и *Gfi1* ($r^2 = -0,81$, $r^2 = -0,79$ соответственно; $p \leq 0,05$). Закономерным явилось достоверное увеличение числа дубль-позитивных лимфоцитов

(CD45RA⁺/CD45RO⁺) в пробах с минимальной концентрацией rIL-7, тогда как его максимальная концентрация (1,0x10⁻⁹ г/мл) приводила к статистически значимому снижению числа клеток, несущих на своей поверхности маркеры дубль-позитивных CD45RA⁺/CD45RO⁺ Т-клеток (r²= -0,83; p≤0,05). Сочетанное действие активатора и rIL-7 в отношении экспрессии *hnRNPLL* и числа CD28⁺ - Т-клеток, было противоположно эффектам rIL-2: низкие концентрации цитокина (0,1x10⁻⁹ г/мл) снижали число клеток, экспрессирующих мембранную молекулу позитивной костимуляции, в основном, за счет CD4⁺ Т-клеток. Однако уровень транскрипции матричной РНК гена *hnRNPLL* оказался выше по сравнению со значениями, полученными при исследовании пробы только с добавлением анти-CD2/CD3/CD2-частиц, вероятно, именно это обстоятельство приводило к увеличению числа дубль-позитивных лимфоцитов CD45RA⁺/CD45RO⁺, на фоне глубоко подавления транскрипции мРНК генов *Gfi1* и *U2af11*. Возможный механизм действия экзогенного rIL-7 на CD2/CD3/CD28-активированные наивные Т-клетки может быть тесно ассоциирован с изменениями, индуцируемыми Т-клеточным активатором: экспрессия IL-2, усиленная TCR-активацией, приводит к подавлению мембранной экспрессии на поверхности клетки IL-7Rα-субъединицы (CD127) (Хуе Н.-Н. et al., 2002), что может снижать восприимчивость Т-клеток к экзогенному IL-7 (Schluns K.S. et al., 2000; Schluns K.S., Lefrançois L., 2003; Surh C.D., Sprent J., 2008; Бойчук С.В., Дунаев П.Д., 2008).

На фоне активации наивных (CD45RA⁺CD62L⁺) Т-клеток, высокие концентрации rIL-7 (1x10⁻⁹ г/мл), по принципу обратной связи, напротив, способствуют глубокому подавлению экспрессии мРНК обоих генов, что получило свое отражение в конверсии фенотипа наивных Т-клеток (**рисунок 6**). Действие IL-15 на активированные наивные Т-клетки было аналогичным эффектам IL-2 (**рисунок 4**). Изменения уровней транскрипции мРНК генов *U2af114* и *Gfi1*, индуцированные rIL-15, носили дозозависимый характер (r²= 0,83, r²= 0,77 соответственно; p≤0,05). Добавление rIL-15 (0,1x10⁻⁹ г/мл) приводило к снижению количества дубль-позитивных CD45RA⁺/CD45RO⁺ Т-клеток в культурах наивных (CD45RA⁺CD62L⁺) Т-лимфоцитов; максимальная доза – обладала противоположным действием (**рисунок 6**). Изменение относительного уровня экспрессии мРНК гена *hnRNPLL* при добавлении высокой концентрации rIL-15 имело взаимосвязь со снижением содержания CD8⁺CD28⁺ Т-клеток (r=-0,580, p<0,05) и, напротив, повышением числа CD45RA⁺/CD45RO⁺ Т-клеток (r=0,760, p<0,05), что может быть следствием антигеннезависимой, IL-15-индуцированной дифференцировки Т-клеток (**рисунок 4**). Эффекты IL-7 и IL-15 на активированные CD45RO⁺ Т-клетки, в целом, сопровождалось снижением уровней экспрессии *U2af114* с увеличением концентрации цитокинов; динамика изменений транскрипции мРНК гена *Gfi1* была незначительной по сравнению с контрольными образцами (**рисунок 5**). Максимальные концентрации rIL-7 и IL-15, наряду со снижением экспрессии *U2af114*, оказывали протекторный эффект на культуру примированных Т-клеток, отменяя проапоптогенный эффект активатора. IL-7 нивелировал угнетающий эффект активирующих частиц на транскрипцию мРНК гена *hnRNPLL* (**рисунок 5**). Число Т-клеток, несущих мембранную молекулу костимуляции CD28⁺ и содержание дубль-позитивных (CD45RA⁺/CD45RO⁺) Т-клеток в CD45RO⁺ - культурах - не изменялось. Комбинация *анти-CD2/CD3/CD2-частиц* и rIL-15, в целом, оказывала стимулирующее действие на экспрессию мРНК гена *hnRNPLL*: самый высокий уровень регистрировался при добавлении

минимальной и средней концентраций цитокина (0,1 и $0,5 \times 10^{-9}$ г/мл) и был ассоциирован со снижением* числа $CD28^+$ Т-клеток.* Выявленные изменения сопровождались увеличением числа дубль-позитивных $CD45RA^+/CD45RO^+$ Т-клеток.

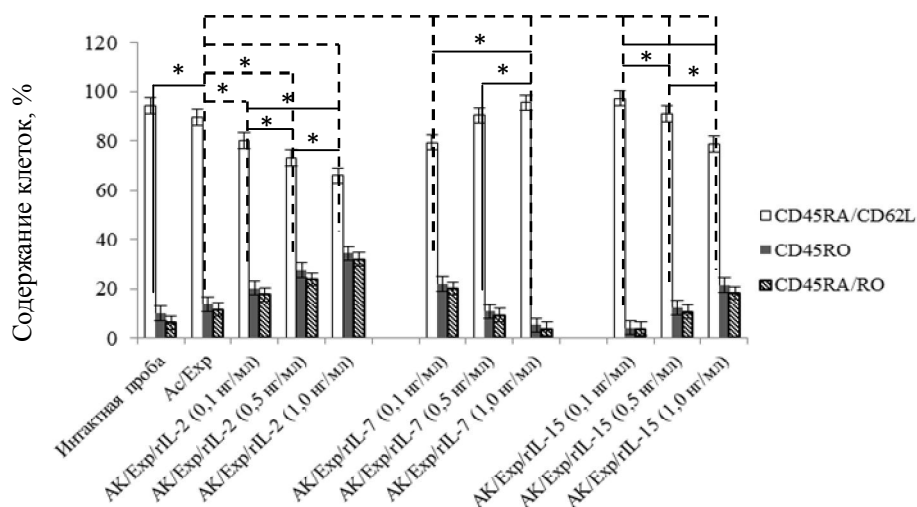


Рисунок 6 – Изменение содержания $CD45RO^+$ и дубль-позитивных $CD45RA^+/CD45RO^+$ Т-лимфоцитов (%) в культурах $CD45RA^+CD62L^+$ Т-клеток в условиях инкубации *in vitro* с цитокинами, имеющими общую α -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15) с использованием активационной модели клеточного культивирования *in vitro*. Примечание: * - достоверность различий ($p \leq 0,05$).

Таким образом, цитокины, имеющие общую α -цепь рецепторов, IL-2 и IL-15 - $1,0 \times 10^{-9}$ г/мл и IL-7 - $0,1 \times 10^{-9}$ г/мл, при действии *in vitro* на активированные наивные ($CD45RA^+CD62L^+$) Т-лимфоциты, способствуют их дифференцировке и созреванию за счет угнетения экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1* и, напротив, активации - *hnRNPLL*, что выражается увеличением числа переходных, дубль-позитивных форм - $CD45RA^+/CD45RO^+$ Т-лимфоцитов и $CD28$ -негативных Т-клеток (**рисунок 7**). Это положение подтверждается существованием отрицательных взаимосвязей между уровнями относительной экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1* и числом дубль-позитивных ($CD45RA^+/CD45RO^+$) Т-клеток ($r = -0,430$; $r = -0,590$; $p < 0,05$ во всех случаях при действии IL-2 ($1,0 \times 10^{-9}$ г/мл); $r = -0,450$; $r = -0,430$; $p < 0,05$ во всех случаях при действии IL-15 ($1,0 \times 10^{-9}$ г/мл); $r = -0,560$; $r = -0,420$ $p < 0,05$ во всех случаях при действии IL-7 ($0,1 \times 10^{-9}$ г/мл), соответственно) и между транскрипцией гена *hnRNPLL* и содержанием $CD28^+$ Т-лимфоцитов ($r = -0,760$, $p < 0,05$ при действии IL-2 ($1,0 \times 10^{-9}$ г/мл); $r = -0,550$; $p < 0,05$ при действии IL-15 ($1,0 \times 10^{-9}$ г/мл) и $r = -0,445$, $p < 0,05$ при действии IL-7 ($0,1 \times 10^{-9}$ г/мл), соответственно). Более низкие концентрации IL-2 и IL-15 - 0,1 и $0,5 \times 10^{-9}$ г/мл и максимальные - IL-7 - $0,1 \times 10^{-9}$ г/мл, ограничивают дифференцировку Т-клеток, индуцированную активацией. Эффекты rIL-2 на дифференцировку активированных *in vitro* примированных ($CD45RO^+$) Т-клеток сопряжены с угнетением экспрессии гена *U2af114* и повышением транскрипции генов *Gfi1* и *hnRNPLL*. Напротив, влияние IL-15 (0,1 и $0,5 \times 10^{-9}$ г/мл) на дифференцировку активированных $CD45RO^+$ Т-клеток ассоциировано с однонаправленным изменением экспрессии генов *hnRNPLL* и *U2af114* и не затрагивает транскрипционный фактор *Gfi1*. На фоне активации *in vitro*, IL-7 ограничивает дифференцировку примированных Т-клеток за счет угнетения экспрессии генов *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL*, что согласуется с его биологическим действием на гомеостаз Т-клеток (**рисунок 7**).

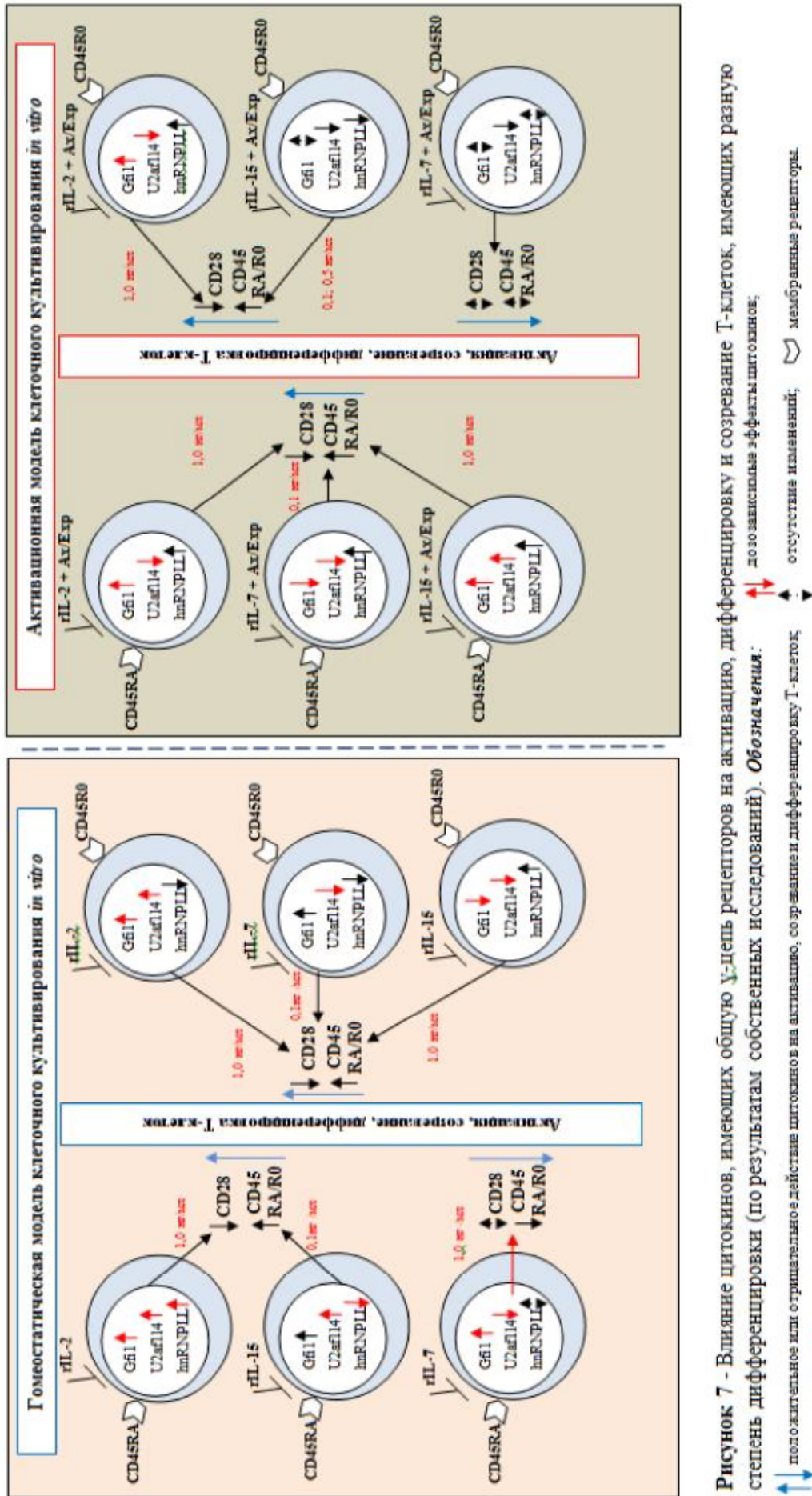


Рисунок 7 - Влияние цитокинов, имеющих общую удель рецепторов на активацию, дифференцировку и созревание Т-клеток, имеющих разную степень дифференцировки (по результатам собственных исследований). **Обозначения:**

- ↑ дозозависимые эффекты цитокинов;
- ↓ отсутствие изменений;
- ⊕ мембранные рецепторы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя вышесказанное, можно выделить ряд закономерностей цитокиноопосредованной регуляции механизма молекулярно-генетического контроля дифференцировки Т-клеток, сопряженного с альтернативным сплайсингом гена *Ptprc* (кодирующего общелейкоцитарный рецептор - CD45). Наше исследование позволило выявить, что цитокининдуцированные процессы созревания и дифференцировки наивных ($CD45RA^+CD62L^+$) и примированных ($CD45RO^+$) Т-клеток осуществляются за счет изменения активности генов - *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL* и фенотипически выражаются увеличением числа $CD45RA^+CD45RO^+$ Т-клеток и снижением количества $CD28^+$ Т-лимфоцитов. Продемонстрировано, что дозозависимый характер влияния цитокинов, имеющих общую β -цепь рецепторов (IL-2, IL-7 и IL-15) на созревание и дифференцировку наивных ($CD45+CD62L+$) и примированных ($CD45RO+$) Т-лимфоцитов *in vitro* зависит от функционального состояния Т-клеток (рисунок 8).

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

ВЫВОДЫ

1. Цитокины, имеющие общую β -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15) *in vitro* оказывают дозозависимое, разнонаправленное влияние на гомеостаз, созревание и дифференцировку наивных ($CD45RA^+CD62L^+$) и примированных ($CD45RO^+$) Т-клеток, путем изменения экспрессии мРНК генов - *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL*, регулирующих альтернативный сплайсинг гена *Ptprc* (кодирующего молекулу CD45), что выражается эффективной конверсией фенотипа (увеличение числа $CD45RA^+CD45RO^+$ клеток) и снижением числа $CD28^+$ Т-лимфоцитов.
2. Эффекты цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на созревание и дифференцировку наивных ($CD45RA^+CD62L^+$) и примированных ($CD45RO^+$) Т-клеток определяются их функциональным состоянием.
3. В гомеостатической модели активации *in vitro*, инкубация наивных ($CD45RA^+CD62L^+$) Т-клеток с цитокинами (IL-2 - $1,0 \times 10^{-9}$ г/мл; IL-15 – $0,1 \times 10^{-9}$ г/мл), приводит к однонаправленному повышению экспрессии мРНК генов *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL* и сопровождается ростом числа дубль-позитивных ($CD45RA^+CD45RO^+$) Т-клеток и $CD28^-$ Т-лимфоцитов. IL-7 в гомеостатической модели *in vitro* ограничивает активацию и дифференцировку наивных Т-клеток за счет дозозависимого угнетения экспрессии гена *U2af114*, и напротив, повышения мРНК гена транскрипционного фактора *Gfi1* и не влияет на экспрессию гена *hnRNPLL*.
4. Действие IL-2 ($1,0 \times 10^{-9}$ г/мл) и IL-7 ($0,1 \times 10^{-9}$ г/мл) на дифференцировку примированных Т-клеток в гомеостатической модели *in vitro* ассоциировано с увеличением экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1* и, напротив, с угнетением мРНК гена *hnRNPLL*. Влияние IL-15 ($1,0 \times 10^{-9}$ г/мл) сопряжено с повышением уровней экспрессии мРНК гена *hnRNPLL* и угнетением экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1*.
5. Цитокины, имеющие общую β -цепь рецепторов, IL-2 и IL-15 ($1,0 \times 10^{-9}$ г/мл) и IL-7 ($0,1 \times 10^{-9}$ г/мл) при действии *in vitro* на активированные наивные ($CD45RA^+CD62L^+$) Т-лимфоциты, способствуют их дифференцировке и

созреванию за счет угнетения экспрессии мРНК генов *U2af114* и *Gfi1* и, напротив, активации - *hnRNPLL*. Низкие концентрации IL-2 и IL-15 ($0,1$ и $0,5 \times 10^{-9}$ г/мл) и максимальные - IL-7 ($1,0 \times 10^{-9}$ г/мл), ограничивают дифференцировку Т-клеток, индуцированную TCR-активацией.

6. Эффекты rIL-2 на дифференцировку активированных CD45RO⁺ Т-клеток сопряжены с угнетением экспрессии гена *U2af114* и повышением транскрипции генов *Gfi1* и *hnRNPLL*. Напротив, влияние IL-15 ($0,1$ и $0,5 \times 10^{-9}$ г/мл) ассоциировано с однонаправленным повышением экспрессии генов *hnRNPLL* и *U2af114* и не затрагивает экспрессию гена *Gfi1*. На фоне активации *in vitro*, IL-7 ограничивает дифференцировку примированных Т-клеток за счет дозозависимого угнетения экспрессии генов *U2af114*, *Gfi1* и *hnRNPLL*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Литвинова Л.С., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., **Кофанова К.А. (Юрова К.А.)**. Эффекты иммунорегуляторных цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на процессы активации, пролиферации и апоптотической гибели Т-клеток иммунной памяти *in vitro* // **Цитология**. – 2013. – Том 55, №8. – С.566-571.
Litvinova L.S., Sokhnevich N.A., Gutsol A.A., **Kofanova K.A (Yurova K.A.)**. Influence of Immunoregulatory Cytokines IL-2, IL-7 and IL-15 upon Activation, Proliferation and Apoptosis of Immune Memory T-cells *in vitro* // **Cell and Tissue Biology**. – 2013. - Vol. 7, No. 6. – P. 539–544.
2. Литвинова Л.С., Мазунин И.О., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Хазиахматова О.Г., **Кофанова К.А. (Юрова К.А.)**. Дозозависимые эффекты стероидных гормонов на экспрессию генов *Gfi1* и *U2af114* в Т-лимфоцитах разной степени дифференцировки // **Молекулярная биология**. – Т. 47, № 4. - С. 656-667 (IF-0,740).
Litvinova L.S., Mazunin I.O., Gutsol A.A., Sokhnevich N.A., Khaziakhmatova O.G., **Kofanova K.A (Yurova K.A.)**. Dose-Response Effect of Steroid Hormones on *Gfi1* and *U2af114* Gene Expression in T lymphocytes at Different Stages of Differentiation // **Molecular Biology**. - 2013. - Vol. 47, No. 4. – P. 572–580 (IF-0,740).
3. Литвинова Л.С., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Шуплецова В.В., **Кофанова К.А. (Юрова К.А.)**, Хазиахматова О.Г., Кайгородова Е.В., Гончаров А.Г. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов // **Медицинская иммунология**. – 2014. - Т. 6, № 1. - С. 7-26 (IF-0,359).
4. Сохоневич Н.А., **Юрова К.А.**, Гуцол А.А., Хазиахматова О.Г., Мазунин И.О., Литвинова Л.С. Эффекты иммунорегуляторных цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на экспрессию генов *Gfi1* и *U2af114* в Т-лимфоцитах разной степени дифференцировки // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2015. - Т.159 (№ 2). - С. 196-200 (IF-0,565).
5. **Yurova K.A.**, Sokhnevich N.A., Khaziakhmatova O.G., Litvinova L.S. Cytokine-mediated regulation of expression of *Gfi1* and *U2af114* genes by activated T-cells with various differentiation status *in vitro* // **Biochemistry (Moscow) Supplement series B: Biomedical Chemistry**. – 2015. – Vol.9, №2. – С. 165-172.
6. Сохоневич Н.А., Гуцол А.А., **Кофанова К.А. (Юрова К.А.)**, Литвинова Л.С. Дозозависимые эффекты про- и противовоспалительных цитокинов (INF γ и IL-4) на пролиферативную активность CD45RO⁺ и CD45RA⁺ лимфоцитов // **Российский иммунологический журнал**. – 2013. – Том 7 (16), №2-3. – С. 134-135 (IF-0,286).
7. Сохоневич Н.А., Гуцол А.А., **Кофанова К.А. (Юрова К.А.)**, Литвинова Л.С. Влияние иммунорегуляторных цитокинов на экспрессию молекулы ранней активации CD69 в популяции Т-клеток иммунной памяти // Сборник тезисов докладов XVIII-ой межгородской научной конференции молодых учёных «Актуальные проблемы патофизиологии 2013», г. Санкт-Петербург, 10-11 апреля 2013 г. – 2013. – С.110-112.
8. **Кофанова К.А. (Юрова К.А.)**, Сохоневич Н.А., Мазунин И.О., Литвинова Л.С. Влияние IL-2 на пролиферативную активность и транскрипцию мРНК гена hTERT в Т-лимфоцитах

разной степени дифференцировки // Сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции «Перспективы развития науки и образования», г. Москва, 29 ноября 2013 г. – Часть 1. Мин-во обр. и науки. - М., «Ар-консалт», 2013. – С.44-49.

9. **Кофанова К.А. (Юрова К.А.)**, Сохоневич Н.А., Хазиахматова О.Г., Мазунин И.О., Литвинова Л.С. Оценка влияния IL-7 и IL-15 на пролиферацию и транскрипцию мРНК гена *hTERT* Т-клетками памяти (CD45RO+) с разным функциональным статусом // Сборник статей по материалам XX международной заочной научно-практической конференции «Научная дискуссия: вопросы медицины». — М.: Изд. «Международный центр науки и образования», 2013. — С.72-79.

10. Sokhonevich N.A., **Kofanova K.A (Yurova K.A.)**, Khaziakhmatova O.G., Litvinova L.S. Influence of cytokine IL-2 on naïve T-cells differentiation in vitro // Fundamental and applied research in biology 3rd international scientific conference, Donetsk national university, 2014, February 24-27. – P. 231.

11. Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., **Юрова К.А.**, Хазиахматова О.Г., Литвинова Л.С. Гормональная регуляция экспрессии гена теломеразы *hTERT* в популяции CD45RO+ Т-клеток памяти // Сборник статей Международной научно-практической конференции «Современные направления развития медицины-2014» г. Брянск, 5-7 мая 2014 г. – С. 257-261.

12. Сохоневич Н.А., **Юрова К.А.**, Хазиахматова О.Г., Шуплецова В.В., Литвинова Л.С. Эффекты IL-10 на функциональную активность т - клеток разной степени дифференцировки // Международная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы образования и науки», г. Тамбов, 30 сентября 2014 г. - С. 110-112.

13. Khaziakhmatova O.G., Shupletsova V.V., **Yurova K.A.**, Sokhonevich N.A., Litvinova L.S. The effect of β -estradiol on the proliferation and the level of transcription mRNA of *hTERT* gene in CD45RO+ T-lymphocytes // 3rd European Conference on Biology and Medical Sciences Австрия, Вена, 28 октября 2014 г. – С. 184 – 189.

14. **Юрова К.А.**, Сохоневич Н.А., Хазиахматова О.Г., Литвинова Л.С. Влияние иммунорегуляторных цитокинов, имеющих общую α -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15) на взаимосвязь между транскрипцией мРНК гена *hnRNPLL* и мембранной экспрессией костимуляторной молекулы - CD28 в механизмах дифференцировки Т-клеток in vitro // Сборник статей по материалам XXXIV-XXXV международной заочной научно-практической конференции «Научная дискуссия: вопросы медицины». — М.: «Международный центр науки и образования», 2015. – №2-3 (26). - С. 115-119.

15. **Юрова К.А.**, Сохоневич Н.А., Хазиахматова О.Г., Литвинова Л.С. Влияние IL-7 и IL-15 на созревание и дифференцировку наивных т-лимфоцитов in vitro // Сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции «Перспективы развития науки и образования». – Часть 1. М.: «Ар-Консалт». - 2015 г. – С. 34-35.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК – копияная дезоксирибонуклеиновая кислота
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РНК – рибонуклеиновая кислота
Bcl – антиапоптотический фактор
CD – кластер дифференцировки (*cluster of differentiation*)
Gfi1 (*Gfi1*) – фактор транскрипции (*growth factor independent 1*)

hnRNPLL – гетерогенный ядерный нуклеопротеин (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like)
IL - интерлейкин
PTPRC – белок тирозиновая фосфатаза, рецепторный тип (*Protein Tyrosine-Phosphatase, Receptor Type*).
qPCR – количественная полимеразная цепная реакция (*Quantitative polymerase chain reaction*)
TCR – Т-клеточный рецептор (*T-cell receptor*)
Th – Т-хелперы
U2AF26 (U2af114) – вспомогательный фактор сплайсинга (*U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1 like 4*)