

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

На правах рукописи



Тодосенко Наталья Михайловна

**РЕАКЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ
РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ НА ГЛЮКОКОРТИКОИДЫ
IN VITRO**

14.03.03 – патологическая физиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

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

Калининград - 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Патопфизиология ревматоидного артрита	15
1.1.1. Краткие сведения об этиологии и иммунопатогенезе ревматоидного артрита	15
1.1.2. Т-клеточное звено иммунитета в патогенезе ревматоидного артрита	18
1.1.2.1. Характеристика популяций Т-клеток при ревматоидном артрите. Th1/Th2-клеточная парадигма	20
1.1.2.2. Th17/Th1-клеточная парадигма	23
1.1.2.3. Th17/Treg-клеточная парадигма	26
1.1.3. Созревание Т-лимфоцитов и феномен иммунологического старения при ревматоидном артрите	29
1.1.3.1. Краткая характеристика и функциональные особенности субпопуляций Т-клеток иммунной памяти	29
1.1.3.2. Аспекты старения иммунной системы. Инволюция тимуса и изменения и изменения Т-клеточного звена в патогенезе ревматоидного артрита	32
1.1.3.3. Феномен иммунологического старения и его связь с патогенезом ревматоидного артрита	36
1.2. Краткая характеристика глюкокортикостероидов	41
1.2.1. Строение цитозольного рецептора к глюкокортикоидам (GR) и его транслокация в ядро	41
1.2.2. Процессы, происходящие с GR в ядре. Изменение экспрессии генов	42
1.2.3. Применение глюкокортикоидов в лечении аутоиммунных заболеваний	45

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	49
2.1. Объект и материал исследования	49
2.2. Методы исследования	50
2.2.1. Выделение мононуклеарных лейкоцитов из периферической крови	52
2.2.2. Выделение CD3 ⁺ CD45RO ⁺ Т-лимфоцитов из фракции мононуклеарных лейкоцитов методом иммуномагнитной сепарации	52
2.2.3. Культивирование CD3 ⁺ CD45RO ⁺ клеток	55
2.2.4. Определение общего числа клеток (в мл) и количества живых лимфоцитов в культурах CD3 ⁺ CD45RO ⁺ Т-клеток методом проточной цитометрии	57
2.2.5. Определение поверхностных маркеров CD25, CD28, CD71, CD45RA, CD95, HLA-DR на CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RO ⁺ Т-клетках методом проточной цитометрии	58
2.2.6. Определение содержания концентрации провоспалительных молекул (IL-2, IL-17, IL-21, IFN- γ и TNF- α) в супернатантах культур CD3 ⁺ CD45RO ⁺ Т-клеток	62
2.2.7. Выделение тотальной РНК	63
2.2.8. Обратная транскрипция образцов тотальной РНК	65
2.2.9. Определение уровня относительной экспрессии генов методом количественной ПЦР в режиме реального времени.	66
2.2.9.1. Количественная ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя	66
2.2.9.2. Мультиплексная количественная ПЦР в реальном времени	70
2.2.10. Методы статистического анализа данных	73
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	76
3.1. Оценка эффектов синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, метилпреднизолона) на общее количество (10^6 / мл) и содержание живых (%) клеток в культурах TCR - активированных CD3 ⁺ CD45RO ⁺ Т-	76

лимфоцитов у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом

3.2 Оценка эффектов синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, метилпреднизолона) на экспрессию мембранных молекул ранней активации (CD25), коактивации (CD28), пролиферации (CD71), поздней активации (HLA-DR) и апоптоза (CD95) и CD45RA в культурах TCR-активированных CD3 ⁺ CD45RO ⁺ Т-лимфоцитов у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом	79
3.2.1. Мембранная экспрессия молекулы ранней активации CD25	79
3.2.2. Мембранная экспрессия молекулы ко-стимуляции CD28	81
3.2.3. Мембранная экспрессия молекулы пролиферации CD71	83
3.2.4. Мембранная экспрессия молекулы апоптоза CD95	85
3.2.5. Мембранная экспрессия молекулы поздней активации HLA-DR	87
3.2.6. Оценка эффектов синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, метилпреднизолона) на изменение числа CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD28 ⁻ CD95 ⁺ HLA-DR ⁺ CD45RO ⁻ в культурах TCR - активированных CD3 ⁺ CD45RO ⁺ Т-лимфоцитов у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом	89
3.3. Оценка эффектов синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, метилпреднизолона) на продукцию провоспалительных медиаторов (IL-2, IFN- γ , IL-17, IL-21, TNF- α) TCR - активированными CD3 ⁺ CD45RO ⁺ Т-лимфоцитами у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом	90
3.3.1. Продукция IL-2	90
3.3.2. Продукция IFN- γ	92
3.3.3. Продукция IL-17	94
3.3.4. Продукция IL-21	95
3.3.5. Продукция TNF- α	97
3.4. Оценка эффектов синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, метилпреднизолона) на уровень экспрессии мРНК генов провоспалительных медиаторов (IL-2, IFN- γ , IL-17, IL-21, TNF- α) в TCR-активированных CD3 ⁺ CD45RO ⁺ Т-лимфоцитах у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом	99
3.4.1. Экспрессия мРНК гена IL-2	99
3.4.2. Экспрессия мРНК гена IFN- γ	100
3.4.3. Экспрессия мРНК гена IL-17	101

3.4.4. Экспрессия мРНК гена IL-21	103
3.4.5. Экспрессия мРНК гена TNF- α	104
3.5. Оценка эффектов синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, метилпреднизолона) на уровень экспрессии мРНК каталитической субъединицы фермента теломеразы (<i>hTert</i>) в TCR-активированных CD3 ⁺ CD45RO ⁺ Т-лимфоцитах у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом	105
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	107
ВЫВОДЫ	132
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	133

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

Ac/Exp – активатор Т-лимфоцитов
CD – кластер дифференцировки клеток
DAS – показатель активности заболевания
DBD - центральный ДНК-связывающий домен
Dex –дексаметазон
DUSP1 - фосфатазы-1 двойной специфичности
GILZ - ГК-индуцированная лейциновая молния
GR – глюкокортикоидный цитоплазматический/ядерный рецептор
GRE - глюкокортикоидные элементы ответа на промоторных участках цепи ДНК
таргетных генов
IFN- γ – интерферон гамма
Ig – иммуноглобулин
IL– интерлейкин
LBD - С-терминальный лиганд-связывающий домен
NF- κ B – ядерный фактор каппа В
NK – натуральные киллерные клетки
NKT – естественные киллерные Т-лимфоциты
NTD - N-терминальный домен
Null – нулевые
STAT – сигнальные белки – трансдукторы и активаторы транскрипции
TCR – Т-клеточный рецептор
TNF- α – фактор некроза опухоли альфа
Tscm - Т-стволовые клетки памяти
VEGF – фактор роста эндотелия сосудов
АГ – антиген
АИЗ – аутоиммунные заболевания
АПК - антиген-презентирующие клетки
АТ – антитело
АЦАТ – анти-цитруллинные антитела
ГК – глюкокортикоиды
ГСК – гемопоэтические стволовые клетки
ДК – дендритные клетки
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
иTreg – индуцированные Т-регуляторные клетки
МАТ – моноклональные антитела
МКР-1 - митоген-активируемая протеинкиназа фосфатазы-1
ММР - матриксные металлопротеиназы
МНК – моноклеарные лейкоциты
МР – метилпреднизолон
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
нTreg – естественные Т-регуляторные клетки
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РА – ревматоидный артрит
РНК – рибонуклеиновая кислота
РФ – ревматоидный фактор
Th – Т-хелперные лимфоциты

Tn – наивные T-лимфоциты
Treg – T-регуляторные клетки
Тем - эффекторные T-клетки памяти
Тсм - центральные T-клетки памяти
ЮИА - ювенильный идиопатический артрит
МНС (HLA) – главный комплекс гистосовместимости
TFH – T фолликулярные хелперные лимфоциты

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Ревматоидный артрит (РА) - хроническое мультисистемное аутоиммунное заболевание, характеризуется стойким синовиальным воспалением, приводящим к деструкции хрящевой и костной тканей [Mateen S. et al., 2016; Luterek-Puszyńska K. et al., 2017], является *наиболее* распространенным видом аутоиммунного артрита среди населения развитых стран (0.5-1.8% случаев во всем мире) [Yamamoto K. et al., 2015; Favalli E.G. et al., 2015; Brzustewicz E. et al., 2015], что обуславливает *серьезный интерес к этой проблеме*. Предполагают, что основными участниками *патологического процесса* при РА являются аутореактивные CD4⁺ Т-лимфоциты иммунной памяти, имеющие признаки репликативного старения и терминальной дифференцировки [Paulsen E.E. et al., 2015; Spreafico R. et al., 2016a; Spreafico R. et al., 2016b]. Выявлено стимулирующее влияние этих клеток на пролиферацию и дифференцировку В-лимфоцитов, а также их участие в индукции и развитии воспаления через секрецию провоспалительных медиаторов (цитокинов, факторов роста, интерферонов, хемокинов и др.) [Noak M. et al., 2014; Pandya et al., 2016; Marusina A.I. et al., 2017; McInnes I.B. et al., 2017], что в итоге приводит к системным осложнениям, включая разрушение суставов, и как следствие - к инвалидности или смерти индивидуума [Matsuki F. et al., 2013; Luterek-Puszyńska K. et al., 2017]. В то же время роль и участие разных субпопуляций CD4⁺ (Th1/Th2 и Th17/Treg) Т-клеток в патогенезе РА остается предметом дискуссий, отраженных в источниках мировой научной периодики [Afzali B. et al., 2007; Chen J. et al., 2012; Wang D. et al., 2015; Chen J. et al., 2016; Marusina A.I. et al., 2017]. Вышеизложенное обуславливает *актуальность и своевременность настоящего исследования*, направленного на анализ клеточных реакций CD4⁺ лимфоцитов в механизмах развития ревматоидного артрита, с целью поиска новых патогенетических методов и способов коррекции аутоиммунного процесса.

Степень разработанности темы. Одним из наиболее действенных фармакотерапевтических вариантов *патогенетического* лечения АИЗ по-прежнему является терапия глюкокортикоидами (ГК), направленная на подавление чрезмерной воспалительной реакции организма [Baschant U. et al., 2011; Noak M. et al., 2014]. В целом, ГК характеризуются как мощные иммуносупрессивные агенты, оказывающие комплексное воздействие на клетки иммунной системы, осуществляя, в целом, регуляцию

адаптивных процессов [Ayroldi E. et al., 2014; Yakimchuk K. et al., 2015; Fisher A. et al., 2016; Тодосенко Н.М. и соавт., 2017; Taves M.D. et al., 2017]. Участие эндогенных ГК в инволюции тимуса [Moleriu R.D. et al., 2014; Talaber G. et al., 2015] частично объясняет прямую взаимосвязь между старением иммунной системы и развитием РА [Lindstrom T.M. et al., 2010; Dumitriu I.E. et al., 2012; Dumitriu I.E. et al., 2015]. Использование ГК, особенно в течение длительного времени, чревато развитием серьёзных побочных реакций (нарушение метаболизма, снижение резистентности к латентным инфекциям, подавление активности гипоталамус–гипофиз–надпочечниковой системы и др.) [Baschant U. et al., 2011; Noak M. et al., 2014; Gabryel M. et al., 2016; Kloster-Jensen K. et al., 2016]. Кроме того, на фоне постоянного приема ГК возможен рецидив аутоиммунного процесса (примерно у 45-50% пациентов), с утяжелением течения заболевания [Сытыбалдиев А.М., 2013]. Это позволяет предположить, что ГК не в полной мере блокируют основное звено патогенеза – аутореактивные лимфоциты. Относительно недавно было показано, что в системе *in vitro* Т-клетки здоровых доноров способны изменять свой фенотип и функциональные свойства в условиях ГК индукции [Gruver-Yates A.L., Cidlowski J.A., 2013; Cheng Q. et al., 2014; Шуплецова В.В., 2014; Mitre-Aguilar I.B. et al., 2015; Хазиахматова О.Г., 2016]. Однако, несмотря на очевидный факт, что все краткосрочные и долговременные эффекты ГК на клеточный иммунитет прямо или косвенно связаны с их влиянием на генерацию, жизнеспособность и функциональную активность Т-лимфоцитов, сведения, посвящённые действию ГК на процессы гомеостаза артритогенных клеток, участвующих в патогенезе РА, в литературе носят фрагментарный характер. В связи с вышесказанным, расшифровка молекулярных и клеточных механизмов, определяющих реакции патогенных клеток, опосредованные глюкокортикоидами, является актуальной задачей современной биомедицинской науки.

Целью исследования явился анализ процессов созревания и функционального ответа Т-лимфоцитов памяти ($CD3^+CD4^+CD45RO^+$) на синтетические глюкокортикоиды (дексаметазон, метилпреднизолон) в норме и при ревматоидном артрите, на фоне CD2/CD3/CD28 (TCR) – стимуляции в системе *in vitro*.

Задачи исследования:

1. Оценить изменение числа $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ клеток, экспрессирующих молекулы ранней ($CD25$, $CD28$) и поздней/длительной активации, апоптоза ($CD95$, $HLA-DR$, $CD45RO^-$), пролиферации ($CD71$) у здоровых добровольцев и больных ревматоидным артритом в ответ на действие синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона и метилпреднизолона), в условиях *in vitro* TCR-стимуляции.
2. Дать комплексную оценку продукции $CD3^+CD45RO^+$ лимфоцитами провоспалительных молекул ($TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$, $IL-2$, $IL-17$, $IL-21$) на фоне действия синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона и метилпреднизолона) в норме и при ревматоидном артрите, в условиях TCR-стимуляции в системе *in vitro*.
3. Оценить взаимосвязь между фенотипическими проявлениями, характеризующими процессы созревания Т-клеток памяти, экспрессией гена *hTERT* и особенностями продукции провоспалительных медиаторов $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ Т-лимфоцитами в условиях влияния синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона и метилпреднизолона) в норме и при ревматоидном артрите, на фоне TCR-стимуляции в системе *in vitro*.
4. Установить общие закономерности и особенности реакций $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ Т-клеток в норме и при ревматоидном артрите на действие синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона и метилпреднизолона) в условиях TCR-стимуляции в системе *in vitro*.

Положения, выносимые на защиту:

1. Установлена ингибция процессов активации и пролиферации, TCR-стимулированных *in vitro* $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ Т-лимфоцитов, обусловленная, как в норме, так и при ревматоидном артрите введением супрафизиологических и терапевтических концентраций синтетических глюкокортикоидов.
2. Повышение числа эффекторных Т-лимфоцитов с маркерами терминальной дифференцировки и созревания ($CD3^+CD4^+CD95^+HLA-DR^+CD28^-CD45RO^+$ / $CD45RO^-$, снижение уровня экспрессии гена *hTERT*) в культурах клеток больных ревматоидным артритом (но не здоровых доноров), опосредованное глюкокортикоидами в условиях TCR-активации *in vitro*, свидетельствует об их

относительной устойчивости к супрессивному действию исследуемых глюкокортикоидов.

3. Эффекторные популяции Т-клеток у больных ревматоидным артритом, индуцируемые синтетическими глюкокортикоидами в условиях TCR-активации, характеризуются *in vitro* сохранением продукции провоспалительных цитокинов (IFN- γ , TNF- α , IL-17 и IL-21).

Научная новизна

Впервые показано, что *in vitro* глюкокортикоиды (дексаметазон и метилпреднизолон) оказывают однонаправленное, разной степени выраженности супрессорное действие на экспрессию молекул активации, костимуляции и пролиферации TCR-активированными CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ Т-клетками, полученными у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом. Приоритетными являются данные, свидетельствующие, что индуцированная глюкокортикоидами в условиях TCR-активации конверсия фенотипа CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ Т-клеток, характеризующаяся ростом числа лимфоцитов, экспрессирующих молекулы поздней активации/апоптоза (HLA-DR, CD95) и снижением содержания CD28 - и CD45RO - позитивных клеток, ассоциированная с изменением уровня экспрессии мРНК гена *hTERT*, свидетельствуют о процессах созревания Т-клеток в эффекторы (T_{EM}), в том числе, терминально-эффекторные (реэкспрессирующие молекулу CD45RA, T_{EMRA}), в норме и при ревматоидном артрите. Приведены новые данные, доказывающие, что опосредованное глюкокортикоидами увеличение содержания эффекторных Т-лимфоцитов (T_{EM} и T_{EMRA}) в культурах больных РА (*но не у здоровых доноров*), наряду с отсутствием ассоциаций с параметрами, характеризующими жизнеспособность (*числом живых/мертвых клеток*) культур лимфоцитов, свидетельствует о резистентности этих клеток к супрессорному действию глюкокортикоидов. *Впервые продемонстрированы* однонаправленные, разной степени выраженности супрессорные эффекты глюкокортикоидов на продукцию TCR-активированными CD3⁺CD45RO⁺ клетками здоровых доноров и больных РА провоспалительных молекул (IFN- γ , TNF- α , IL-17 и IL-21). Обнаруженные взаимосвязи между содержанием эффекторных T_{EM} и T_{EMRA} клеток с параметрами, отражающими продукцию провоспалительных

медиаторов у больных РА, свидетельствуют о высоком провоспалительном потенциале этих популяций Т-клеток на фоне действия синтетических глюкокортикоидов.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные знания имеют фундаментальный характер, раскрывая новые клеточные и *молекулярно-генетические аспекты* глюкокортикостероидной регуляции процессов активации и созревания Т-клеток памяти ($CD3^+CD4^+CD45RO^+$) в норме и при ревматоидном артрите. Представленные результаты *имеют важное теоретико-прикладное значение* для осмысления механизмов, опосредующих *сохранение/нарушение* иммунного гомеостаза и могут быть использованы для моделирования клеточных реакций в норме и при аутоиммунной патологии. **Практическая значимость** работы обусловлена новыми данными, *освещающими* общие закономерности и особенности клеточно-молекулярных реакций ($CD3^+CD4^+CD45RO^+$) Т-лимфоцитов в норме и при ревматоидном артрите на действие синтетических глюкокортикоидов, которые могут быть использованы для разработки новых методов селективного подавления агрессии аутореактивных клеток при аутоиммунных заболеваниях, основанных на (пато)физиологических особенностях компонентов системы иммунитета.

Результаты диссертационной работы применяют в учебном процессе на кафедре фундаментальной медицины медицинского института и Институте Живых Систем БФУ им. И. Канта г. Калининграда.

Методология и методы исследования

Согласно поставленным задачам, выбраны современные высокоинформативные методы исследования, выполнение которых осуществлялось на базе научно-исследовательской лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта. В качестве материала исследования использовали культуры ($CD3^+CD45RO^+$) Т-лимфоцитов, полученные (методом иммуномагнитной сепарации) из взвеси мононуклеарных клеток периферической венозной крови условно здоровых доноров и больных ревматоидным артритом.

Основные методы исследования:

1. Иммуномагнитная сепарация (выделение культур CD3⁺CD45RO⁺ Т-клеток из взвеси мононуклеаров);
2. Культуральные методы исследования;
3. Оценка жизнеспособности (CD3⁺CD45RO⁺) культур клеток; определение поверхностных маркеров (CD3, CD4, CD45RO, CD28, CD25, CD71, CD95, HLA-DR) на Т-клетках методом проточной цитометрии;
4. Исследование содержания провоспалительных медиаторов (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-17 и IL-21) в супернатантах клеточных культур методом иммуноферментного анализа.
5. Определение уровней относительной экспрессии мРНК генов *IL-2*, *IL-17*, *IL-21*, *IFN- γ* , *TNF- α* и *hTERT* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени;
6. Статистический анализ результатов.

Степень достоверности и апробация результатов

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

Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на межгородской научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (г. Санкт-Петербург, 2017 г.); международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (г. Москва, 2017 г.); XIV конференции иммунологов Урала (г. Пермь, 2017 г.); международном конгрессе молодых ученых Европы и Азии «The first international scientific congress of young scientists of Europe and Asia» (Vienna, Austria, 2017); XV всероссийском научном форуме с международным участием им. акад. В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-

Петербурге» (г. Санкт-Петербург, 2017 г.), а также на научно-образовательных семинарах на базе Лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского Федерального Университета им. И. Канта (г. Калининград, 2014-2017 гг.). В работе приводятся результаты научно-исследовательских работ «Исследование молекулярно-биологических механизмов модуляции иммунологической памяти в норме и при аутоиммунной патологии» (ГК №П1252); «Роль стероидных гормонов в дифференцировке Т-клеток памяти: молекулярно-генетический и иммуно-морфологический аспекты» (Соглашение № 14.А18.21.1121).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них 6 статей в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, определенных ВАК РФ и 5 статей и тезисов в материалах конференций и симпозиумов.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 172 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырёх глав, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 27 рисунками и 15 таблицами. Библиографический указатель включает 392 источника (13 - отечественных и 379 - иностранных). Автор принимал непосредственное участие в разработке дизайна и планировании исследования. Результаты получены, проанализированы и обобщены в выводах и положениях автором лично.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Патофизиология ревматоидного артрита

1.1.1. Краткие сведения об этиологии и иммунопатогенезе ревматоидного артрита

Ревматоидный артрит (РА) – хроническое аутоиммунное заболевание, характеризующееся поражением суставов, обширным воспалением синовиальной оболочки и образованием ревматоидного паннуса. Последний способен разрушить прилегающие хрящевую и костную ткани, опосредуя деформацию сустава [Chimenti M.S. et al., 2015; Yamamoto K. et al., 2015; Di Sante G. et al., 2015; Tsubaki M. et al., 2015; Favalli E.G. et al., 2015; Brzustewicz E. et al., 2015; Chemin K. et al., 2016; Asai S et al., 2017]. РА является самым распространенным видом аутоиммунного артрита среди населения развитых стран (0.5-1.8% случаев), приводящим к необратимому разрушению суставных структур и последующей инвалидизации и как следствие, к преждевременной смерти этой категории больных [Yamamoto K. et al., 2015; Favalli E.G. et al., 2015; Brzustewicz E. et al., 2015].

Этиологические факторы развития РА многочисленны и разнообразны. Предполагают, что развитие болезни может спровоцировать сильный эмоциональный стресс, травма, перенесенное вирусное заболевание, неправильный образ жизни (курение) [García-Hernández M.H. et al., 2014; Anderson R. et al., 2016; Wenga Ch.-H. et al., 2016], загрязнение окружающей среды, ацетилирование гистонов и метилирование ДНК [Bernard N.J., 2014; Sun B. et al., 2016; Ospelt C. et al., 2017], микроРНК [Pauleya K.M. et al., 2009; Stanczyk J. et al., 2011; Ceribelli A. et al., 2012; Sun B. et al., 2016], микробиологические факторы (вирусы, бактерии, грибы, паразиты) и др. [Barzilai O. et al., 2007; Toussirot E., 2008; Draborg A.H. et al., 2013; Mathew A.J. et al., 2014; García-Hernández M.H. et al., 2014; Wright H.L. et al., 2014; Kerr J.R., 2016; Bender P. et al., 2017]. Ключевым генетическим фактором риска развития РА считаются аллели HLA-DQ8 (DQβ1*0302)/DR4 (DRβ1*0401;*0404;*0101;*1402), принадлежащие к молекулам главного комплекса гистосовместимости (МНС) II класса [Tsai S. et al., 2013; Mangalam A.K. et al., 2013; Luckey D. et al., 2014; van Heemst J. et al., 2014; García-Hernández M.H. et al., 2014; Wright H.L. et al., 2014; Yamamoto K. et al., 2015; Di Sante G. et al., 2015; Tsubaki M.

et al., 2015]. Предрасполагающий (общий) эпитоп представляет собой аминокислотную последовательность (глутамин-лейцин-аргинин-аланин-аланин, т.е. QKRAA или QRRAA) в третьей гипервариабельной области DR β -цепей [Smolen J.S. et al., 2007; Birru Talabi M. et al., 2017]. Наличие этого эпитопа способствует продукции антител (АТ) против цитруллинированных пептидов, влияя на специфичность антицитруллиновых белковых АТ. Выявлено свыше 100 локусов генома, ассоциированных с развитием РА; наиболее известные из них: RPTN22, PADI4, STAT4, TRAF1-C5 и TNFAIP3 [Sebastien V. et al., 2013; Chemin K. et al., 2016; Orent W. et al., 2016].

В клинической практике лабораторными критериями оценки РА являются обнаруженные ауто-антитела: ревматоидный фактор (РФ) [Brzustewicz E. et al., 2015], АЦАТ (анти-цитруллинные антитела) [Bas S. et al., 2002; Firestein G.S. et al., 2003; Boissier M.C. et al., 2012; Симбирцев А.С., 2013; van Heemst J. et al., 2014; Chimenti M.S. et al., 2015; Yamamoto K. et al., 2015; van de Sande M.G. et al., 2016; Firestein G.S. et al., 2017], анти-карбамилированные антитела [van Heemst J. et al., 2014]. В группу риска входят женщины (в 2-4 раза страдают РА чаще, чем мужчины), возрастная группа старше 40 лет (35-50 лет) [Cross M. et al., 2014; Chao W.C. et al., 2017; Birru Talabi M. et al., 2017; Kiadaliri A.A. et al., 2017].

Многочисленными исследованиями установлено, что патогенез РА представляет собой многоэтапный процесс, характеризующийся нарушением баланса между врожденным и адаптивным звеном иммунного ответа [Brzustewicz E. et al., 2015]. Ключевая роль в развитии РА принадлежит аутоактивированным CD4⁺ Т-лимфоцитам и плазматическим клеткам [Cho B.A. et al., 2012; Niu X. et al., 2016; Kotake S. et al., 2016a; Kotake S. et al., 2016b]. CD4⁺ Т-клетки находятся в непосредственной близости от HLA-DR⁺ макрофагов и дендритных клеток (ДК) [Mateen S. et al., 2016]; обнаруженная взаимосвязь между аллелями HLA-DR4 (и DR1) и тяжестью аутоиммунного заболевания свидетельствует о ключевой роли Т-клеток в патогенезе РА. CD4⁺ Т-клетки участвуют в распространении воспаления и повреждения тканей при РА [Mateen S. et al., 2016].

Предполагают, что сценарий формирования РА начинается с развития аутоиммунных реакций, продолжается местным воспалением и, наконец, вызывает разрушение костной ткани [Chimenti M.S. et al., 2015]. Основной мишенью

нарушенных иммуномодулирующих путей является синовиальная мембрана, образованная интимальным (макрофаго-подобные и фибробласто-подобные синовиоциты) и субинтимальным (сосудистым) слоями [Veale D.J. et al., 2017]. Воспаление синовиальной ткани обусловлено инфильтрацией субинтимального слоя Т- и В-лимфоцитами, плазматическими клетками, макрофагами, нейтрофилами, тучными клетками, естественными киллерными Т-клетками (NKT) и ДК [Veale D.J. et al., 2017]. При РА регистрируется усиленная инфильтрация синовиальной полости Т-лимфоцитами, преимущественно, аутореактивными CD4⁺ Т-клетками [Danke N.A. et al., 2004; Ria F. et al., 2008; Bangs S.C. et al., 2009; Spreafico R. et al., 2016a; Spreafico R. et al., 2016b] образование иммунных комплексов [Nanki T. et al., 2000a; Nanki T. et al., 2000b; Onuora S., 2015; Moore T.L., 2016].

Большие фолликулярные агрегаты лимфоцитов (Th1, Th17, Treg, NKT) в синовиальной ткани коррелируют с высокой активностью РА [Klimiuk P.A. et al., 2003]. Традиционная гипотеза утверждает, что РА является Th1-опосредованным расстройством, однако все больше внимания привлекает Th17 субпопуляция CD4⁺ клеток, продуцирующая IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, TNF-α [Gaffen S.L., 2009; van Hamburg J.P. et al., 2013]. Эксперименты на мышинных моделях позволили выявить, что при взаимодействии наивных лимфоцитов и Т-клеток памяти с активированными «эпитопом» ДК, происходит дифференцировка (поляризация) Т-лимфоцитов в направлении Th17 (CD4⁺IL17⁺) [Brzustewicz E. et al., 2015] с последующим формированием клона аутореактивных Th17-клеток. В синовиальной оболочке больных РА также была идентифицирована субпопуляция Th17-клеток, продуцирующая провоспалительные факторы и резистентная к супрессорному действию Treg клеток [Basdeo S.A. et al., 2015]. Предполагается, что популяция PD-1^{hi}CXCR5⁻CD4⁺ Т-клеток, выявленная на периферии и в синовиальной ткани у пациентов с РА, обладает способностью стимулировать В-клеточный ответ и продукцию антител [Rao D.A. et al., 2017]. Кроме того, установлено, что непрерывная стимуляция TCR-CD3-комплекса CD4⁺ Т-лимфоцитов при РА приводит к усилению активности ядерного фактора NF-κB и повышению секреции ряда провоспалительных медиаторов [Tsubaki M. et al., 2015]. Интересно, что пациенты с необратимыми симптомами РА (длительность 1-

5 лет) имеют наиболее высокий процент CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих маркеры ранней и поздней активации (CD69, CD25, HLA-DR, CD95) [Brzustewicz E. et al., 2015; Veale D.J. et al., 2017].

При РА наблюдается ускоренный процесс инволюции тимуса, что отражается в снижении образования наивных Т-клеток, редукции Т-клеточного репертуара [Wagner U.G. et al., 1998], гомеостатической пролиферации Т-клеток памяти (увеличивая тем самым количество аутореактивных Т-лимфоцитов на периферии) и хроническом воспалении [Thewissen M. et al., 2005; Lindstrom T.M. et al., 2010; Chalan P. et al., 2015]. Численность пула Т-клеток памяти с фенотипом CD4⁺CD45RO⁺ демонстрирует корреляцию с прогрессированием РА [Nanki T. et al., 2000; Elyaman W. et al., 2008]. Имеются доказательства того, что синовиальная жидкость пациентов с РА обогащена также В-клетками памяти, которые экспрессируют CXCR4 вместе с рецепторами к IL-8 (CXCR1 и CXCR2). Эти клетки накапливаются в синовиальной мембране, отвечая за формирование фолликул-подобной структуры, способствуя, тем самым, сохранению хронического синовита [Michelutti A. et al., 2011]. В-клетки (плазмоциты) в зародышевых центрах вторичных лимфоидных тканей, связанных с синовиальной оболочкой, при РА синтезируют РФ – аутоАТ, направленные против Fc-фрагмента иммуноглобулина (Ig) G и АЦАТ [Yu M. et al., 2015].

Кроме того, не вызывает сомнений тот факт, что в патогенезе РА решающую роль играет дисбаланс цитокинов, продуцируемых Th1/Th2/Th17-субпопуляциями лимфоцитов [Brzustewicz E. et al., 2015].

Таким образом, несмотря на многочисленные данные, некоторые аспекты иммунопатогенеза РА остаются до конца неизученными. Очевидным остается существование механизма перераспределения Т-клеточных субпопуляций в сторону увеличения числа клонов аутореактивных Т-клеток, обусловленное патологическим хроническим воспалительным процессом и постоянной антигензависимой активацией Т-лимфоцитов. В связи с этим, логичным является выяснение роли Т-клеточных субпопуляций и синтезируемых ими медиаторов в патогенезе РА.

1.1.2. Т-клеточное звено иммунитета в патогенезе ревматоидного артрита

Созревание Т-клеток в тимусе сопровождается экспрессией CD8⁺ (CTL/цитотоксические) или CD4⁺ (Th/хелперные) гликопротеина [Golubovskaya V. et al., 2016]. CD4⁺ Т-клетки дифференцируются в различные Th субпопуляции: Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Т регуляторные клетки (Treg), Т-фолликулярные хелперы (TFH) [Brzustewicz E. et al., 2015; Golubovskaya V. et al., 2016], которые характеризуются разными цитокиновыми профилями и транскрипционными факторами [Zhu J. et al., 2010; Zheng J. et al., 2011; Gasper D.J. et al., 2014; Golubovskaya V. et al., 2016].

Классические Th1 клетки продуцируют высокие уровни IFN- γ , экспрессируют фактор транскрипции TBX21 и имеют фенотип CCR4⁻CCR6⁻CXCR3⁺ [Paulissen S.M. et al., 2015; Pandya J.M. et al., 2016]. Классические Th2 клетки (CCR4⁺CCR6⁻CXCR3⁻) экспрессируют GATA3, являются основными продуцентами IL-4 и IL-5 [Paulissen S.M. et al., 2015; Pandya J.M. et al., 2016]. Th17 лимфоциты (CCR4⁺CCR6⁺CXCR3⁻) продуцируют IL-17A и экспрессируют RORC [Trifari S. et al., 2009; Pandya J.M. et al., 2016]. Однако в популяции CD4⁺CCR6⁺ клеток присутствуют «неклассические Th1-клетки», не экспрессирующие CCR4 [Pandya J.M. et al., 2016], которые являются Th1/Th17 или Th17.1 лимфоцитами: они объединяют характеристики Th1 и Th17 пулов, экспрессируя TBX21 и RORC, а также продуцируя IFN- γ и IL-17A [Maggi L. et al., 2012].

Как уже упоминалось ранее, РА – системное АИЗ, приводящее к хроническому воспалительному расстройству, в результате нарушения баланса Т-хелперных и Т-регуляторных клеточных популяций [Niu X. et al., 2016].

Преобладание любой из Th популяций в организме может способствовать развитию иммунопатологии [Raphael I. et al., 2015; Sande van de M.G. et al., 2016]. Традиционно считается, что РА является Th1, а не Th2-обусловленным расстройством [Firestein G.S., 2009]. Показано, что в синовиальной ткани CD4⁺ Т-клетки дифференцируются в основном в Th1 эффекторные клетки, которые ответственны за продукцию провоспалительных цитокинов (т.к. IFN- γ и TNF- α), а не в Th2 клетки, продуцирующие противовоспалительные медиаторы (т.к. IL-4, IL-10 и IL-13) [Firestein G.S., 2009; Mateen S. et al., 2016]. Популяция CD4⁺ Th17 лимфоцитов рассматривается как ключевой игрок, участвующий в синовиальном воспалении и последующей костной эрозии, главным образом, за счет продукции

IL-17 и IL-23 [Kuwabara T. et al., 2017; Villanueva M.T., 2017; Pfeifle R. et al., 2017]. Обе популяции CD4⁺: Th1 и Th17 регулируют воспалительный процесс при РА [Mellado M. et al., 2015; Chen J. et al., 2016; Mateen S. et al., 2016]. Показано, что нарушение равновесия между Th1/Th2 и Th17/Treg клеточными субпопуляциями приводит к возникновению, развитию и прогрессии РА [Afzali B. et al., 2007; Chen J. et al., 2012; Chen J. et al., 2016]. Однако участие каждой субпопуляции Т-клеток в патогенезе РА остается предметом дебатов.

1.1.2.1. Характеристика популяций Т-клеток при ревматоидном артрите. Th1/Th2 клеточная парадигма

Th1-клетки. Th1-клетки являются продуцентами провоспалительных цитокинов IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-12 [Schurigt U. et al., 2008; Bansal A.S. et al., 2012; Brzustewicz E. et al., 2015], активирующими врожденный и адаптивный иммунный ответ организма. Иммунологическая реактивность Th1 лимфоцитов связана с клеточно-опосредованным иммунитетом против внутриклеточных патогенов и опухолевых клеток [Boissier M.C. et al., 2008; Pandey A. et al., 2010; Ahmad S.F. et al., 2014; Brzustewicz E. et al., 2015].

Th1 образуются из наивных Т-клеток в момент презентации АГ, при участии IL-12 [Seder R.A. et al., 2003; Gizinski A.M. et al., 2014]. Дальнейшей дифференциации Т-клеток в популяцию Th1 способствуют IL-27 [Astry B. et al., 2011] и IFN- γ [Seder R.A. et al., 2003; Gizinski A.M. et al., 2014;]; последний супрессирует коммитированное развитие других Th-субпопуляций [Gizinski A.M. et al., 2014]. Секрецию IFN- γ стимулируют IL-12 и IL-18.

Основными транскрипционными факторами, экспрессируемыми Th1 лимфоцитами являются T-bet [Zhu J. et al., 2010; Raphael I. et al., 2015; Gagliani N. et al., 2017] и STAT4 [McWilliams I.L. et al., 2015; Mardahl M. et al., 2016; Durán-Avelar M.J. et al., 2016].

Известно, что провоспалительный потенциал Th1-клеток может стать причиной тканевых повреждений при аутоиммунном процессе [Wang D. et al., 2017]. Ряд исследований показал, что Th1 клетки претерпевают аномальную пролиферацию у пациентов с РА, что указывает на ключевую роль Th1 клеток в инициации иммунных ответов при РА [Chen J. et al., 2016]. Так, при РА в

пораженных суставах обнаружена усиленная секреция провоспалительных Th1-медиаторов (IL-2 и TNF- α) и повышение уровня IFN- γ в периферическом русле [Raphael I. et al., 2015; Komatsu N., 2015].

TNF- α . TNF- α (фактор некроза опухоли - α) играет ключевую роль в патогенезе РА. Продуцируется TNF- α активированными макрофагами, а также моноцитами, фибробластами, тучными и NK клетками [Brzustewicz E. et al., 2015]. Действие лиганда TNF- α опосредовано взаимодействием с двумя мембранными рецепторами, 55кДа рецептором, известным как p55 или TNF-R1 (CD120a) и 75кДа рецептором, известным, как p75 или TNF-R2 (CD120b) [García-Hernández M.H. et al., 2014; Brzustewicz E. et al., 2015; Kim E.Y. et al., 2017]. Рецептор p55 экспрессируется на большинстве видов клеток и связывает мембранную и растворимую тримерную формы TNF, тогда как экспрессия рецептора p75 является специфической для иммунных клеток и только мембранный TNF взаимодействует с p75 [García-Hernández M.H. et al., 2014]. Биологическая активность рецептора TNF- α заключается в индукции E-селектина (CD62E), секреции IL-2, IFN- γ и TNF- α Т-клетками и моноцитами и повышении цитотоксичности через усиление регуляции перфорина и гранзима в NK-клетках.

Увеличенные сывороточные уровни TNF- α обуславливают воспалительный ответ и суставную деструкцию при РА [Gizinski A.M. et al., 2014; Theander L. et al., 2017; Kim E.Y. et al., 2017]. TNF- α стимулирует пролиферацию и дифференцировку В-, Т- лимфоцитов и NK-клеток; индуцирует продукцию других провоспалительных цитокинов, таких как IL-1, IL-6, IL-8 и MMP (матриксные металлопротеиназы). Кроме того, TNF- α стимулирует синовиальные клетки к продукции стромелизина, коллагеназы, простагландинов и GM-CSF [Brzustewicz E. et al., 2015] и способствует экспрессии молекул адгезии (ICAM-1) на фибробластах.

Выявлено значительное увеличение плазменных уровней TNF- α , его рецептора и растворимой формы еще до клинических проявлений РА, обеспечивая миграцию и пролиферацию эндотелиоцитов, способствуя образованию новых кровеносных сосудов [Elshabrawy H.A. et al., 2015].

IFN- γ . IFN- γ участвует в воспалительной реакции, опосредующей развитие РА [Brennan F.M. et al., 2008; Astry B. et al., 2011; Schwartz D.M. et al., 2016]. Клетками-продуцентами являются CD4⁺ и CD8⁺ $\alpha\beta$ Т-лимфоциты, $\gamma\delta$ Т-лимфоциты,

НКТ-клетки, NK-клетки и макрофаги [Schindler H. et al., 2001; Billiau A. et al., 2009; Lees J.R. et al., 2015]. Предполагается, что IFN- γ обладает противовоспалительным эффектом (действуя совместно с IL-4), конкурируя с провоспалительным фактором IL-17 [Brasted M. et al., 2005; Chu C.Q. et al., 2007; Satpute S.R. et al., 2009; Lees J.R. et al., 2015].

Th2-клетки. Th2-клетки секретируют широкий спектр медиаторов: IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 и IL-13 [Yamaki K. et al., 2004; Schurigt U. et al., 2008], контролирующей внеклеточную гельминтную инфекцию и циркуляцию патогенов, посредством усиления антител-зависимого иммунного ответа [Moss R.B., et al. 2004; Pandey A. et al., 2010; Bansal A.S. et al., 2012; Ahmad S.F. et al., 2014; Brzustewicz E. et al., 2015].

Для дифференцировки наивных T- клеток в Th2 клеточные клоны во время АГ презентации необходим IL-4 [Gizinski A.M. et al., 2014], а также IL-33 [Kaplan M.H. et al., 2013; Komatsu N., et al. 2015; Rojas-Zuleta W.G. et al., 2016]. Th2-клетки экспрессируют транскрипционные факторы GATA-3 [Noack M. et al., 2014] и STAT6 [Boissier M.C. et al., 2008]. GATA3 - ключевой регуляторный фактор Th2-клеток [Noack M. et al., 2014; Alunno A. et al., 2015]. Наивные CD4⁺ T-клетки экспрессируют его на детектируемых уровнях [Jimeno R. et al., 2015]. Уровень экспрессии GATA3 увеличивается при дифференцировке в Th2, либо снижается при образовании Th1-клеток [James E.A. et al., 2014; Chu Y. et al., 2014; Alunno A. et al., 2015]. Отсутствие GATA3 полностью прекращает Th2-дифференцировку *in vitro* и *in vivo* [Blüml S. et al., 2015; Konya C. et al., 2015].

Отмечено, что синтез IL-4 осуществляется T-клеточными клонами в синовиальной жидкости в период раннего этапа формирования РА [Gerli R. et al., 2002]. На этой стадии в периферической крови преобладают Th2 и Th17 клетки [Pandya J.M. et al., 2016]. Выявленная значимая разница в содержании Th2-клеток в крови у пациентов с ранней стадией РА и здоровых доноров, указывает на важность Th2-клеток в инициации аутоиммунного процесса [Pandya J.M. et al., 2016].

Экспериментальных работ, посвященных роли Th2-клеток и Th2-цитокинов в патогенезе РА, крайне мало. Предполагается, что Th2-цитокины способствуют формированию раннего и хронического воспаления при РА, влияя на

синовиальные фибробласты [Pandya J.M. et al., 2016]. Описана защитная и противовоспалительная роль IFN- γ в экспериментальных моделях артрита [Chu C.Q. et al., 2007]. Генетические нарушения продукции/экспрессии IFN- γ или его рецептора приводят к увеличению активности заболевания [Page C.E. et al., 2010]. В целом, более низкие уровни IFN- γ -продуцирующих клеток в сочетании с более высоким содержанием Th2 и Th17 клеток могут играть роль в индукции перехода от острого воспаления к стойкому хроническому, воздействуя, возможно, на синовиальные фибробласты и поддерживая образование третичных лимфоидных структур в синовиальной среде при раннем РА [Pandya J.M. et al., 2016]. Исходя из опубликованных работ, активация Th2 клеток должна предшествовать активации Th17 лимфоцитов [Kokkonen H. et al., 2010].

С увеличением возраста, при котором ставится диагноз ранний РА, наблюдается рост доли Th2 клеток, в то время как число Th1/Th17 лимфоцитов снижается [Pandya J.M. et al., 2016]. Показано, что у здоровых людей с возрастом количество Th2 клеток также возрастает [Newcomb D.C. et al., 2009], что ассоциируют с увеличением процента заболеваемости РА у пожилых людей [Jordan K. et al., 2007]. С момента открытия Th1/Th2-клеточной дихотомии было обнаружено много дополнительных Th субпопуляций, каждая из которых характеризуется уникальным цитокиновым профилем, функциональными свойствами и предполагаемой ролью в аутоиммунной патологии [Furst D.E. et al., 2014]. Были описаны Th17 клетки, Th17/Th1 (Th17.1) клетки, Т-регуляторные клетки, CXCR5⁺ Т-фолликулярные клетки, связанные с РА [Noack M. et al., 2014; James E. A., 2014; Raphael I. et al., 2015; Alunno A. et al., 2015; Jimeno R. et al., 2015].

Вышесказанное способствовало формированию патогенетической парадигмы РА, основанной на соотношении Th1/Th17-клеток, согласно которой обе популяции лимфоцитов способствуют развитию РА [James E. A., 2014; Mellado M. et al., 2015].

1.1.2.2. Th17/Th1 клеточная парадигма

Th17-клетки. В 2005 году была идентифицирована новая популяция Т-хелперных лимфоцитов, отличных от Th1 и Th2, так называемые Th17-клетки

[Kotake S. et al., 2016a; Kotake S. et al., 2016b; Niu X. et al., 2016]. Th17-клетки секретируют широкий спектр цитокинов: IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, TNF- α [Sarkar S. et al., 2014; Roeleveld D.M. et al., 2015], GM-CSF [Roeleveld D.M. et al., 2015; Paulissen S.M. et al., 2015], защищая организм от грибковых и бактериальных (особенно грамотрицательных) инфекций, а также участвуют в воспалительных и аутоиммунных реакциях [Noack M. et al., 2014; Ahmad S.F. et al., 2014; Brzustewicz E. et al., 2015; Lochner M. et al., 2015].

Для дифференцировки в Th17-клетки требуется набор специфических цитокинов: TGF- β (трансформирующий фактор роста бета) [Konya C. et al., 2015] в сочетании с IL-6 [Pandey A. et al., 2010] или рецептором IL-21R и фактором транскрипции ROR γ t [Boissier M.C. et al., 2008; Noack M. et al., 2014; Ahmad S.F. et al., 2014; Alunno A. et al., 2015; Lochner M. et al., 2015; Galligan C.L. et al., 2016; Gharibi T. et al., 2016]. Рецепторы, родственные ретиноидным (Retinoic acid related orphan receptors (ROR)), являются ключевыми транскрипционными факторами при дифференцировке Th17-клеток [Gizinski A.M. et al., 2014]. TGF- β ингибирует дифференцировку человеческих Th17-клеток [Boissier M.C. et al., 2008]. Провоспалительный цитокин IL-23 способствует экспансии Th17 и индуцирует продукцию IL-17 [Gizinski A.M. et al., 2014], участвуя в сохранении и поддержании жизнеспособности пула Th17-клеток [Brzustewicz E. et al., 2015].

Кроме того, для дифференцировки Th17-клеток необходим фактор транскрипции IRF4 [Weng C.H. et al., 2016], ингибирующий синтез IL-22 [Weng C.H. et al., 2016]. Обнаружен протеин, взаимодействующий с IRF4, который назвали Def6 (IBP/SLAT). Одним из ключевых механизмов, с помощью которых Def6 регулирует функцию IRF4, является ингибирование его способности фосфорилироваться через ROCK2 [Weng C.H. et al., 2016]. ROCK2-опосредованное фосфорилирование IRF4 усиливает его связь с IL-17 и IL-21 промоторами, способствуя увеличению секреции IL-17 и IL-21 [Weng C.H. et al., 2016].

Неоднократно сообщалось о важной роли этих клеток в патогенезе РА [Raychaudhuri S.P. et al., 2012; Kotake S. et al., 2016b; Karri S.K. et al., 2017]. Raza K. и соавт. (2005) показали, что в периферической крови пациентов с диагнозом РА, установленным менее девяти недель назад, уровень IL-17 значительно повышен [Raza K. et al., 2005; Kotake S. et al., 2016a; Kotake S. et al., 2016b]. Th17 и IL-17

являются индукторами воспаления при РА, активируя также механизмы, приводящие к разрушению сустава [Tabarkiewicz J. et al., 2015; Wu Q. et al., 2016]. Th17-клетки являются мощными активаторами ферментов, участвующих в разрушении тканей, росте паннуса, участвующих в процессах остеокластогенеза и ангиогенеза [Moon Y.M. et al., 2012]. IL-17 усиливает продукцию MMP-1 и -3, а также некоторых провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8) [Li H. et al., 2012; Brzustewicz E. et al., 2015; Roeleveld D.M. et al., 2015]. Выявлено, что IL-17 способствует разрушению костной ткани, вызывая усиление секреции iNOS через RANKL и M-CSF стимуляцию остеокластов [Konya C. et al., 2015; Rossini M. et al., 2016]. Кроме того, IL-17 повышает инфильтрацию иммунных клеток в синовию, посредством стимуляции продукции таких хемокинов, как CXCL5 и CXCL12. Также установлено участие IL-17 в образовании новых сосудов, посредством усиления миграции эндотелиальных клеток в синовию, и их продукции VEGF [Konya C. et al., 2015]. Выявлена роль IL-17 в активации системы комплемента [Konya C. et al., 2015].

Kokkonen H. и коллеги отметили, что концентрация IL-17 в крови у пациентов на ранних этапах заболевания значительно выше, по сравнению с более поздними стадиями болезни [Kokkonen H. et al., 2010; van Hamburg J. P. et al., 2013; Kotake S. et al., 2016a; Kotake S. et al., 2016b]. Kochi Y. и др. продемонстрировали, что молекула CCR6, являющаяся специфическим маркером Th17-клеток, связана с развитием РА [Kochi Y. et al., 2010; Kotake S. et al., 2016 a; Kotake S. et al., 2016b]. Вероятно, IL-17 играет ключевую роль на ранней стадии развития РА [Kotake S. et al., 2016a]. Кроме того, выявлена пластичность Т-хелперных лимфоцитов [Hirahara K., 2013; Kotake S. et al., 2016a; Kotake S. et al., 2016b]. Сообщалось о способности Th17-клеток трансформироваться в популяцию Th1 [Nakayamada S. et al., 2012; Kotake S. et al., 2016a; Kotake S. et al., 2016b]. Молекула CD161 является маркером Th17-клеток [Cosmi L. et al., 2008; Kotake S. et al., 2016a; Kotake S. et al., 2016b]. Однако, Th1⁺IFN- γ ⁺ клетки, образованные из Th17 лимфоцитов, также его экспрессируют [Cosmi L. et al., 2011; Kotake S. et al., 2016a; Kotake S. et al., 2016b]. Учитывая вышесказанное, в синовиальной жидкости пациентов с ювенильным идиопатическим артритом (ЮИА) были обнаружены Th1⁺CD161⁺ клетки, отличающиеся от «классических» Th1-клеток [Annunziato F. et al., 2013; Kotake S.

et al., 2016a; Kotake S. et al., 2016b]. Annunziato F. и др. сообщили, что Th17-клетки человека формируют пул Th17/Th1 лимфоцитов (продуцирующие IL-17 и IFN- γ), после чего трансформируются в «неклассические Th1-клетки» [Annunziato F. et al., 2013; Kotake S. et al., 2016a; Kotake S. et al., 2016b].

Интересно, что у лиц, страдающих РА более 13 лет, в периферической крови преобладающей популяцией Т-лимфоцитов являлись Th17-клетки, а не Th1 [Yamada H. et al., 2008; Kotake S. et al., 2016a; Kotake S. et al., 2016b]. Предполагают, что популяция Th17-клеток преобразуется в Th1-клетки на ранней стадии РА, что подтверждается повышенным соотношением Th1-клеток, сформированных из Th17-клеток именно на раннем этапе развития [Kotake S. et al., 2016a; Kotake S. et al., 2016b]. Случаи обнаружения высоких концентраций IFN- γ в синовиальной жидкости пациентов с РА достаточно редки [Pandya J.M. et al., 2016]. Однако у лиц с установленным диагнозом РА, IFN- γ -продуцирующие клоны Т-лимфоцитов были выявлены в синовиальной жидкости и периферической крови [Pandya J.M. et al., 2016]. Кроме того, процентное соотношение Th17⁺IFN- γ ⁺ клеток среди Th-клеток памяти в периферической крови пациентов с начальной стадией РА обратно пропорционально коррелирует с титром АЦЦП антител [Tabarkiewicz J. et al., 2015; Kotake S. et al., 2016a; Kotake S. et al., 2016b].

Отмечено, что частота Th2- и Th17-клеток (CCR4⁺CXCR3⁻) у больных с ранним диагностируемым РА была выше, а процент Th1 и Th17.1 (CCR4⁻), напротив, ниже, по сравнению со здоровыми донорами [Pandya J.M. et al., 2016]. Профиль Th-клеток при раннем РА смещен в сторону CCR4-экспрессирующих лимфоцитов. Показано, что лиганды к CCR4 обильно присутствуют в синовии у пациентов с ранним РА [Raza K. et al., 2005; Flytlie H.A. et al., 2010; Pandya J.M. et al., 2016]. Эти хемокины могут облегчить миграцию Т-клеток памяти (несущих CCR4) в синовиальную мембрану при раннем РА. Исследования показывают, что начальный этап формирования РА связан с преобладанием Th2- и Th17- цитокинов в синовии [Raza K. et al., 2005; Fagin U. et al., 2012; Pandya J.M. et al., 2016].

1.1.2.3. Th17/Treg клеточная парадигма

Трег-клетки. Неоднократно подчеркивалась роль дисбаланса популяций провоспалительных Th17 лимфоцитов и регуляторных Т-клеток (Treg) в патогенезе АИЗ [Samson M. et al., 2012; Moradi B. et al., 2014; Tao J.H. et al., 2017].

Treg экспрессируют транскрипционный фактор FoxP3, опосредующий наличие противовоспалительных функций [Liu J. et al., 2017] и продуцируют TGF- β , IL-10, IL-35 [Boissier M.C. et al., 2008]. Для Treg клеток характерна высокая экспрессия мембранных молекул CD25 (альфа-цепи рецептора IL-2), CTLA-4 (CD152, цитотоксического Т-лимфоцитарного антигена 4/ cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) и GITR (glucocorticoid-induced tumor-necrosis-factor-receptor-related protein) [Haque M. et al., 2014]. Однако, поскольку эти белки экспрессируются также и на активированных Т-клетках, это осложняет идентификацию искомой популяции [Haque M. et al., 2014]. CD4⁺CD25⁺ клетки составляют примерно 5-10% от зрелых CD4⁺ Т-клеток у мышей и людей и примерно 1-2% Treg клеток детектируется в периферической крови [Fessler J. et al., 2013; Haque M. et al., 2014; Fessler J. et al., 2017]. Молекула CTLA-4, экспрессируемая Treg-клетками [Komatsu N. et al., 2009; Komatsu N. et al., 2015], структурно ассоциирована с рецептором костимуляции CD28, связываясь с более высокой аффинностью с CD80 и CD86, чем CD28. Связывание CTLA-4 с CD80 и CD86, в отличие от CD28, индуцирует в клетке негативный сигнал, ингибируя экспрессию IL-2, прекращая тем самым процесс пролиферации антигенспецифичного клона. Интересно, что CTLA-4 также может индуцировать отрицательные сигналы в антиген-презентирующих клетках (АПК) через его связывание с CD80/86 на поверхности АПК [Gizinski A.M. et al., 2014; Noack M. et al., 2014; Alunno A. et al., 2015; Byng-Maddick R. et al., 2015].

Согласно данным нескольких научных групп, в периферической крови пациентов с РА количество Th17-клеток значительно увеличено, тогда как в отношении Treg популяции регистрируется дефицит по сравнению с данными относительно здоровых доноров [Niu Q. et al., 2012; Samson M. et al., 2012; Nie H. et al., 2013; Tao J.H. et al., 2017]. Доказана важная роль дисбаланса Th17/Treg-клеток в воспалении и суставной деструкции при РА и в экспериментальных моделях артрита [Niu Q. et al., 2012; Wang J. et al., 2012; Liu J. et al., 2017]. Предполагают, что при РА регистрируются количественные и/или качественные дефекты Treg

популяции клеток [Fessler J. et al., 2013; Moradi B. et al., 2014; Fessler J. et al., 2017; Tao J.H. et al., 2017].

Lawson C. и коллеги (2006) наблюдали снижение количества циркулирующих $CD4^+CD25^{high}$ Treg клеток у пациентов с диагнозом ранний РА [Lawson C.A. et al., 2006; Liu J. et al., 2017]. Однако другие исследователи не смогли повторить их эксперименты [Han G.M. et al., 2008]. Ehrenstein M. и др (2004) показали наличие дефекта в супрессорном механизме Treg-клеток, выраженном в слабом снижении провоспалительного цитокинового микроокружения [Ehrenstein M.R. et al., 2004; Liu J. et al., 2017]. Тогда как другие работы демонстрируют нормальную супрессорную функцию этих лимфоцитов [Han G.M. et al., 2008].

Описанные противоречия связаны, возможно, с неоднородностью пула Treg-клеток и возможностью количественного перераспределения разных их популяций в процессе формирования РА [Dejaco C. et al., 2006; Walter G.J. et al., 2016; Ye L. et al., 2016; Liu J. et al., 2017]. Среди Treg-клеток принято выделять популяцию естественных (нTreg) клеток и индуцированных (иTreg) Treg [Bystrom J. et al., 2016]. Также как не-Treg-клетки (наивные $CD45RA^+CD25^+$ клетки), образованные в тимусе и попавшие в периферическое русло крови, Treg подвергаются взаимодействию с АГ и дифференцируются в Treg-клетки памяти ($CD25^{high}CD45RO^+$), обладающие низкой пролиферативной активностью (по сравнению с наивными Treg), более короткими теломерами и более длинной репликативной историей [Hunt L. et al., 2016; Ye L. et al., 2016; Liu J. et al., 2017]. Обнаружено, что в периферической крови и синовиальной жидкости больных РА, имеются Treg-клетки с фенотипом $CD4^+CD25^+FoxP3^+CD28^-$, характеризующиеся низким супрессорным эффектом, продукцией про- и противовоспалительных цитокинов и сниженной жизнеспособностью, по сравнению с $CD28^+$ Treg-клетками [Liu J. et al., 2017]. Данный феномен напрямую связывают со старением иммунной системы, характерной для РА. Учитывая, что Treg-клетки составляют порядка 5% от общей субпопуляции $CD4^+$ Т-лимфоцитов, даже незначительные количественные/качественные изменения в данном пуле клеток могут привести к серьезным изменениям иммунных реакций, учитывая дисрегуляцию иммунной системы при РА [Liu J. et al. 2017].

Установлено, что у пациентов с РА генерация пула Th17-клеток стимулируется провоспалительными цитокинами, такими как IL-6 и IL-23, в то время как концентрация TGF- β и количество Treg-клеток снижаются [Tabarkiewicz J. et al., 2015], что способствует возникновению аутоиммунитета [Wang J. et al., 2012].

Как уже упоминалось ранее, исследования последних лет подтверждают наличие функциональной пластичности эффекторных Т-клеток под влиянием изменяющихся условий микросреды с последующей их трансформацией в другие типы клеток. Периферические и тимусные Treg-клетки демонстрируют высокую степень пластичности с коммитированием в сторону пула Th17-клеток при стимуляции анти-CD3, анти-CD28 и IL-6 [Yang X.O. et al., 2009]. Доказано, что при РА Th17-клетки в синовии образуются из Treg-клеток под влиянием IL-6, секретируемого фибробластоподобными синовиоцитами [Brzustewicz E. et al., 2015; Komatsu N. et al., 2015a; Komatsu N. et al., 2015b; Liu J. et al., 2017].

1.1.3. Созревание Т-лимфоцитов и феномен иммунологического старения при ревматоидном артрите

1.1.3.1. Краткая характеристика и функциональные особенности субпопуляций Т-клеток иммунной памяти

CD45 – гликопротеин, общий лейкоцитарный антиген [Earl L.A. et al., 2008; Henson S.M. et al., 2012]. Известно несколько изоформ этой молекулы [Henson S.M. et al., 2012], полученных в результате альтернативного сплайсинга 4, 5 и 6 экзонов мРНК, который приводит к формированию CD45RA, RB, RC и др. [Henson S.M. et al., 2012; Martini V. et al., 2017].

Для наивных Т-клеток характерна экспрессия изоформы с высоким молекулярным весом, содержащей А-экзон (CD45RA), которая заменяется после их активации изоформой с низким молекулярным весом - CD45RO [Sallusto F. et al., 2004; Henson S.M. et al., 2012; Paulsen E.E. et al., 2015; Jia Q. et al., 2015]. Однако высоко дифференцированные Т-клетки памяти вновь начинают экспрессировать на клеточной поверхности CD45RA [Henson S.M. et al., 2012]. Таким образом, молекула CD45 является маркером зрелости и активации Т-клеток [Henson S.M. et al., 2012].

Как уже упоминалось ранее, Т-клетки созревают в тимусе и экспрессируют поверхностный Т-клеточный рецептор (TCR), а также CD8⁺/CD4⁺ гликопротеин. В определенных условиях Т-клетки дифференцируются в различные Т-клеточные (цитотоксические/хелперные) популяции эффекторных клеток (Teff) [Golubovskaya V. et al., 2016]. Наивные покоящиеся Т-клетки являются долгоживущей популяцией, характеризующейся медленной пролиферацией и требующие гомеостатических цитокинов (IL-7) для поддержания жизнеспособности [Wakim L.M. et al., 2010]. Они равномерно экспрессируют CCR7, ограничивая преимущественное место их локализации лимфоидными тканями [Farber D.L. et al., 2014] и костимуляторные молекулы CD27, CD28 [Akbar A.N. et al., 2004]. Презентация наивным Т-клеткам патоген-закодированного пептидного лиганда через TCR приводит к их активации, масштабной клональной экспансии, изменению транскрипционной программы и дифференцировке в Teff, которые мигрируют к месту инфекции и устраняют патоген [Wakim L.M. et al., 2010; Golubovskaya V. et al., 2016].

Однако после фазы расширения, которая характеризуется ассиметричным клеточным делением с последующим формированием широкого диапазона клеточных фенотипов [Gasper D.J. et al., 2014], 90-95% эффекторных Т-клеток системы иммунитета подвергаются апоптозу (фаза контракции). Выжившие 5-10% клеток представляют собой пул клеток памяти [Wakim L.M. et al., 2010]. Популяции Т-клеток памяти суммарно являются самым крупным лимфоцитарным пулом в организме [Farber D.L. et al., 2014]. Выявлено, что популяции долгоживущих Т-клеток памяти гетерогенны и при повторном АГ воздействии развивают более эффективный и мощный иммунный ответ против патогена, по сравнению с первичным иммунным ответом [Wakim L.M. et al., 2010; Gasper D.J. et al., 2014; Golubovskaya V. et al., 2016].

Tscm (Т-стволовые клетки памяти) напоминают наивные Т-клетки, имеют фенотип CD45RA⁺CD45RO⁻ и экспрессируют высокие уровни костимуляторных рецепторов CD27, CD28, IL-7R α , CD62L, CCR7 [Farber D.L. et al., 2014]. Эти клетки могут самообновляться, несут мультипотентный потенциал, и отличаются высокой пролиферативной активностью [Farber D.L. et al., 2014]. Возможно, в дальнейшем

они дифференцируются в Тсм (центральные клетки памяти) и Тем (эффекторные клетки памяти) клетки памяти [Farber D.L. et al., 2014].

Неполяризованные Тсм экспрессируют CD45RO, CD95 [Akbar A.N. et al., 2004], а также CCR7 и CD62L, рецепторы, необходимые для миграции Т-клеток во вторичные лимфоидные органы [Sallusto F. et al., 2004; Wakim L.M. et al., 2010]. Тсм клетки по сравнению с наивными Т-клетками имеют более высокую чувствительность к АГ-стимуляции, в меньшей мере нуждаются в костимуляторных сигналах и отличаются повышенной экспрессией CD40L, обеспечивая тем самым эффективную связь с ДК и В-клетками [Sallusto F. et al., 2004]. Отличаются наивысшей пролиферативной способностью [Farber D.L. et al., 2014]. После активации TCR, Тсм продуцируют в основном IL-2, но после сильного активационного сигнала они пролиферируют и дифференцируются в поляризованные Тем [Seder R.A. et al., 2003; Pepper M. et al., 2011; Farber D.L. et al., 2014] и секретируют в больших количествах IFN- γ и IL-4 [Sallusto F. et al., 2004]. Однако, часть эффекторных Т-клеток сразу переходит в пул Тем клеток [Golubovskaya V. et al., 2016].

Тем клетки теряют маркер CCR7 и являются гетерогенными относительно экспрессии CD62L, но несут маркеры, опосредующие их миграционный потенциал в воспалительные нелимфоидные периферические области [Geginat J. et al., 2003; Sallusto F. et al., 2004; Wakim L.M. et al., 2010]. Тем отличаются быстрой эффекторной функцией после распознавания АГ [Sallusto F. et al., 2004; Wakim L.M. et al., 2010]. В периферической крови здоровых людей Тем клетки имеют самый высокий процент IFN- γ - и TNF- α -продуцирующих клеток и наименьшую долю IL-2-секретирующих клеток [Farber D.L. et al., 2014]. Пул Тем клеток содержит Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 или CTL популяции лимфоцитов, отличающиеся функциональными возможностями, фенотипическими маркерами и активацией транскрипционных факторов [Sallusto F. et al., 2004; Golubovskaya V. et al., 2016].

Считается, что линия дифференцировки от наивных (Tn) до Тем клеток отличается в CD4⁺/CD8⁺ популяциях [Golubovskaya V. et al., 2016]. Для предкоммитированной линии CD4⁺ Т-клеток характерен переход Tn→Teff↔Тем и Tn→Teff→Тсм [Golubovskaya V. et al., 2016]. Для популяции CD8⁺ Т-лимфоцитов

справедлива иная схема дифференцировки: $T_n \rightarrow (APC) \rightarrow T_{scm} \rightarrow T_{cm} \rightarrow T_{em} \rightarrow T_{eff}$, сопровождаемая постепенным возрастанием эффекторной функции и снижением пролиферативного потенциала [Seder R.A. et al., 2003; Golubovskaya V. et al., 2016; Verma K. et al., 2017]. Так, наивные Т-клетки отличаются более короткой продолжительностью жизни на периферии (3-6 мес), по сравнению с популяциями Т-клеток памяти (1-12 мес) [Weng N.P. et al., 2008; Goronzy J.J. et al., 2010; Farber D.L. et al., 2014]. Тем клетки имеют более короткий период жизни, чем Тсм и это напрямую связано с длиной теломер в этих клетках [Farber D.L. et al., 2014].

Таким образом, при первичной АГ-стимуляции наивных Т-клеток, происходит их активация, пролиферация и предкоммитирование с целью образования в дальнейшем гетерогенного пула клеток памяти. Клеточные популяции, входящие в его состав, идентифицируют на основе экспрессии поверхностных маркеров.

1.1.3.2. Аспекты старения иммунной системы. Инволюция тимуса и изменения Т-клеточного звена в патогенезе ревматоидного артрита

Клетки с высоким пролиферативным потенциалом, такие как Т-лимфоциты, вступают в состояние ограниченного клеточного деления, называемого *клеточным старением* [Tu W. et al., 2016]. Важным признаком старения иммунной системы является *инволюция тимуса*, во время которого эпителиальное пространство заменяется жировой тканью [Linton P.J. et al., 2004; Thewissen M. et al., 2005; Campisi J. et al., 2007; Lindstrom T.M. et al., 2010]. Этот процесс реструктуризации вызывает снижение выхода новых Т-клеток из тимуса [Linton P.J. et al., 2004; Thewissen M. et al., 2005] и редукцию Т-клеточного разнообразия [Lindstrom T.M. et al., 2010]. Альтернативным объяснением снижения генерации Т-клеток может быть снижение числа тимусных Т-клеточных предшественников, образованных из гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) [Lindstrom T.M. et al., 2010]. Снижение генерации новых Т-лимфоцитов вызывает компенсаторное усиление пролиферации наивных и Т-клеток памяти на периферии, так называемой *гомеостатической пролиферацией*, которая поддерживает постоянное количество Т-лимфоцитов на протяжении всей жизни и становится особенно важной с возрастом [Thewissen M.

et al., 2005; Seddiki N. et al., 2006; Lindstrom T.M. et al., 2010]. Прогрессирующее снижение генерации Т-клеток и увеличение антигенной нагрузки сопровождается сдвигом в сторону пула Т-клеток памяти, с функциональными изменениями, обусловленными сменой экспрессирующихся рецепторов [Lindstrom T.M. et al., 2010].

Стареющие клетки необратимо теряют способность к пролиферации, оставаясь жизнеспособными и метаболически активными. С возрастом их количество увеличивается. Такие клетки характеризуются репликативным стрессом, прекращением ростовой активности, резистентностью к апоптозу, изменением генной экспрессии, и появлением на клеточной мембране «молекул старения» (например, β -галактозидаза, p16), являются CD28-негативными и приобретают иные функциональные свойства [Thewissen M. et al., 2005; Tu W. et al., 2016]. Несмотря на роль CD28 в активации Т-клеток [Acuto O. et al., 2003; Voesteanu A.C. et al., 2009; Lindstrom T.M. et al., 2010], CD4⁺CD28^(null) Т-клетки сохраняют способность продуцировать лимфокины и, вероятно, являются *аутореактивными* [Lindstrom T.M. et al., 2010; Bhargava P. et al 2015; Broadley I. et al., 2017] (рисунки 1- 2).

Основной особенностью CD4⁺CD28^{null} Т-клеток является потеря CD28, ко-стимулирующего рецептора, который имеет решающее значение для активации, пролиферации и выживания CD4⁺ Т-клеток [Echeverría A. et al., 2015] (рисунки 1-2). В целом, отсутствие CD28-трансдуцированных сигналов во время активации Т-клеток, индуцирует состояние анергии и приводит к отсутствию реакции лимфоцитов на АГ-стимуляцию [Appleman L.J. et al., 2003; Thewissen M. et al., 2007a; Thewissen M. et al., 2007b]. Однако это не относится к CD4⁺CD28^{null} Т-клеткам, которые вместо анергии приобретают модифицированные эффекторные функции и могут быть ре-стимулированы антигенами. Кроме того, повторная антигенная стимуляция может способствовать экспансии этих лимфоцитов [Pieper J. et al., 2014; Dumitriu I.E. et al., 2015]. Также, CD4⁺CD28^{null} Т-лимфоциты проявляют сильные эффекторные функции, секретируя воспалительные цитокины IFN- γ и TNF- α [Dumitriu I.E. et al., 2012; Pieper J. et al., 2014; Echeverría A. et al., 2015; Dumitriu I.E. et al., 2015].

Другой особенностью, которая отличает CD4⁺CD28null от CD4⁺CD28⁺ Т-лимфоцитов, является экспрессия цитотоксических молекул перфорина и гранзима В [Dumitriu I.E. et al., 2012; Pieper J. et al., 2014; Dumitriu I.E. et al., 2015], которые физиологически используются НК-клетками и цитотоксическими CD8⁺ Т-лимфоцитами для уничтожения клеток-мишеней. Также характерной для CD4⁺CD28⁺ Т-лимфоцитов является экспрессия рецепторов НК-клеток, таких как NKG2D [Pieper J. et al., 2014; Dumitriu I.E. et al., 2015].

CD4⁺CD28null Т-клетки становятся резистентными к индукции апоптоза и супрессорному действию Treg-клеток, по сравнению с CD28⁺ аналогами [Lindstrom T.M. et al., 2010; Dumitriu I.E. et al., 2015]. Отмечено, что CD4⁺CD28null лимфоциты в недостаточной степени способны продуцировать IL-2, что делает их более устойчивыми к супрессорному действию Treg [Thewissen M. et al., 2007b]. Таким образом, CD4⁺CD28null могут избегать иммунологического контроля Treg-клеток и беспрепятственно индуцировать воспаление.

Предположительно, CD4⁺CD28null Т-лимфоциты являются *аутореактивными клетками*, и повторная ауто-антигенная стимуляция приводит к их пролиферации [Thewissen M. et al., 2007b; Dumitriu I.E. et al., 2015; Fessler J. et al., 2016]. Существует альтернативная гипотеза причины, приводящей к экспансии CD4⁺CD28null клеток. Возможно, что для активации процесса пролиферации и индукции эффекторных функций в этих клетках достаточными могут быть сигналы иного рода (лиганды для НК-клеточных рецепторов, хемокины, адгезивные молекулы), а не антигены [Goronzy J.J. et al., 2005; Sawai H. et al., 2005; Dumitriu I.E. et al., 2015] (рисунок 2).

У новорожденных почти все Т-лимфоциты экспрессируют CD28, тогда как при старении частота CD8⁺CD28null и CD4⁺CD28null Т-клеток в периферической крови возрастает [Pieper J. et al., 2014]. Показано, что многократное воздействие одним и тем же антигеном на Т-клетки *in vitro* подавляет экспрессию CD28 и активность теломеразы [Lindstrom T.M. et al., 2010]. Интересно, что в CD4⁺CD28null Т-клетках отсутствует мРНК гена CD28, свидетельствуя, что потеря поверхностной молекулы CD28 является результатом блока транскрипции, который регулируется связыванием ядерных белковых комплексов с α и β -мотивом в промоторе гена CD28 [Dumitriu I.E. et al., 2015].

Однако потеря экспрессии CD28 не является специфическим маркером старения, поскольку CD4⁺CD28null Т-клетки представляют собой гетерогенную популяцию, включающую не только стареющие, но и различные типы эффекторных Т-лимфоцитов [Pieper J. et al., 2014; Dumitriu I.E. et al., 2015]. Важно отметить, что у лиц пожилого возраста наблюдается выраженная экспансия CD8⁺CD28null Т-клеток, тогда как экспансия CD4⁺CD28null Т-клеток обнаруживается редко в отсутствии воспалительных сопутствующих заболеваний [Dumitriu I.E. et al., 2015], что указывает на большую восприимчивость CD8⁺ Т-клеток к репликативному старению.

Экспрессия молекулы CD27 также постепенно снижается в процессе дифференцировки Т-клеток, обуславливая прекращение пролиферативной активности и сопутствующие процессы клеточного старения [Pieper J. et al., 2014; Dumitriu I.E. et al., 2015]. Показано, что CD27-негативные лимфоциты находятся в терминальной стадии дифференцировки, отличаются короткой длиной теломер и нарушенной пролиферацией.

Известно, что на этапе первичного АГ-ответа Т-клетки способны индуцировать экспрессию теломеразы, увеличивая тем самым длину теломер [Akbar A.N. et al., 2004], гарантируя защиту Т-клеток от апоптоза до уничтожения патогена и последующее формирование пула Т-клеток памяти. Высоко дифференцированные Т-клетки теряют активность теломеразы и имеют значительно сниженную способность к делению, тем самым ограничивается продолжительность их жизни [Akbar A.N. et al., 2004].

Было отмечено, что укорочение теломер встречается при ряде хронических воспалительных заболеваний [Liuzzo G. et al., 2007; Goronzy J.J. et al., 2010; Weyand C.M. et al., 2014]. Так, у больных РА регистрируется теломерная эрозия в мононуклеарных клетках (МНК) периферической крови, по сравнению с группой здоровых доноров, что связывают с ускоренной пролиферацией Т-клеток при аутоиммунном процессе [Goronzy J.J. et al., 2010]. При РА также наблюдается укорочение теломер в популяциях наивных клеток предшественниц, Т-лимфоцитах памяти и в гемопоэтических стволовых клетках. Кроме того, снижение уровня экспрессии TCR указывает на ограниченный выход Т-клеток из тимуса [Goronzy

J.J. et al., 2010; Weyand C.M. et al., 2014]. Предполагают, что у пациентов с РА нарушен механизм реактивации теломеразы [Weyand C.M. et al., 2014].

Недавно было обнаружено, что CD4⁺CD28null Т-клетки сохраняют способность к пролиферации *in vitro* в ответ на анти-CD3-антитела, хотя и с более низкой скоростью деления по сравнению с CD4⁺CD28⁺ Т-клетками, указывая, что CD4⁺CD28null Т-клетки не подвергаются репликативному старению. Стареют ли CD4⁺CD28null Т-клетки или нет, ясно, что они обладают свойствами, отличными от тех, которые приписываются иммунно-истощенным стареющим лимфоцитам, индуцированным хронической повторной стимуляцией вирусами.

1.1.3.3. Феномен иммунологического старения и его связь с патогенезом ревматоидного артрита

Патологические особенности, типичные для иммунной дисфункции у пожилых людей, включающие нарушения регуляции врожденных и адаптивных иммунных реакций, характерны также и для РА, заболеваемость которым увеличивается с возрастом [Lindstrom T.M. et al., 2010]. Показано, что старение иммунной системы способствует развитию РА [Pedersen J.K. et al., 2007; Lindstrom T.M. et al., 2010]. Таким образом, физиологический иммунитет может сделать людей пожилого возраста чувствительными к формированию РА, тогда как преждевременное старение иммунной системы может привести к РА у молодых людей [Colmegna I. et al., 2008; Lindstrom T.M. et al., 2010]. Так, хроническая иммунная стимуляция, характерная для РА, может вызвать старение иммунной системы и привести к прогрессированию заболевания [Weng N.P. et al., 2009; Lindstrom T.M. et al., 2010]. Описаны случаи инволюции тимуса у пациентов с РА [Colmegna I. et al., 2008; Lindstrom T.M. et al., 2010]. Факт ускоренного старения Т-клеток при РА является общепризнанным. Изменения в Т-клеточном гомеостазе обнаруживаются на раннем этапе развития РА и не зависят от продолжительности заболевания, указывая на связь преждевременного снижения разнообразия Т-клеточного репертуара с РА [Fujii H. et al., 2009; Lindstrom T.M. et al., 2010]. Отмечено преждевременное укорочение теломер в Т-клетках при РА, которое может отображать преждевременное старение ГСК-предшественников или большую гомеостатическую пролиферацию Т-клеток [Lindstrom T.M. et al., 2010].

Недавно было выдвинуто иное объяснение: при РА регуляция теломеразного фермента является дефектной [Lindstrom T.M. et al., 2010].

Первоначально CD4⁺CD28null Т-клетки были идентифицированы у пациентов с РА [Dumitriu I.E. et al., 2015]. Возможно, эти клетки возникают вследствие ускорения гомеостатической пролиферации и благодаря аутореактивности, способствующей нарушению толерантности, приводящей к развитию РА [Lindstrom T.M. et al., 2010] (рисунок 1). Однако, было показано, что появление CD4⁺CD28null Т-клеток при РА не коррелирует со снижением тимусной активности [Thewissen M. et al., 2007b; Lindstrom T.M. et al., 2010], что может быть обусловлено высоким уровнем апоптоза наивных Т-лимфоцитов и появлением CD4⁺CD28null Т-клеток памяти, вследствие гомеостатического ремоделирования Т-клеточного компартмента [Lindstrom T.M. et al., 2010]. Также не исключается, что появление CD4⁺CD28null клеток является вторичным по отношению к развитию РА [Lindstrom T.M. et al., 2010; Matsuki F. et al., 2013; Matsuki F. et al., 2014]. В этом случае, генерации CD4⁺CD28null Т-клеток способствует хроническая иммунная стимуляция при РА.

Повышение числа циркулирующих CD4⁺CD28null Т-клеток регистрируется у большинства больных РА, тогда как у некоторых пациентов данная популяция клеток идентифицирована также в синовиальной жидкости [Fasth A.E. et al., 2007; Lindstrom T.M. et al., 2010; Matsuki F. et al., 2014; Dumitriu I.E. et al., 2015]. Однако последующие исследования не смогли подтвердить наличие CD4⁺CD28null Т-клеток в синовиальной жидкости или синовиальной мембране больных РА [Dumitriu I.E. et al., 2015]. Исследованиями было выявлено, что частота CD4⁺CD28null Т-клеток коррелирует с тяжестью РА и внесуставными поражениями (например, сосудистым воспалением) [Matsuki F. et al., 2013; Matsuki F. et al., 2014; Dumitriu I.E. et al., 2015]. Выявлено, что CD4⁺CD28null клетки при РА продуцируют IFN- γ и TNF- α , экспрессируют перфорины и гранзим В, а также маркер дегрануляции CD107a [Lindstrom T.M. et al., 2010; Matsuki F. et al., 2013; Matsuki F. et al., 2014; Dumitriu I.E. et al., 2015].

Установлено, что обнаруженный на CD4⁺CD28null лимфоцитах хемокиновый рецептор CX3CR1 (рецептор фракталкина) [Lindstrom T.M. et al., 2010; Pieper J. et al., 2014; Dumitriu I.E. et al., 2015] позволяет этим клеткам

взаимодействовать с синовиоцитами (экспрессируют фракталкин), способствуя *in vitro* их пролиферации, продукции IFN-у и высвобождению цитотоксических молекул из CD4⁺CD28null клеток [Dumitriu I.E. et al., 2015]. Кроме того, эксперименты *in vitro* показали, что CD4⁺CD28null Т-клетки, полученные у пациентов с РА, способствуют более интенсивной пролиферации синовиоцитов, чем CD4⁺CD28⁺ Т-лимфоциты [Pieper J. et al., 2014; Dumitriu I.E. et al., 2015]. Чрезмерная пролиферация синовиальных клеток вызывает хрящевую и костную деструкцию при РА, свидетельствуя об участии CD4⁺CD28null Т-клеток в этом процессе.

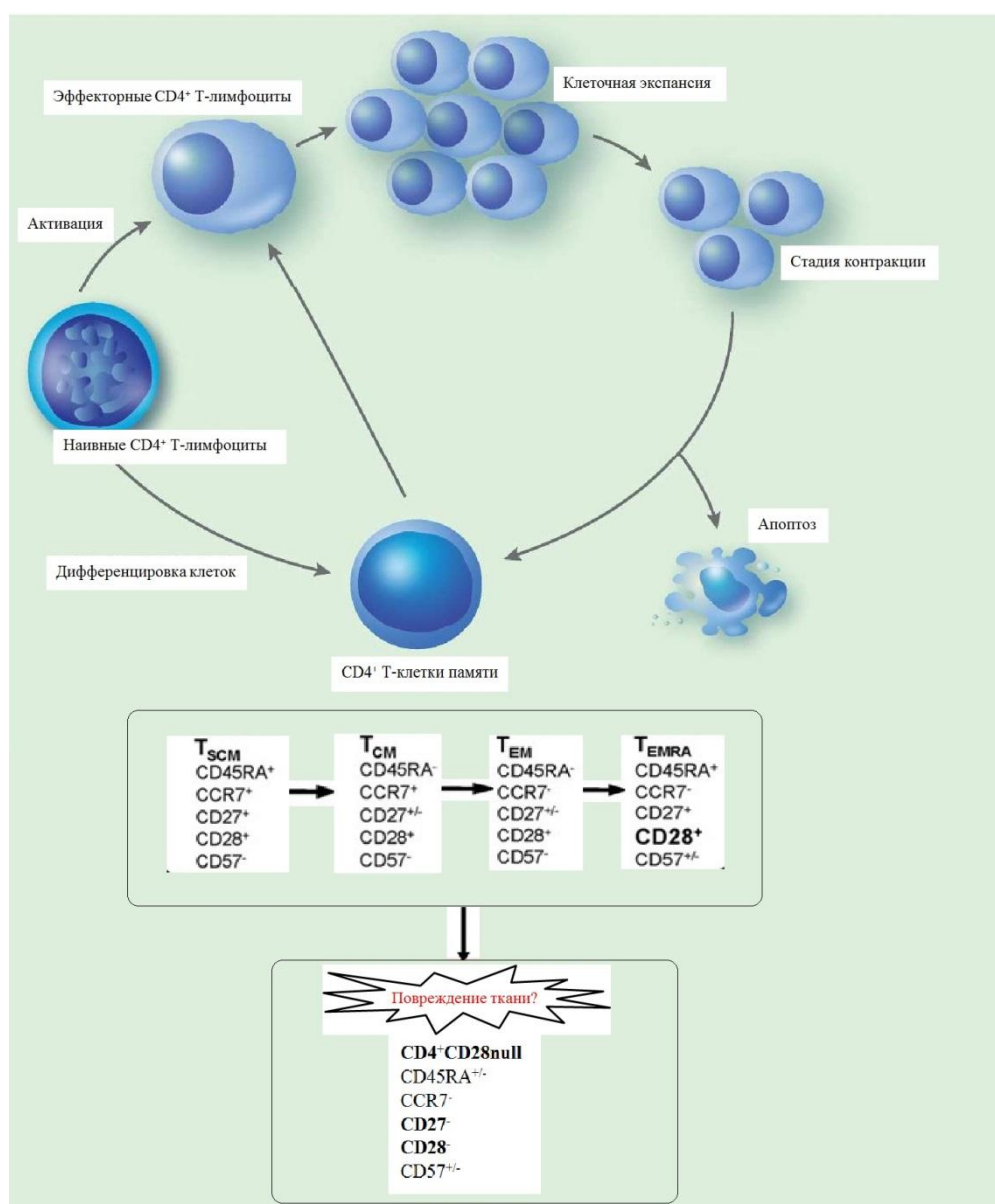


Рисунок 1. Формирование пула CD4⁺CD28⁻ Т-клеток памяти. Адаптировано из [Bhargava P. et al., 2015; Broadley I. et al., 2017].

Выявлено, что CD4⁺CD28null лимфоциты реагируют на общие ауто-антигены и участвуют в развитии системного заболевания, не влияя на первоначальное нарушение толерантности [Thewissen M. et al., 2007b; Weng N.P. et al., 2009; Lindstrom T.M. et al., 2010]. Согласно данным многих научных групп, пул CD4⁺CD28null клеток принадлежит к терминально-дифференцированным Т-клеткам памяти и подвергается клональной экспансии [Thewissen M. et al., 2007b; Pieper J. et al., 2014; Dumitriu I.E. et al., 2015]. Выявлено, что экспансия CD4⁺CD28null Т-клеток больных АИЗ напрямую связана с тяжестью заболевания и неблагоприятным прогнозом заболевания [Matsuki F. et al., 2013; Pieper J. et al., 2014; Matsuki F. et al., 2014; Dumitriu I.E. et al., 2015].

Кроме того доказано, что увеличение пула CD4⁺CD28null Т-клеток у пациентов с РА ассоциировано с повышением экспрессии антиапоптотической молекулы Bcl-2 [Dumitriu I.E. et al., 2015], тогда как уровни экспрессии Fas, Bcl-xL, Вах были сопоставимы с параметрами с CD4⁺CD28⁺ клеток. Некоторые исследования демонстрируют, что экспрессия хемокиновых рецепторов и молекул адгезии CD4⁺CD28null клетками обуславливают их способность проникать в ткани и вызывать местное воспаление и повреждение [Pawlik A. et al., 2003; Lindstrom T.M. et al., 2010; Dumitriu I.E. et al., 2015].

При АИЗ отмечается нарушение распределения CD45RA⁺/CD45RO⁺ Т-клеточных популяций [Bossowski A. et al., 2003; Earl L.A. et al., 2008]. Так, у больных РА регистрируются повышенные уровни CD45RO⁺ Т-лимфоцитов, что коррелирует с концентрацией IgM-РФ в сыворотке крови. Выявлено преобладание числа CD45RO⁺ клеток в периферической крови, достигающее максимальных значений в синовиальной жидкости у больных РА (по сравнению с пулом наивных Т-клеток) [Petersen L.E. et al., 2015]. Терминально дифференцированные Т-клетки (Тemra) при РА характеризуются нарушением механизмов реализации запрограммированной гибели, как упоминалось ранее, вследствие высокой экспрессии антиапоптотической молекулы Bcl-2 [Petersen L.E. et al., 2015; Dumitriu I.E. et al., 2015].

Резюмируя вышесказанное, следует отметить, что CD4⁺CD28null Т-клетки являются хронически активированными лимфоцитами эффекторной памяти с

неисчерпанным репликативным потенциалом (пролиферация, цитокиновая активность), утратившие свою классическую хелперную функцию и приобретшие новые модифицированные свойства (рецепторы), определяющие их аутореактивность и участие в патогенезе РА [Vallejo A.N. et al.,2000; Thewissen M. et al.,2007b; Matsuki F. et al., 2013; Pieper J. et al., 2014; Matsuki F. et al., 2014; Dumitriu I.E. et al., 2015].

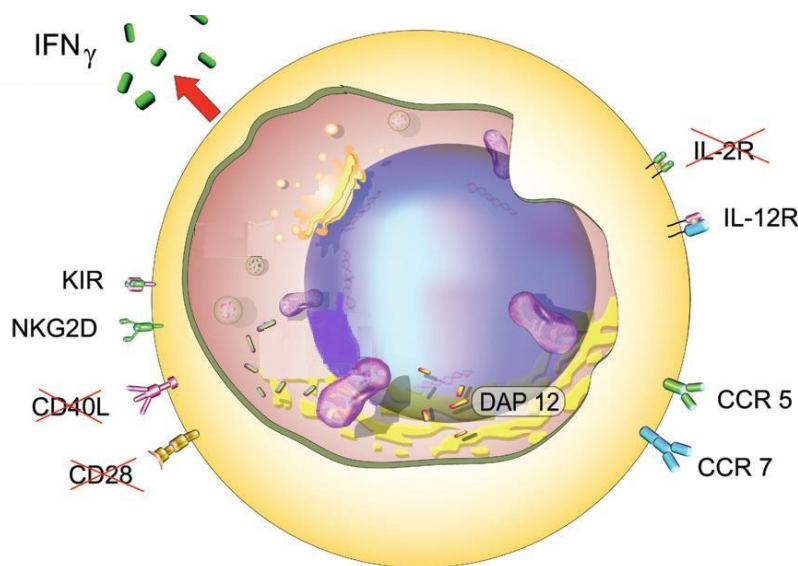


Рисунок 2. Функциональные и фенотипические изменения в стареющих Т-лимфоцитах. С накоплением репликативного стресса, сопровождающего клональную экспансию клеток во время иммунных реакций, а также усиленным делением оставшихся клеток при старении организма, $CD4^+$ Т-клетки памяти теряют экспрессию CD28 и CD40L молекул. $CD4^+CD28^-$ Т клетки являются активными эффекторными клетками. Они приобретают экспрессию различных регуляторных маркеров, свойственных для НК клеток (KIR, NKG2D, CX3CR1). Лиганды для этих рецепторов в избытке присутствуют в синовиальном микроокружении и запускают каскад Т-клеточных рецептор-опосредуемых сигналов. Адаптировано из [Goronzy J.J. et al., 2005].

Активированные $CD4^+CD28^{\text{null}}$ клетки, создавая провоспалительное микроокружение, способствуют неспецифической антигеннезависимой активации аутореактивных Т-лимфоцитов и их экспансии [Thewissen M. et al.,2007b; Matsuki F. et al., 2013; Pieper J. et al., 2014; Matsuki F. et al., 2014; Dumitriu I.E. et al., 2015]. Наконец, патогенные $CD4^+CD28^{\text{null}}$ Т-клетки заполняют иммунологическое пространство и резистентны к регуляторным механизмам [Thewissen M. et al.,2007b; Matsuki F. et al., 2013; Pieper J. et al., 2014; Matsuki F. et al., 2014; Dumitriu I.E. et al., 2015; Petersen L.E. et al., 2015].

1.2. Краткая характеристика глюкокортикостероидов

Глюкокортикостероиды объединяют стероидные гормоны (в том числе половые), минералокортикоиды и глюкокортикоиды (ГК), являющиеся производными холестерина [Ferreira J.F. et al., 2016]. ГК (кортизол) и минералокортикоиды (альдостерон) являются холестерин-производными гормонами, поддерживают гомеостаз глюкозы и секретируются в коре надпочечников [Wu D.Y. et al., 2014; Lin K.T. et al., 2016; Ferreira J.F. et al., 2016]. ГК обладают системной ролью в иммунных реакциях, обмене веществ, росте, развитии и пролиферации клеток [Wu D.Y. et al., 2014; Lin K.T. et al., 2016; Ferreira J.F. et al., 2016]. Известно, что циркулирующие ГК связываются с белками (кортикостероид-связывающим глобулином или транскортином; альбумином), однако только 5-10% от общего числа ГК находятся в свободном состоянии и обладают активностью [Ferreira J.F. et al., 2016].

Практически все эффекты ГК опосредованы через цитоплазматические/ядерные рецепторы (GR), относящиеся к суперсемейству ядерных лиганд-зависимых транскрипционных факторов, действующих как главный модулятор иммунной системы из-за их противовоспалительного и иммуносупрессивного действия [Baumann S. et al., 2005; Glass C.K. et al., 2010; Gao L. et al., 2011; Lin K.T. et al., 2016; Ferreira J.F. et al., 2016; Wendt E. et al., 2016] (рисунок 3). Две изоформы GR, α и β , генерируются путем альтернативного сплайсинга одного рецептора [Lin K.T. et al., 2016]. GR α экспрессируется практически во всех типах клеток и отвечает за индукцию большинства ГК-таргетных генов [Lin K.T. et al., 2016]. GR β не связывает свободные ГК, его функция до сих пор не выяснена.

1.2.1. Строение цитозольного рецептора к глюкокортикоидам (GR) и его транслокация в ядро

GR состоит из трех доменов: N-терминального домена (NTD), центрального ДНК-связывающего домена (DBD) и C-терминального лиганд-связывающего домена (LBD) [Lu N.Z. et al., 2004; Lu N.Z. et al., 2006; Lee S.R. et al., 2013; Banuelos J. et al., 2016; Lin K.T. et al., 2016].

GR экспрессируются практически во всех типах клеток [Lu N.Z. et al., 2006; Oakley R.H. et al., 2013; Lee S.R. et al., 2013; Banuelos J. et al., 2016]. В свободном состоянии GR образует гетерокомплекс с шаперонными белками, иммунофиллинами [Baumann S. et al., 2005; Lu N.Z. et al., 2006; Boldizar F. et al., 2013; Oakley R.H. et al., 2013; Banuelos J. et al., 2016; Gabryel M. et al., 2016] и другими протеинами. После связывания с ГК, GR подвергается конформационным изменениям [Yakimchuk K. et al., 2015], приводящим к освобождению участка ядерной последовательности на GR, инициируя транслокацию образованного комплекса (ГК -GR) в ядро [Biddie S.C. et al., 2010; Biddie S.C. et al., 2011; Vandevyver S. et al., 2012; Hartmann K. et al., 2016].

Внутри ядра лиганд-активированный GR должен идентифицировать таргетные последовательности ДНК, с которыми он способен вступить во взаимодействие. Возможность геномного связывания GR и последующая регуляция транскрипции генов определяется доступностью хроматина [Biddie S.C. et al., 2010; Butler J.S. et al., 2010; John S. et al., 2011; Hartmann K. et al., 2016]. Ремоделирование хроматина инициируют *пионерские транскрипционные факторы* [Altonsy M.O. et al., 2014; Tsompana M. et al., 2014; Vockley C.M. et al., 2016; Hartmann K. et al., 2016]. GR могут выполнять роль таких факторов: при взаимодействии GR с GR -связывающим сайтом на последовательности ДНК, увеличивается доступность хроматина, усиливая, привлечение дополнительных транскрипционных факторов (в том числе GR), к тем же сайтам [John S. et al., 2011; Grontved L. et al., 2013; Hartmann K. et al., 2016].

1.2.2. Процессы, происходящие с GR в ядре. Изменение экспрессии генов

В ядре гомодимеризованный GR действует как транскрипционный активатор [Lu N.Z. et al., 2006; Altonsy M.O. et al., 2014; Banuelos J. et al., 2016], связываясь с промоторами генов-мишеней (участками ДНК) отличающихся высоким сродством к GR - *глюкокортикоидными элементами ответа* (GRE) [Löwenberg M. et al., 2005; Shipp L.E. et al., 2010; Zha Q. et al., 2011; Ratman D. et al., 2013; Oakley R.H. et al., 2013; Savino W. et al., 2016]. Части консенсусной последовательности могут быть гибкими, что определяет исход транскрипционной

активности GR [Baumann S. et al., 2005; Meijnsing S.H. et al., 2009; Kadmiel M. et al., 2013; Hartmann K. et al., 2016] (рисунок 3).

После связывания GR с GRE, GR претерпевает дополнительные конформационные изменения, которые приводят к привлечению коактиваторных молекул, кофакторов [Lieberman A.C. et al., 2007; Aurora A.B. et al., 2010; Oakley R.H. et al., 2013; Dasgupta S. et al., 2014; Banuelos J. et al., 2016] и ремоделированию хроматинового комплекса, модулирующих скорость транскрипции генов, и влияющие на активность РНК-полимеразы II [Lieberman A.C. et al., 2007; Duma D. et al., 2010; Oakley R.H. et al., 2013; Ratman D. et al., 2013]. Также GR претерпевают различные модификационные перестройки, изменяющие равновесие между конденсированным и деконденсированным состоянием хроматина [Lieberman A.C. et al., 2007; Duma D. et al., 2010; Paakinaho V. et al., 2014; Dasgupta S. et al., 2014; Antunica-Noguerol M. et al., 2016; Princz A. et al., 2017].

Установлено, что концентрация ГК, при которой происходит связывание GR с элементами GRE, и которая регулирует экспрессию генов на протяжении генома, варьирует [Oakley R.H. et al., 2013]. Трансрессия генов, контролируемая GR, может быть двух видов: прямой и непрямой [Vockley C.M. et al., 2016].

Прямая трансрессия происходит посредством взаимодействия мономерной формы GR с отрицательными инвертируемыми повторами GRE (IR-nGRE) CTCC(n)₀₋₂GGAGA, присутствующими более, чем в 1000 генах [Baschant U. et al., 2010; Surjit M. et al., 2011; Hudson W.H. et al., 2013; Baschant U. et al., 2013; Ratman D. et al., 2013; Banuelos J. et al., 2016; Hua G. et al., 2016]. Однако лишь небольшая часть этих последовательностей имеет функциональное значение [Ratman D. et al., 2013; Hartmann K. et al., 2016].

Непрямая трансрессия происходит за счет прямых белок-белковых взаимодействий, при которых GR изолирует таргетный транскрипционный фактор от промотора гена-мишени на последовательности ДНК [Oakley R.H. et al., 2013; Vockley C.M. et al., 2016]. Белок-белковые взаимодействия происходят между мономерной формой GR и факторами, участвующими в воспалительных процессах [De Bosscher K. et al., 2010; Langlais D. et al., 2012; Oakley R.H. et al., 2013; Vockley C.M. et al., 2016; Hartmann K. et al., 2016]. Так как такие взаимодействия приводят к снижению регуляции генов, кодирующих цитокины и MMP, этот механизм

считается основным объяснением противовоспалительной активности ГК [De Bosscher K. et al., 2010; Schweingruber N. et al., 2014; Hartmann K. et al., 2016]. Однако, белок-белковые связи GR и провоспалительных транскрипционных факторов (NFκB, AP-1) происходят, если эти факторы непосредственно связаны с ДНК и расположены близко друг от друга [Uhlenhaut N.H. et al., 2013; Oakley R.H. et al., 2013; Hartmann K. et al., 2016].

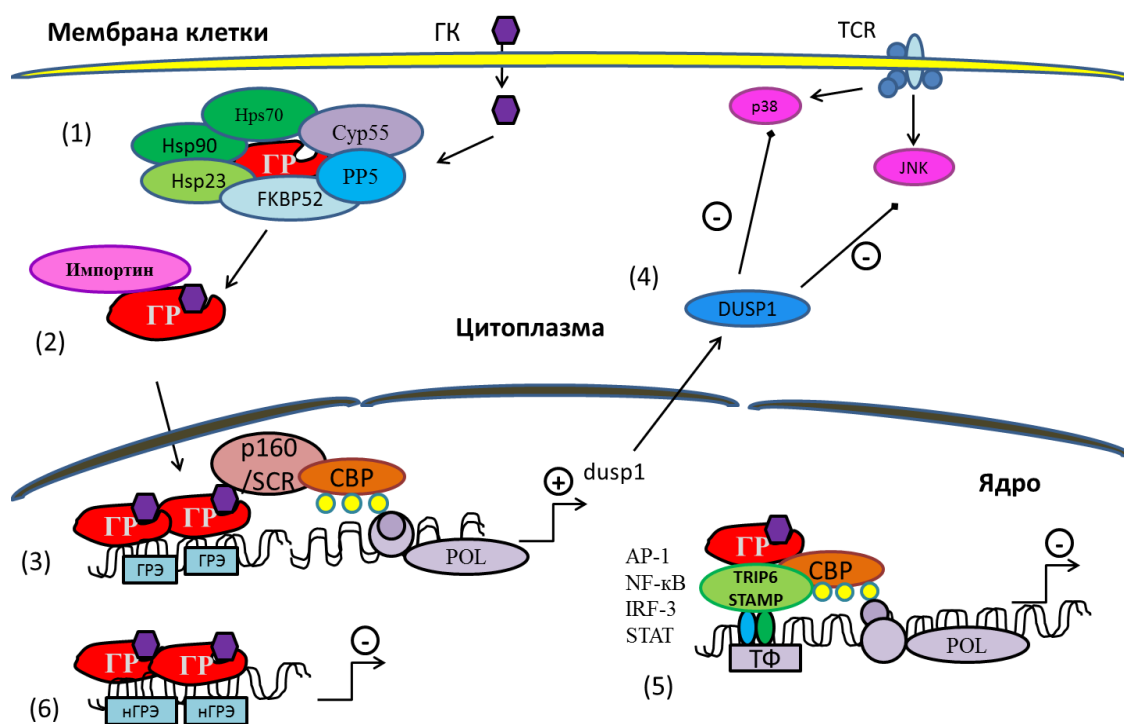


Рисунок 3. Геномный механизм действия ГК.

Примечание. Глюкокортикоиды (ГК) проникают через клеточную мембрану и связываются с цитоплазматическим глюкокортикоидным рецептором (ГР). Неактивированный ГР (1) связан с шаперонной конструкцией, включающей белки теплового шока: Hsp70, Hsp90, Hsp23; иммунофиллины: Cyp55, PP5, FKBP52. После связывания с лигандом, шаперонные молекулы подвергаются диссоциации из ГР. Затем комплекс ГР-ГК транслоцируется в ядро. Димерная форма ГР (3) связывается с последовательностью ГРЭ (глюкокортикоид-реагирующий элемент) и привлекает ко-активаторы, такие как p160/SRC и CBP, приводя к ремоделированию хроматина и облегчая транскрипцию генов. Некоторые генные продукты регулируются через влияние ГР на анти-воспалительную активность посредством фосфатазы DUSP-1. Усиление экспрессии DUSP-1 под влиянием ГК (4) приводит к ингибированию p38 MAPK и JNK. Мономерная форма ГК (5) также взаимодействует через непосредственный контакт с ко-интеграторами, такими как, TRIP6 и STAMP с провоспалительными сайтами на ДНК, связываясь с транскрипционными факторами (ТФ). Димерная форма ГР (6) взаимодействует с нГРЭ (отрицательными глюкокортикоид-реагирующими элементами) и супрессирует таким образом экспрессию некоторых генов. TCR – Т-клеточный рецептор, POL – полимеразы. Адаптировано из [Kim S.H. et al., 2009; Baschant U. et al., 2010].

Обширные геномные исследования выявили, что большинство GR-связывающих участков ДНК расположены за пределами промоторных регионов

GRE и *nGRE* в межгенных или внутригенных районах, расположенных далеко от сайта инициации транскрипции [Oakley R.H. et al., 2013]. Это позволило предположить наличие определенной связи между этими элементами и промоторными областями генов-мишеней, позволяя им регулировать транскрипцию генов [Oakley R.H. et al., 2013]. Таким образом, существует третий тип ГК-опосредованной регуляции генной транскрипции через связывание GR с транскрипционными факторами, представляющими собой **композиционные GRE** промоторных регионов, содержащие GRE последовательности, перекрывающиеся со связывающими областями последовательности ДНК для других транскрипционных факторов, по механизму *непрямой трансрепрессии* [Banuelos J. et al., 2016]. Данный супрессорный механизм ГК носит название *композиционной трансрепрессии* [Ratman D. et al., 2013; Vockley C.M. et al., 2016; Hartmann K. et al., 2016].

Помимо регуляции генной экспрессии на транскрипционном уровне, GR могут взаимодействовать с мРНК генов некоторых хемокинов и цитокинов, приводя к деградации их мРНК [Cho H. et al., 2015; Banuelos J. et al., 2016]. Также одним из механизмов, с помощью которых ГК ингибируют воспаление, является механизм индукции генов-антагонистов воспалительного ответа: ГК-индуцированной лейциновой молнии (GILZ) и фосфатазы-1 двойной специфичности (DUSP1, митоген-активируемой протеинкиназы фосфатазы-1, МКР-1) [Shipp L.E. et al., 2010].

Итак, противовоспалительные и иммуносупрессивные эффекты ГК являются результатом регуляции генной трансрепрессии GR через фиксацию к ДНК-связанным транскрипционным факторам или непосредственное взаимодействие с факторами транскрипции, препятствуя их связи с сайтами ДНК.

1.2.3. Применение глюкокортикоидов в лечении аутоиммунных заболеваний

В 1948 году Р.Ненч, получивший в 1950 году Нобелевскую премию, ввел в практику лечения РА ГК [García-Magallón B. et al., 2013; Black R.J. et al., 2015; Lin K.T. et al., 2016; Ferreira J.F. et al., 2016]. В 1960-х годах, в связи с выявленными разрушительными побочными эффектами долгосрочного использования высоких

доз ГК, их практически перестали применять в клинической практике [Zampeli E. et al., 2015]. В 1980-х годах ГК стали использовать в «низких дозах», однако целесообразность такой терапии остается под вопросом [García-Magallón B. et al., 2013; Zampeli E. et al., 2015].

ГК обладают быстродействием относительно снижения симптомов РА [Saleh K.J. et al., 2015; Saleh K.J. et al., 2016]. Применение ГК при РА уменьшает активацию, пролиферацию, дифференцировку и жизнеспособность воспалительных клеток [Ferreira J.F. et al., 2016; Beltrametti S.P. et al., 2016]. ГК ингибируют Th1-клеточное звено иммунного ответа, приводя к снижению уровней таких провоспалительных цитокинов, как IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-17 при РА [Ferreira J.F. et al., 2016]. Доказано, что чем выше доза препарата, тем сильнее его эффект при лечении РА [Ferreira J.F. et al., 2016]. Однако долговременное применение этих препаратов снижает функции иммунной системы, ухудшая качество костной ткани и препятствует заживлению ран [Black R.J. et al., 2015; Saleh K.J. et al., 2016]. В то же время, первоначальный отрицательный эффект ГК на ремоделирование кости компенсируется значительным снижением провоспалительного иммунного ответа [García-Magallón B. et al., 2013; Black R.J. et al., 2015; Saleh K.J. et al., 2016].

У пациентов, долгое время принимающих низкие дозы ГК, наблюдается подавление функций гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, проявляющееся в снижении продукции кортикотропин-релизинг-гормона и секреции стероидогенных ферментов надпочечниками [Saleh K.J. et al., 2016]. Это тормозит высвобождение кортизола и вызывает острую недостаточность надпочечников, что приводит к фатальному клиническому синдрому острой недостаточности кровообращения, характеризующейся неадекватной перфузией жизненно важных органов и нарушениями метаболизма [Saleh K.J. et al., 2016]. Использование низких доз ГК с постепенным их уменьшением позволяет предотвратить риск осложнений такой терапии [Saleh K.J. et al., 2016].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Группа аутоиммунных заболеваний (АИЗ) включает более 80 нозологических форм, частота которых в популяции составляет 5-8%. В основе данной группы заболеваний лежат реакции иммунитета, направленные против собственных тканей организма. Ревматоидный артрит (РА) является одним из наиболее распространенных среди этих заболеваний и встречается примерно у 1% населения во всем мире [Yang Y.H. et al., 2013]. Механизм развития аутоиммунных заболеваний очень сложен и на сегодняшний момент полностью не изучен. Однако известно, что в основе развития ряда АИЗ лежит формирование патологических иммунных реакций, основанных на генерации аутореактивных Т-клеток памяти. Многочисленными исследованиями в этой области показано, что в период обострения АИЗ количество этих клеток на периферии может возрастать в несколько раз, и есть все основания предполагать, что именно они являются локомотивами иммунопатологического процесса.

Таким образом, в идеале, лечение АИЗ должно строиться на специфическом блокировании начальных этапов аутоиммунного процесса, не затрагивая при этом общей иммунореактивности организма. К сожалению, до настоящего времени специфической патогенетической терапии АИЗ не разработано. Поэтому на сегодняшний день одним из наиболее действенных фармакотерапевтических вариантов лечения остаётся глюкокортикоидная (ГК) терапия, направленная на подавление чрезмерной воспалительной реакции [Bjelaković G. et al., 2010]. Несмотря на современное использование целевых анти-цитокиновых агентов и других биологических методов терапии, около 50% пациентов с РА остаются зависимыми от лечения ГК. Однако, убедительных доказательств того, что какой-либо из используемых сегодня ГК препаратов оказывает более специфическое действие на патологические процессы, развивающиеся при тех или иных АИЗ, в частности, на формирование аутореактивных Т-клеток иммунной памяти, не сформировано. Мощное противовоспалительное действие и иммунная модифицирующая активность ГК делают эти препараты терапевтически эффективными при воспалительных заболеваниях. Однако длительное использование ГК сопровождается, хорошо известными и значительными

дозозависимыми побочными эффектами (особенно метаболическими). В частности, долгосрочное использование ГК связано с увеличением веса, формированием остеопороза, сахарного диабета, гипертонии, хрупкости кожи и бактериальных инфекций [Yang Y.H. et al., 2013] Таким образом, современная глюкокортикоидная терапия направлена лишь на подавление воспалительной реакции, а не на устранение её причины.

Основные данные, полученные в ходе исследования действия ГК на организм, относятся к системной роли этих препаратов, и лишь некоторые публикации научной периодики скудно освещают молекулярно-клеточные реакции Т-лимфоцитов на действие ГК. Учитывая вышесказанное, наше исследование было направлено на выявление эффектов синтетических глюкокортикоидов на процессы созревания и функционального ответа Т-лимфоцитов иммунной памяти, играющих ключевую роль в патогенезе аутоиммунных расстройств.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект и материал исследования

В основу работы положены результаты комплексного исследования 50 больных ревматоидным артритом (38 женщин, средний возраст $35,2 \pm 7,4$ и 12 мужчин в средний возраст $37,4 \pm 8,1$) и 20 здоровых доноров (10 женщин, средний возраст $34,5 \pm 6,1$ и 10 мужчин, средний возраст $36,3 \pm 8,3$).

Критериями исключения из исследования являлись: возраст моложе 18 и старше 55 лет; период обострения других хронических воспалительных заболеваний; инфекционные, онкологические, наследственные, психические и иные аутоиммунные болезни; алкогольная и наркотическая зависимости.

Верификация диагноза и набор пациентов в группы исследования осуществлялся заведующей отделением ревматологии, Заслуженным врачом РФ, врачом высшей категории, главным внештатным ревматологом МЗ Калининградской области Малининой И.П. на базе областной клинической больницы г. Калининграда (главный врач - заслуженный врач РФ, Поляков К.И.). Постановка диагноза ревматоидного артрита была выполнена согласно приказу №21 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным ревматоидным артритом» от 13 января от 2006 г. Диагностические исследования включали опрос пациентов, рентгенографию, компьютерную и ЯМР-томографию суставов, выявление ревматоидного фактора и титра антител к циклическому цитрулин-содержащему пептиду, оценку скорости оседания эритроцитов и С-реактивного белка.

На основании оценки анамнеза болезни в исследование были включены пациенты, отвечающие следующим критериям:

- активность болезни – ремиссия (DAS28 (визуальный калькулятор оценки активности заболевания при ревматоидном артрите) < 2.6) (10 человек) или низкая (DAS28 – 2.6 – 3.2) (40 человек);
- ревматоидный фактор – серопозитивный;
- антитела к циклическому цитрулин-содержащему пептиду – серопозитивный;
- отсутствие терапии стероидными и цитостатическими препаратами с момента манифестации заболевания (не менее 6 месяцев);
- продолжительность заболевания – не более года с момента постановки диагноза.

Критерием исключения пациентов из исследования явилось получение медикаментозной терапии на момент взятия крови и наличие *внесуставных осложнений заболевания*. Со всеми обследованными лицами было подписано добровольное информационное согласие на исследование. Разрешение на проведение исследования получено в локальном этическом комитете (№2 от 11 ноября 2014 г.).

Материалом для исследования служила венозная кровь (30 мл), взятая из локтевой вены натошак с помощью стандартных вакуумных систем "BD VACUTAINER TM" («Greiner-bio-one», Австрия) с K_3 ЭДТА и гепарином (20 Ед/мл). Все экспериментальные исследования проводились на базе лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И.Канта (зав. лабораторией – д-р мед. наук, Л.С. Литвинова).

2.2. Методы исследования

В соответствии с поставленными целью и задачами исследования, нами был *разработан и оптимизирован* алгоритм экспериментального и аналитического блоков, позволяющий оценить реакции Т-клеток памяти, определяющие процессы их созревания и функциональную активность на синтетические глюкокортикоиды (дексаметазон, метилпреднизолон) в норме и при ревматоидном артрите, на фоне (TCR) CD2/CD3/CD28 – стимуляции, в эксперименте *in vitro*.

Для оценки эффектов синтетических глюкокортикоидов на процессы клеточного гомеостаза $CD3^+CD45RO^+$ Т-лимфоцитов, в своей работе мы использовали *активационную модель*, которая отражает процесс взаимодействия Т-лимфоцитов с антиген-презентирующими клетками (АПК) (активация Т-клеток через ***CD2, CD3 и CD28 рецепторы***). Разработанная нами экспериментальная модель позволяет в строго контролируемых условиях исследовать разные аспекты функциональной деятельности $CD3^+CD45RO^+$ Т-клеток. Дизайн исследования представлен на рисунке 4. Дозы ГК, используемые в эксперименте, были определены, исходя из математической фармакокинетической двухкамерной модели и составляли: $10^{-6}M$; $2 \times 10^{-6}M$; $4 \times 10^{-6}M$; $8 \times 10^{-6}M$ и $1.6 \times 10^{-5}M$ на 1 млн. культивируемых Т-клеток/мл, что соответствовало действию Dex 2.00; 8.00; 16.00; 32.00; 64.00 мг и МР в концентрациях 10.6; 21.3; 46.2; 85.3; 170.7 мг, распределённых, условно, в 5л крови.

ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ

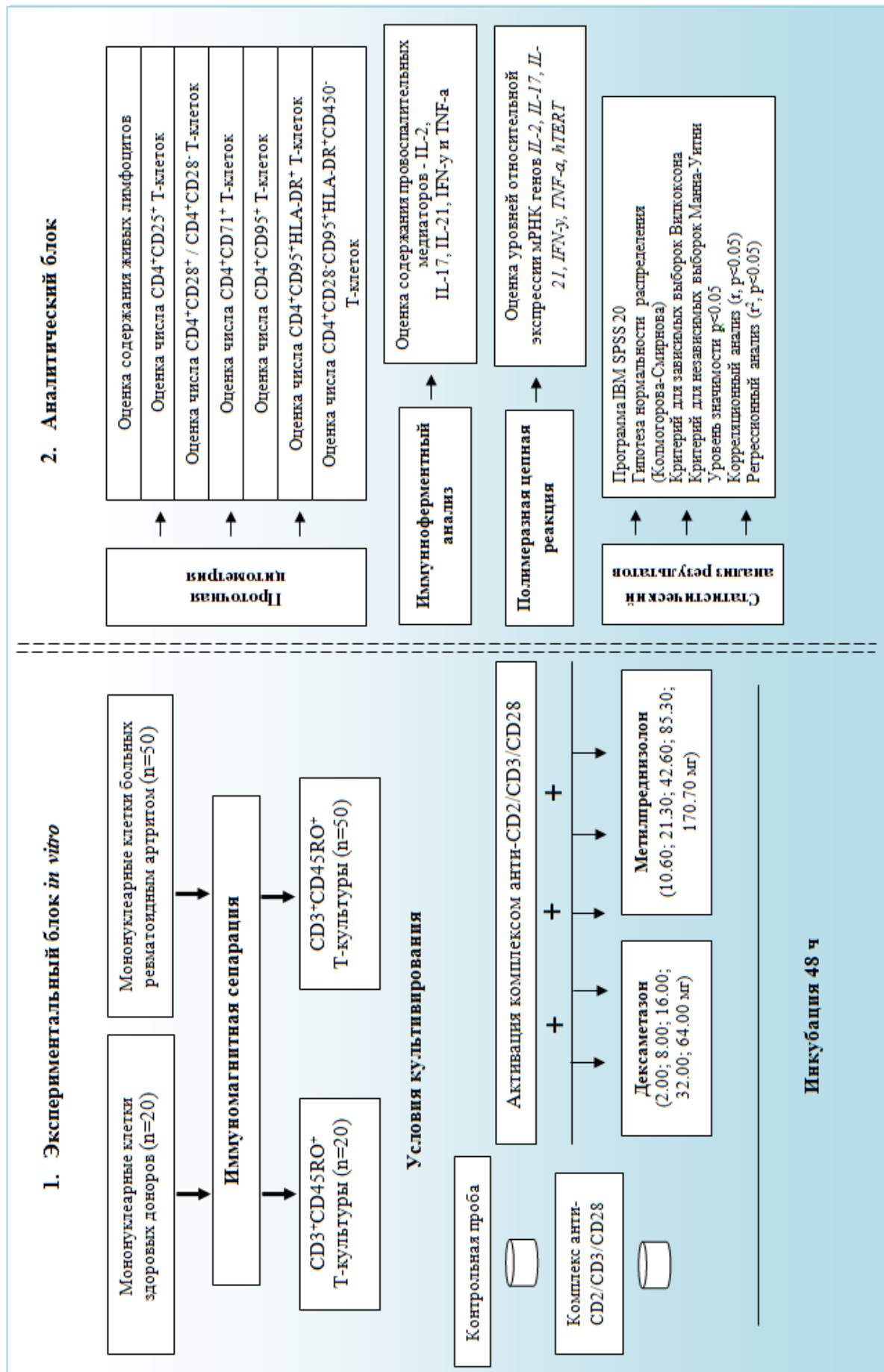


Рисунок 4. Схема дизайна исследования

2.2.1. Выделение мононуклеарных лейкоцитов из периферической крови

Выделение мононуклеарных лейкоцитов из периферической крови проводили стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографин («Pharmacia», Швеция) ($\rho=1.077$ г/см³). 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 ThermoJouan CR3i (ThermoFisherScientific, 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% бычьим сывороточным альбумином (БСА) «MiltenyiBiotec», Германия) до 1 мл и в дальнейшем использовали для выделения фракции CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов.

2.2.2. Выделение CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов из фракции мононуклеарных лейкоцитов методом иммуномагнитной сепарации

Принцип метода: Для получения культур CD3⁺CD45RO⁺ Т-клеток из МНК был применен метод иммуномагнитной селекции (ИМС), в основе которого лежит технология MACS® («MiltenyiBiotec» Германия) с использованием суперпарамагнитных частиц MACS MicroBeads, конъюгированных с высокоспецифичными моноклональными антителами (МАТ). MicroBeads, добавленные к взвеси клеток, связываются с их соответствующими рецепторными структурами на мембранах. Частицы имеют диаметр 50 нм, который значительно меньше порога разрешения светового микроскопа. Кроме того, частицы MicroBeads биodeградебельны и инертны. Колонки MACS с нетоксичным ферромагнитным матриксом, помещенные в сепаратор MACS способны

генерировать сильное магнитное поле для фиксации клеток, нагруженных частицами. Клетки, не связавшие MicroBeads, удаляются промыванием колонки буфером, представляя **негативную фракции (негативная селекция)**.

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 5).

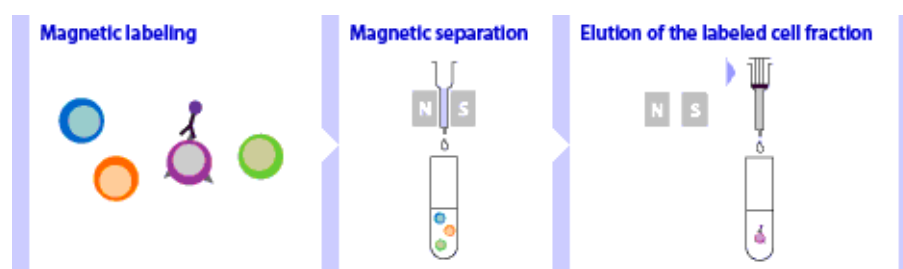


Рисунок 5. Позитивная иммуномагнитная селекция

Для очищения взвеси мононуклеаров от примесей CD14⁺-клеток применяли метод иммуномагнитной сепарации (позитивной) с использованием магнитного сепаратора (автоматического) AutoMACSProSeparatorInstrument («MiltenyiBiotec», Германия) и моноклональных антител (МАТ) к CD14⁺ с парамагнитными частицами (Micro Beads human, «MiltenyiBiotec», Германия) согласно протоколу фирмы-изготовителя. Так, согласно протоколу производителя, к полученной суспензии мононуклеаров (80 мкл взвеси содержала не менее 10⁷ кл), добавляли 20 мкл магнитных частиц к CD14⁺ (MicroBeads human, «Miltenyi Biotec», Германия) и инкубировали 15 мин в темноте при +4⁰С. Затем клетки отмывали в 2 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) (с 0.5% БСА, «Miltenyi Biotec», Германия) и центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин. После сливали надосадочную жидкость и добавляли 500 мкл буфера в клеточную суспензию, тщательно ресуспендируя. Далее переходили к автоматической иммуномагнитной сепарации, следуя протоколу производителя.

После проведенной селекции, для получения популяций CD45RO⁺ лимфоцитов, в дальнейшем, использовали негативную фракцию, которую центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин. Затем удаляли надосадочную

жидкость и добавляли в пробирку 80 мкл буфера и магнитные частицы к CD45RO⁺ (20 мкл) (MicroBeads human, «Miltenyi Biotec», Германия). Для позитивной селекции CD45RO⁺ Т-лимфоцитов повторяли процедуру, аналогичную для CD14⁺ клеток.

Полученные пробы с целевой фракцией CD3⁺CD45RO⁺ Т-клеток центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин, затем сливали надосадочную жидкость и доводили объем полученной пробы бессывороточной средой Искова до 1 мл. Подсчёт общего числа клеток в культурах проводили с использованием автоматического счётчика клеток (Countess™ Automated Cell Counter, «Invitrogen», США) с красителем Trypan blue 0.4% («Invitrogen», США). Число живых клеток было не менее 95-98% от общего числа лимфоцитов в пробе (рисунок 6).

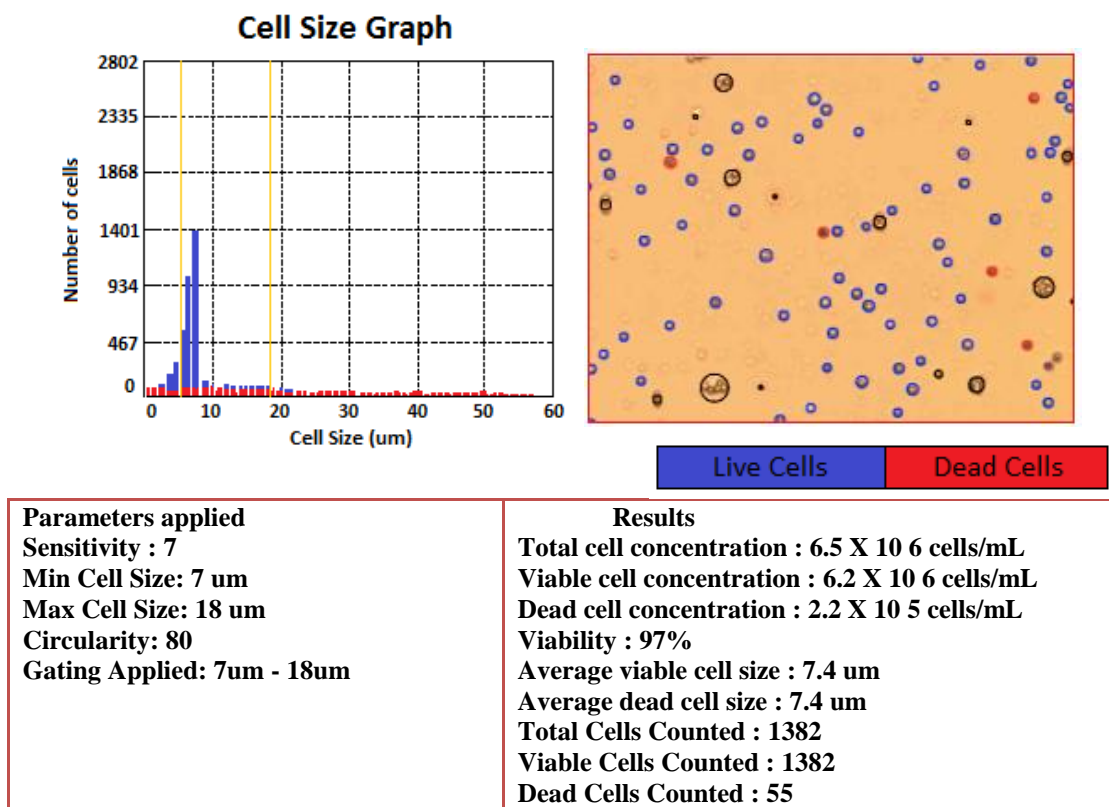


Рисунок 6. Количество живых и мёртвых клеток в культуре CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов

Отсутствие моноцитов (CD14⁺) и В-лимфоцитов (CD19⁺) в культурах 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 (“MiltenyiBiotec”, Германия), согласно протоколам производителей. Результаты цитометрического анализа были проанализированы с помощью программы «KALUZA Analysis Software» (Beckman Coulter, США) (рисунок 7). Использовали культуры, содержание в которых $CD3^+CD45RO^+CD14^-CD19^-$ Т-клеток, составляло, в среднем $97.5 \pm 2.12\%$.

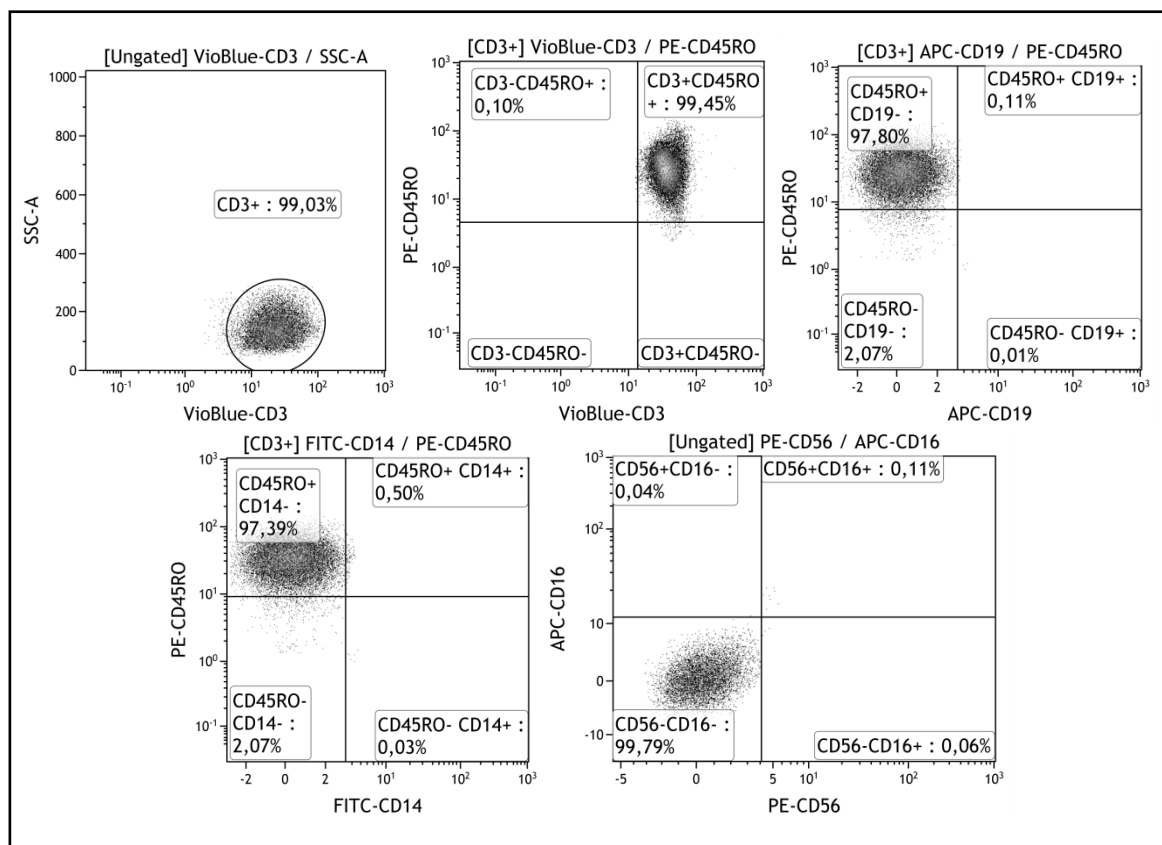


Рисунок 7. Анализ клеточного состава $CD3^+CD45RO^+$ культур, полученных методом иммуномагнитной позитивной селекции. Показано отсутствие $CD14$, $CD19$ и $CD16/56$ клеток.

2.2.3. Культивирование $CD3^+CD45RO^+$ Т-клеток

$CD3^+CD45RO^+$ -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 («AcrosOrganics», США) и 30 мкг/мл гентамицина в течение 48 ч при 37⁰С, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂.

В эксперименте были использованы разные концентрации синтетических глюкокортикоидов: дексаметазон («KRKA», Словения), и метилпреднизолон («Orion Pharma», Финляндия). В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали реагент T-CellActivation/ExpansionKithuman (Ac/Exp) («MiltenyiBiotec», Германия) - антибиотиновые частицы MACSiBead™ с биотинилированными антителами против CD2⁺, CD3⁺, CD28⁺ человека. Нагруженные антителами анти-биотиновые частицы MACSiBead™ используются в качестве имитации АПК и активации покоящихся Т-клеток. Реагент Ac/Exp добавляли в пробы в количестве 5 мкл, которые содержали – 0.5×10⁶ анти-биотиновых MACSiBead™ частиц. Соотношение клеток и активирующих частиц составляло 1:2. В настоящем исследовании были использованы следующие варианты культивирования

- 1) интактная проба;
- 2) проба с добавлением комплекса анти-CD2/CD3/CD28 (Ac/Exp) (рисунок 8);
- 3) пробы с добавлением Ac/Exp и дексаметазона (2.00 мг; 8.00 мг; 16.00 мг; 32.00 мг; 64.00 мг);
- 4) пробы с добавлением Ac/Exp и метилпреднизолона (10.60 мг; 21.30 мг; 42.60 мг; 85.30 мг; 170.70 мг).

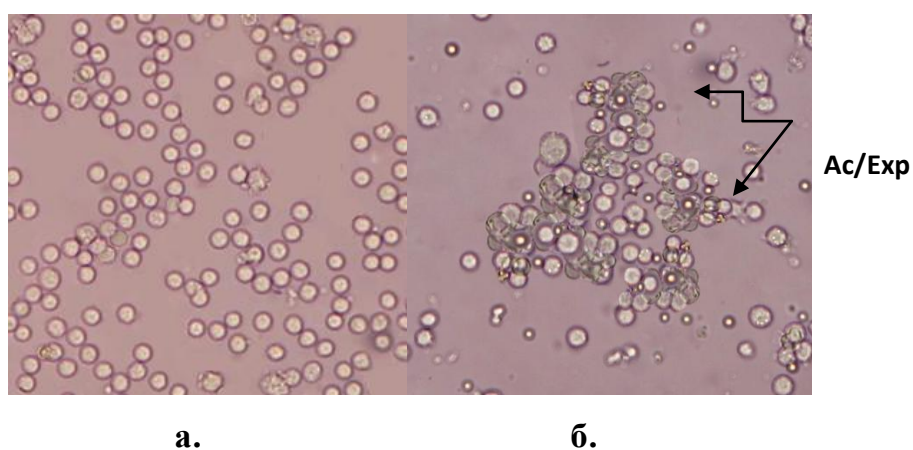


Рисунок 8. Культуры CD3⁺CD45RO⁺-лимфоцитов без (а) и с добавлением (б) Т-клеточного активатора (Ac/Exp).

2.2.4. Определение общего числа клеток (в мл) и количества живых лимфоцитов в культурах CD3⁺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, а также для определения числа живых клеток в культурах (%), после инкубации (48 ч) клеточные образцы тщательно ресуспендировали и отбирали 12.5 мкл, добавляли 125 мкл ViaCountReagent (Millipore, США) (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 «GuavaViaCount» (Millipore, США), методом проточной лазерной цитометрии на проточном цитометре «GuavaEasyCitePlus» (Millipore, США), согласно протоколу производителя (рисунок 9).

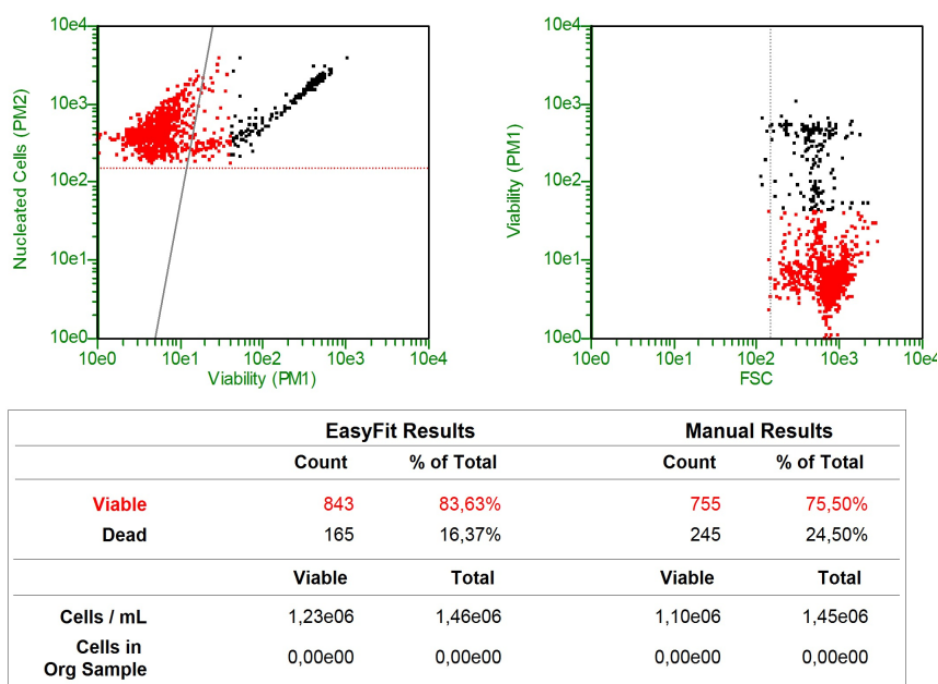


Рисунок 9. Стандартный протокол с использованием реагента и одноименной программы «GuavaViacount» (Millipore, USA).

2.2.5. Определение поверхностных маркеров CD25, CD28, CD71, CD45RA, CD95, HLA-DR на CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺T-клетках методом проточной цитометрии

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

После культивирования, образцы тщательно ресуспендировали. 50 мкл клеточной взвеси переносили в микроцентрифужные пробирки (типа эппендорф) и вносили 9 мкл коктейля моноклональных антител (pH=7.4). Инкубирование осуществляли в течение 30-45 мин в темноте при температуре 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).

Гейтинг исследуемой популяции клеток проводился в координатах FSC (ось абсцисс) и SSC (ось ординат). Затем данную популяцию клеток анализировали на наличие флуоресценции в различных координатах (флуоресценция по трем цветам на основе Dot Plot, либо по одному цвету на основе гистограммы). Использовалось автоматическое программное обеспечение и методы сбора и анализа данных с высоким разрешением (1024 канала). Сбор данных осуществляли до тех пор, пока не набиралось 10 000 событий (т.е. 10 000 клеток). Для получения корректных статистических данных, вводили необходимые логистические ограничения в гистограммы распределения клеток по SSC-A (боковое светорассеивание, характеризующее цитоплазматические и мембранные особенности клетки) и флуоресценции CD3 (*ViaBlue*). Затем гейтирование проводили в области [CD45RO] по SSC-A и интенсивности флуоресценции CD3-*Viablue* (рисунок 10). На основании созданного гейта [CD3⁺CD45RO⁺], используя интенсивность флуоресценции – CD4 (*PE*) / CD25 (*APC*) / CD71 (*APC*) / CD95 (*APC*) определяли относительное (%) число CD45RO⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺, CD45RO⁺CD3⁺CD4⁺CD71⁺ или CD45RO⁺CD3⁺CD4⁺CD95⁺

клеток (рисунок 10). Тактика «гейтирования» $CD45RO^+CD3^+CD4^+$ Т-клеток, экспрессирующих мембранные молекулы $CD25$, $CD71$ и $CD95$, представлены на рисунке 10. Результаты цитометрического анализа были проанализированы с помощью программы «KALUZA Analysis Software» (Beckman Coulter, США).

Имунофенотипирование клеток проводили с использованием коктейлей моноклональных антител («eBioscience», USA и («MiltenyiBiotec», Германия), приготовленных *ex temporo*:

- $CD3$ (ViaBlue) $CD45RO$ (FITC) $CD4$ (PE) и $CD25$ (APC)
- $CD3$ (ViaBlue) $CD45RO$ (FITC) $CD4$ (PE) и $CD71$ (APC)
- $CD3$ (ViaBlue) $CD45RO$ (FITC) $CD4$ (PE) и $CD95$ (APC)

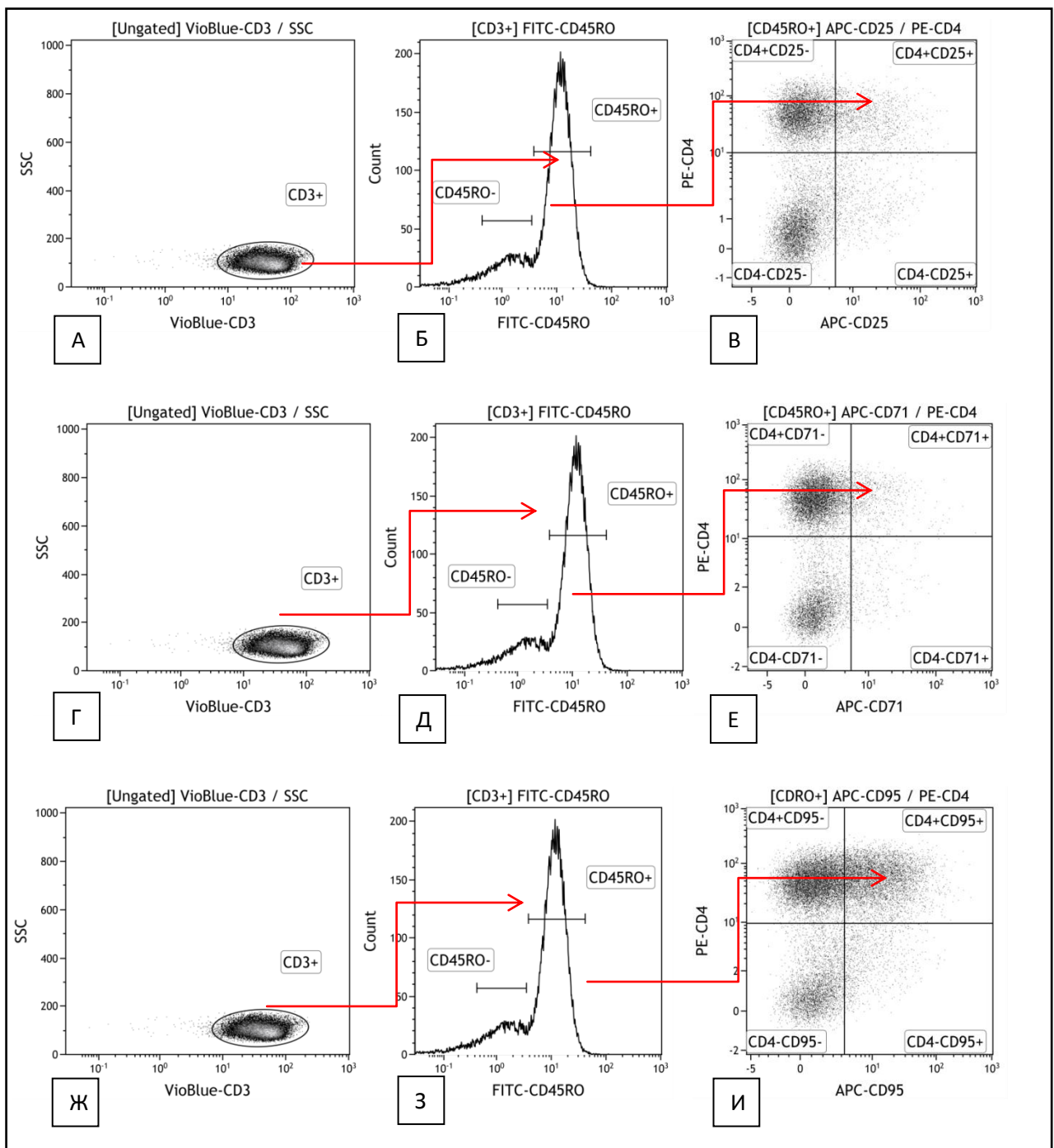


Рисунок 10. Тактика «гейтирования» $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ Т-клеток, экспрессирующих молекулы активации, пролиферации и апоптоза ($CD25$, $CD71$ и $CD95$).

Гистограммы распределения субпопуляций $CD4^+CD25/CD71$ Т-клеток в культурах $CD3^+CD45RO^+$ Т-лимфоцитов (проба с добавлением активатора), полученные в результате многоцветного анализа с использованием коктейлей моноклональных антител – $CD3$ (ViaBlue) $CD45RO$ (FITC) $CD4$ (PE) и $CD25$ (APC) / $CD71$ (APC) / $CD95$ (APC)

А, Г, Ж - анализ распределения клеток по боковому светорассеянию (SSC) и $CD3$. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции антител против $CD3$; по оси ординат – боковое светорассеяние, характеризующее структуру цитоплазмы клеток. **Б, Д, З** - однопараметрические гистограммы, гейтированные по $CD45RO$. По оси ординат – число клеток; по оси абсцисс – интенсивность флуоресценции антител против $CD45RO$. **В, Е, И** - анализ проведен с использованием гейта « $CD45RO^+$ ». По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции антител против $CD25/CD71/CD95$; по оси ординат – интенсивность флуоресценции антител против $CD4$.

Тактика «гейтирования» $CD3^+CD4^+CD45RO^+ / CD3^+CD4^+CD45RO^-$ Т-клеток, экспрессирующих мембранные молекулы ко-стимуляции ($CD28$) и поздней активации/апоптоза ($CD95$ и $HLA-DR$), представлены на рисунке 11 и 12.

- $CD3$ (ViaBlue) $CD45RO$ (FITC) $CD4$ (PE) $CD28$ (APC) $CD95$ (PE-Cy7) и $HLA-DR$ (PE-Cy5)

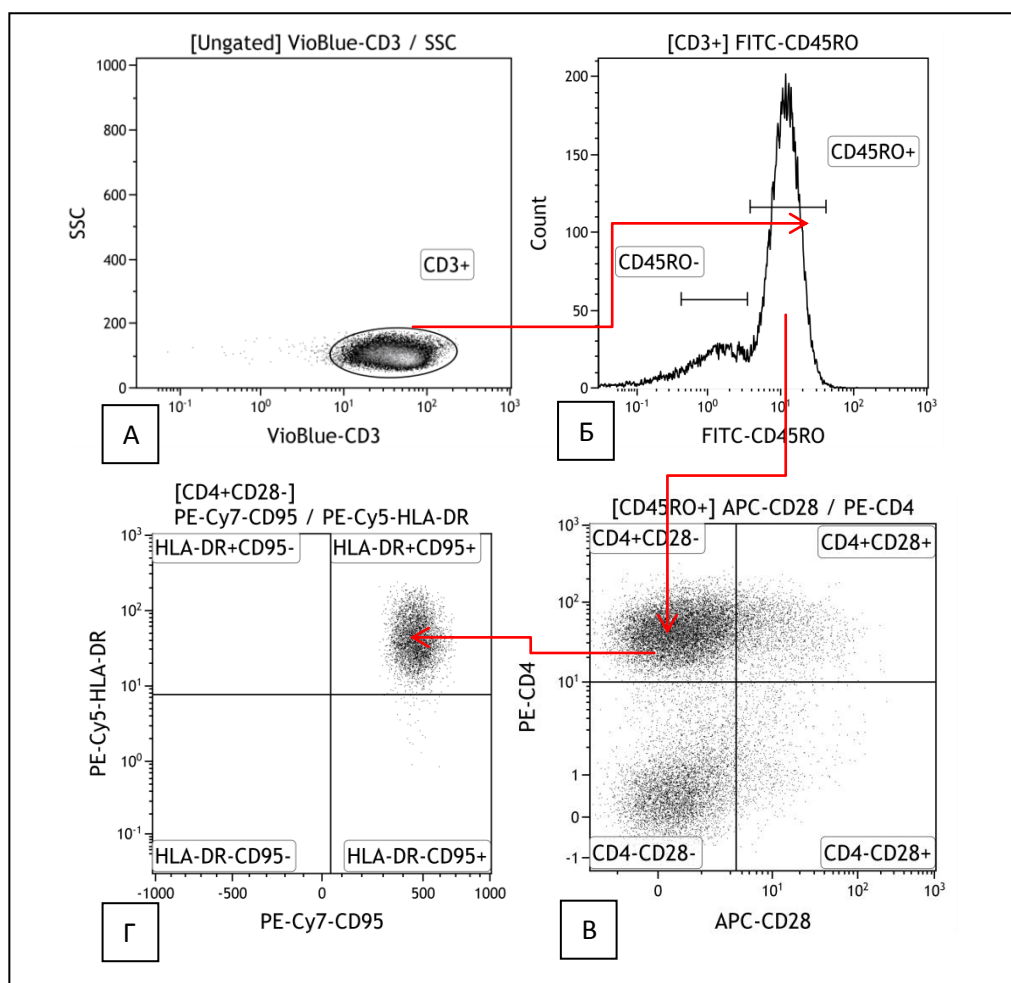


Рисунок 11. Тактика «гейтирования» $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ Т-клеток, экспрессирующих молекулы ко-стимуляции ($CD28$) и поздней активации/апоптоза ($CD95$ и $HLA-DR$).

Гистограммы распределения субпопуляций $CD4^+CD28^+/CD28^-$ и $CD4^+CD28^-CD95^+HLA-DR^+$ Т-клеток в $CD3^+CD45RO^+$ культурах (проба с добавлением активатора), полученные в результате многоцветного анализа с использованием коктейлей моноклональных антител – *CD3 (ViaBlue) CD45RO (FITC) CD4 (PE) CD28 (APC) CD95 (PE-Cy7) и HLA-DR (PE-Cy5)*

А - анализ распределения клеток по боковому светорассеянию (SSC) и CD3. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции антител против CD3; по оси ординат – боковое светорассеяние, характеризующее структуру цитоплазмы клеток. **Б** – однопараметрическая гистограмма, гейтированная по CD45RO. По оси ординат – число клеток; по оси абсцисс – интенсивность флуоресценции антител против CD45RO. **В** - анализ проведен с использованием гейта $CD45RO^+$. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции антител против CD28; по оси ординат – интенсивность флуоресценции антител против CD4. **Г** - анализ проведен с использованием гейта $CD4^+CD28^-$. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции антител против CD95; по оси ординат – интенсивность флуоресценции антител против HLA-DR.

- *CD3 (ViaBlue) CD45RO (FITC) CD4 (PE) CD28 (APC) CD95 (PE-Cy7) и HLA-DR (PE-Cy5)*

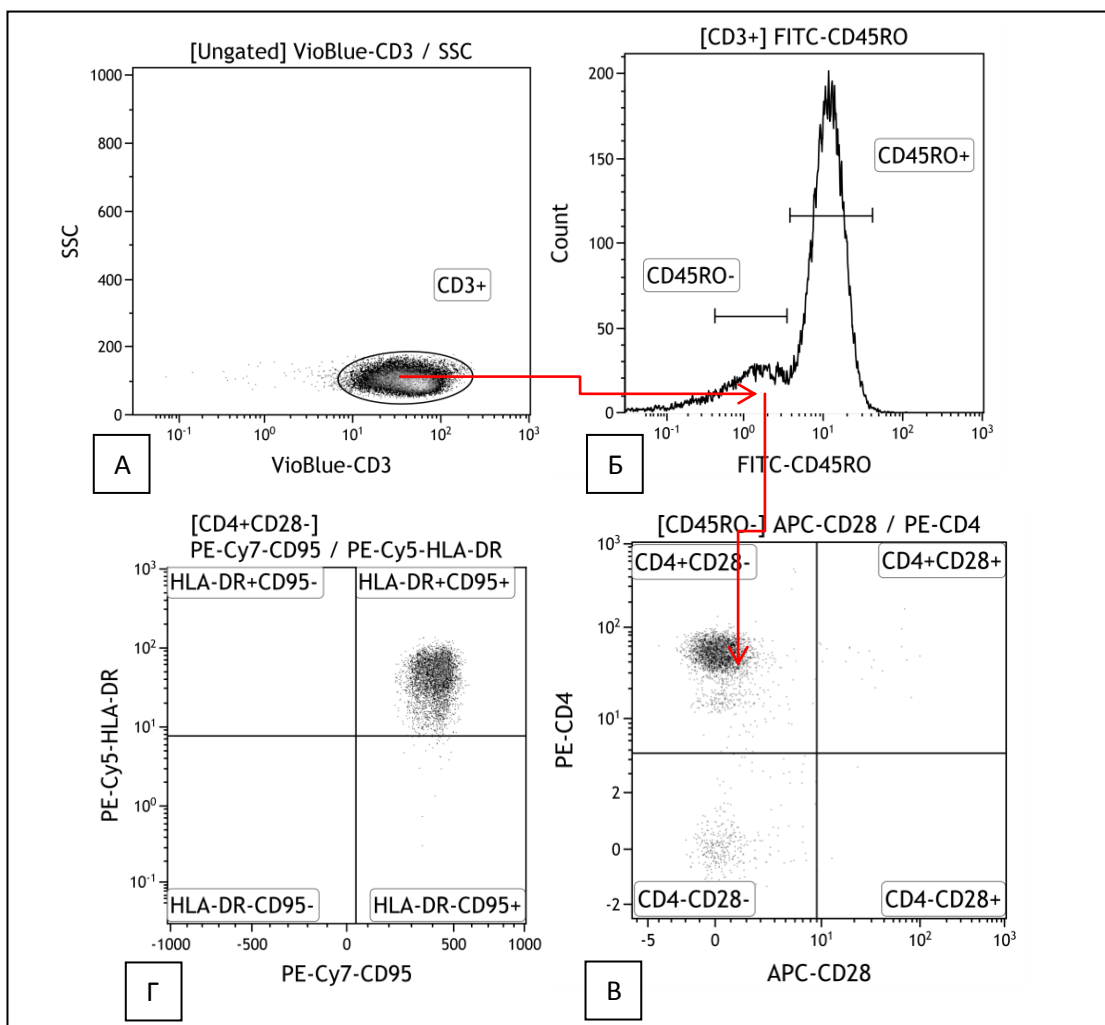


Рисунок 12. Тактика «гейтирования» $CD3^+CD4^+CD45RO^-$ Т-клеток, экспрессирующих молекулы ко-стимуляции (CD28) и поздней активации/апоптоза (CD95 и HLA-DR).

Гистограммы распределения субпопуляций CD4⁺CD28⁻ и CD4⁺CD28⁻CD95⁺HLA-DR⁺ Т-клеток в CD3⁺CD45RO⁻ культурах (проба с добавлением активатора), полученные в результате многоцветного анализа с использованием коктейлей моноклональных антител – CD3 (ViaBlue) CD45RO (FITC) CD4 (PE) CD28 (APC) CD95 (PE-Cy7) и HLA-DR (PE-Cy5). **А** - анализ распределения клеток по боковому светорассеянию (SSC) и CD3. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции антител против CD3; по оси ординат – боковое светорассеяние, характеризующее структуру цитоплазмы клеток. **Б** – однопараметрическая гистограмма, гейтированная по CD45RO. По оси ординат – число клеток; по оси абсцисс – интенсивность флуоресценции антител против CD45RO. **В** - анализ проведен с использованием гейта CD45RO⁻. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции антител против CD28; по оси ординат – интенсивность флуоресценции антител против CD4. **Г** - анализ проведен с использованием гейта CD4⁺CD28⁻. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции антител против CD95; по оси ординат – интенсивность флуоресценции антител против HLA-DR.

2.2.6. Определение содержания концентрации провоспалительных молекул (IL-2, IL-17, IL-21, IFN- γ и TNF- α) в супернатантах культур CD3⁺CD45RO⁺ Т-клеток

Содержание провоспалительных молекул (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-17 и IL-21) в супернатантах CD3⁺CD45RO⁺ культур оценивали методом иммуноферментного анализа (твердофазный иммуноферментный «сэндвичевый» метод, ELISA) с использованием наборов реактивов, согласно протоколам фирм-производителей (IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-17 «Вектор-Бест», Россия и IL-21 «CusabioBiotech», США). Для наборов IL-2, TNF- α и IL-17 диапазон измеряемых концентраций составлял 0.00-500.00 пг/мл, чувствительность – 2.00 пг/мл; для IFN- γ диапазон измеряемых концентраций был равным 0.00-1000.00 пг/мл, чувствительность – 5.00 пг/мл; IL-21 диапазон измеряемых концентраций составлял 0.00-200.00 пг/мл, чувствительность – 0.78 пг/мл.

Принцип метода. Суть метода заключается в связывании таргентных молекул с антителами, адсорбированными в ячейках планшета. Образованный комплекс взаимодействует с конъюгатом, связанным с биотином, избыток последнего удаляется после инкубации при промывке. К комплексу «цитокин-антитело», сорбированном на твердой фазе, добавляют субстратный раствор, образующий 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 супернатанта. 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 конъюгата №1 (антитела к IFN-у, TNF-а, IL-2, IL-17 и IL-21 человека с биотином) во все лунки и инкубировали в течение 1 часа при тех же условиях. Не связавшийся 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 протоколам, предлагаемым производителями тест-систем («Вектор Бест» Россия; «CusabioBiotech», США) на автоматическом иммуноферментном анализаторе Lasurit (DyplexTechnologies, США). Результаты выражали в пг/мл.

2.2.7. Выделение тотальной РНК

Для выделения тотальной РНК использовали образцы клеточных культур. После инкубации образцы центрифугировали 5 мин при 2000 об/мин, убирали надосадочную жидкость, оставив 100 мкл клеточного осадка и тщательно ресуспендировали образец. Выделение тотальной РНК осуществлялось с использованием реагента ExtractRNA (водный раствор фенола и гуанидин-изотиоцианата) (ExtractRNAkit «Евроген», Россия). В пробирку к 100 мкл образца добавляли по 1 мл ExtractRNA, смесь инкубировали 15 мин при комнатной температуре, далее центрифугировали 10 минут при 12000g («Eppendorf», Centrifuge 5804R, Германия).

В новый эппендорф переносили лизат и добавляли 0.2 мл хлороформа («Вектон», Россия), содержимое перемешивали вручную (15 секунд) и

инкубировали смесь в течение 5 минут при комнатной температуре, периодически перемешивая содержимое пробирки. Смесь центрифугировали 15 минут при 12000g при 4°C.

В ходе центрифугирования смесь разделялась на три фазы: органическую фенол-хлороформную фазу желтого цвета, интерфазу белого цвета и бесцветную водную фазу. Держа пробирку наклонно (под углом 45°), аккуратно отбирали водную фазу в новую пробирку, избегая касания интерфазы. К отобранной водной фазе добавляли 0.5 мл 100% изопропанола. Смесь инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре и центрифугировали 10 мин со скоростью 12000g при комнатной температуре. Супернатант тщательно отбирали, не касаясь осадка РНК на дне пробирки.

Аккуратно, по стенке пробирки добавляли 1 мл 75% этанола, после чего образец центрифугировали 5 мин при 15000g при комнатной температуре, после чего отбирали супернатант и высушивали осадок в пробирке с открытой крышкой около 7 мин. Выделенную РНК растворяли в 100 мкл воды, свободной от РНКаз и ДНКаз.

На спектрофотометре NanovuePlus («GE HealthcareBio-Sciences», Швеция) определяли чистоту выделенной РНК, анализируя отношения значений поглощения при длинах волн 260 нм и поглощение при 280 нм (A_{260}/A_{280}). Для проведения следующего этапа были использованы образцы, значение A_{260} / A_{280} которых находилось в диапазоне 2.7-2.9 усл.ед.

Целостность образцов выделенной РНК анализировали при помощи метода электрофоретического разделения в 1.5% агарозном геле и трис-ацетатном буфере (ТАЕ) по соотношению плотности бэндов, соответствующих большой (28S) и малой (18S) рибосомным субъединицам рРНК.

Для проведения следующего этапа эксперимента использовали образцы, у которых плотность бэнда, соответствующего малой субъединице не превышала плотность бэнда, соответствующего большой субъединице (индекс RIN (RNA IntegrityNumber) был равным 1:2) (рисунок 13).

Для получения 1.5 %-ого агарозного геля к 150 мг сухой агарозы добавляли 100 мл буфера ТАЕ (x1) и прогревали до полного растворения. Полученную смесь остужали до 50-60 °С добавляли 2 мкл бромистого этидия (10%) и заливали форму

с гребенкой. После застывания в карманы геля вносили раствор анализируемой РНК с буфером для нанесения образцов. Электрофоретическое разделение проводили в TAE (x1) буфере при напряженности поля 60В/см. Результаты фиксировали при помощи CCD камеры GelDoc XR («Bio-Rad», США) в УФ-свете.

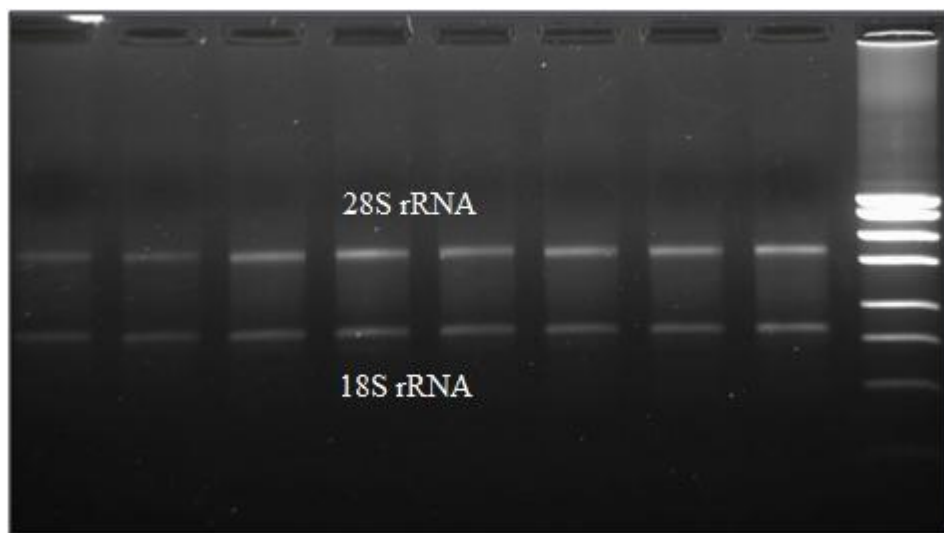


Рисунок 13. Определение качества клеточной РНК по соотношению плотности бэндов, соответствующих большой (28S) и малой (18S) рибосомным субъединицам.

Концентрацию полученной РНК измеряли с помощью спектрофотометра (NanoVuePlus «GE Healthcare», США). Полученные образцы были заморожены при -80°C до дальнейшего использования.

2.2.8. Обратная транскрипция образцов тотальной РНК

Для получения одинакового количества кДНК концентрации полученных образцов РНК приводили к одному значению (10 мкг/мл) посредством добавления очищенной воды, свободной от ДНКаз и РНКаз.

На первом этапе реакции обратной транскрипции 9 мкл РНК матрицы (10 мкг) смешивали с 4,5 мкл праймераoligo (dT) (20 мкМ) («Beagle», Россия), смесьвортексировали, сбрасывая капли со стенок пробирки на микроцентрифуге («ELMI SkyLine», Латвия), и инкубировали в амплификаторе T100 ThermalCycler (Bio-Rad, США) в течение 3 мин при температуре 70°C. По окончании реакции образцы переносили на лед.

На втором этапе в каждую пробирку добавляли по 16.5 мкл предварительно подготовленной смеси: 6 мкл пятикратного буфера для синтеза первой цепи (MMLV RT kit «Евроген», Россия), 3 мкл смеси dNTP (20 мМ) («Beagle», Россия), 3 мкл DTT (20 мМ) (MMLV RT kit «Евроген», Россия) и 4.5 мкл MMLV ревертазы (MMLV RT kit «Евроген», Россия). Смесь вортиксировали, сбрасывали капли со стенок пробирки на микроцентрифуге («ELMI SkyLine», Латвия) и инкубировали в ДНК-амплификаторе T100 ThermalCycler («Bio-Rad», США) в течение 60 минут при температуре 42°C, и 10 мин при температуре 70°C. По окончании реакции пробирки с образцами замораживали при -80 °С до дальнейшего использования.

2.2.9. Определение уровня относительной экспрессии генов методом количественной ПЦР в режиме реального времени

2.2.9.1. Количественная ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя

Для детекции уровня относительной экспрессии генов IL-2, IL-17, IL-21, TNF- α и IFN- γ проводили количественную ПЦР в режиме реального времени (quantitative PCR) с использованием реагентов qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия), в состав которых входят все необходимые компоненты для ПЦР: высокопроцессивная Taq-полимераза, блокированная моноклональными антителами, краситель SYBR Green I, смесь нуклеотидтрифосфатов, Mg²⁺, ПЦР-буфер. ПЦР проводилась в объеме 25 мкл, реакционная смесь содержала 4 мкл кДНК, 2 мкл Pr(F+R) 10 pM, 5 мкл реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия), 14 мкл деионизованной дистиллированной воды, свободной от РНКаз. ПЦР-реакцию ставили в трех повторах. Для проведения ПЦР в режиме реального времени использовали термоциклер LightCycler 480 Real-Time PCR («Roche», Швейцария).

Принцип метода. SYBR Green I – ассиметричный цианиновый краситель, который способен специфически интеркалировать с двуцепочечной ДНК (рисунок 14). Образующийся комплекс ДНК-краситель поглощает свет в синей части спектра ($\lambda_{\text{max}} = 488 \text{ нм}$) и излучает свет в зеленой части спектра ($\lambda_{\text{max}} = 522 \text{ нм}$). В качестве нормировочного гена использовали GAPDH.

Нуклеотидные последовательности, соответствующие генам *IL-2*, *IL-17*, *IL-21*, *TNF- α* , *IFN- γ* и *GAPDH* и их первичным транскриптам, извлекали из баз данных NCBI (National Center for Biotechnological Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Олигонуклеотидные праймеры для амплификации кДНК указанных генов конструировали с помощью программ «Primer.3», «OligoAnalyzer», «Primer-BLAST». Используемые олигонуклеотидные праймеры для определения уровня относительной экспрессии генов *IL-2*, *IL-17*, *IL-21*, *TNF- α* , *IFN- γ* и *GAPDH* («Beagle», Россия) представлены в таблице 1.

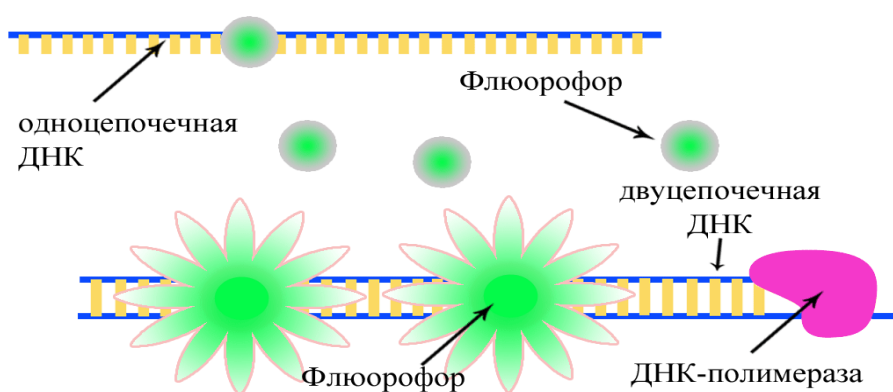


Рисунок 14. Схема, иллюстрирующая интеркаляцию SYBR Green I с двуцепочечной ДНК.

При проектировании структуры праймеров соблюдали следующие правила: расположение праймеров в различных экзонах или на их границе; температура отжига праймеров $T_m = 60-65^{\circ}\text{C}$; длина праймера = 20-24 нуклеотида; длина продукта ПЦР = 70-200 п.н.; отсутствие, стабильных вторичных структур, минимум G/C на 3' конце праймеров (не более трех из пяти последних нуклеотидов), GC состав: ~40-60%.

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры для определения уровня относительной экспрессии мРНК генов *IL-2*, *IL-17*, *IL-21*, *TNF- α* , *IFN- γ* и *GAPDH*.

<i>IFN-γ_for</i> : 5'-CCTGCAATCTGAGCCAGTGC-3'
<i>IFN-γ_rev</i> : 5'-TGGAAGCACCAGGCATGAAA-3'

<i>IL-21_for</i> : 5'-GGTCAAGATCGCCACATGATTA-3'
<i>IL-21_rev</i> :5'-GCATTTGTGGAAGGTGGTTTC-3'
<i>IL-2_for</i> : 5'-AGACCCAGGGACTTAATCAGCAA-3'
<i>IL-2_rev</i> :5'-ACAATGGTTGCTGTCTCATCAGC-3'
<i>TNF-a_for</i> : 5'-AGAGGGAGAGAAGCAACTACAG-3'
<i>TNF-a_rev</i> : 5'-TGGGTCAGTATGTGAGAGGAAG-3'
<i>IL-17_for</i> : 5'-TCAACGCTGATGGGAACGTG-3'
<i>IL-17_rev</i> :5'-TCTCCAGCCGGAAGGAGTTG-3'
<i>GAPDH_for</i> 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'
<i>GAPDH_rev</i> 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'

В отдельных случаях в реакционной смеси помимо специфического продукта ПЦР могут присутствовать короткие и длинные продукты неспецифической амплификации. Их появление обусловлено неспецифической гибридизацией праймеров друг с другом или с матрицей ДНК. В этом случае увеличение интенсивности репортерной флуоресценции будет отражать как накопление специфических, так и неспецифических продуктов амплификации. Чтобы уменьшить вклад неспецифической доли флуоресценции, детекция флуоресценции осуществляется при достаточно высокой температуре. При этом температура выбирается таким образом, чтобы специфический продукт амплификации оставался в двуцепочечной форме, в то время как более короткие неспецифические продукты уже денатурировали с образованием одноцепочечных фрагментов.

Температура для детекции флуоресценции определяется эмпирически, при анализе «кривой плавления» – графика изменения интенсивности флуоресценции амплификационной смеси при увеличении температуры. Наличие дополнительных пиков на кривой плавления говорит о наличии неспецифических продуктов реакции.

Был подобран наиболее оптимальный режим амплификации для каждой пары, используемых в количественной ПЦР на SYBR Green I с использованием градиентной ПЦР (LightCycler 480 Real-Time PCR «Roche», Швейцария). Условия проведения ПЦР были оптимизированы путем последовательных двукратных разведений матрицы (рисунки 15-19).

Протокол амплификации:

- первичная денатурация – 3 минуты при 95°C;
- амплификационный цикл (x 39):
- денатурация – 10 секунд при 95°C,
- отжиг праймеров – 30 секунд при 60-62°C,
- элонгация – 20 секунд при 72°C,
- постинкубация – 5 минут 72°C,
- построение кривой плавления – нагревание амплификационной смеси с 60°C до 95°C, с шагом 5°C.

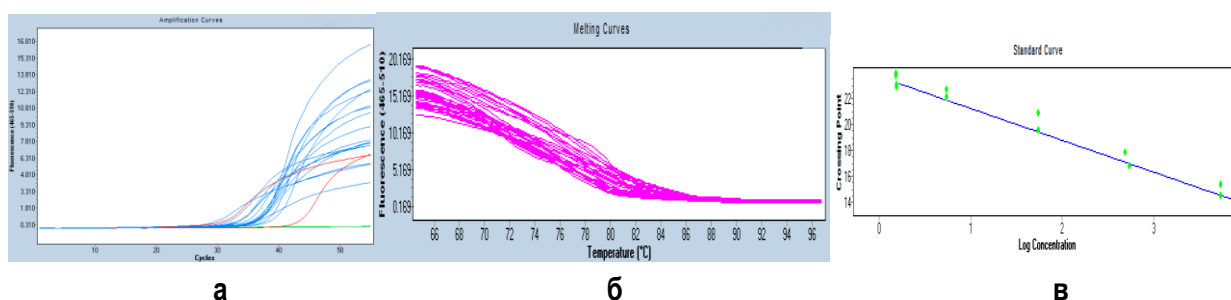


Рисунок 15. Параметры реакции амплификации фрагмента кДНК гена *IL-21*. Обозначения здесь и в след. рисунках.

- а) Графическое представление кинетики накопления продукта ПЦР при амплификации экспериментальных образцов (красный - контроль, зеленый – отрицательный контроль, синий – экспериментальные образцы)
- б) Графическое представление кривой плавления продукта ПЦР при амплификации экспериментальных образцов.
- в) Проекция значений C_t серии двукратных разведений для построения калибровочной кривой

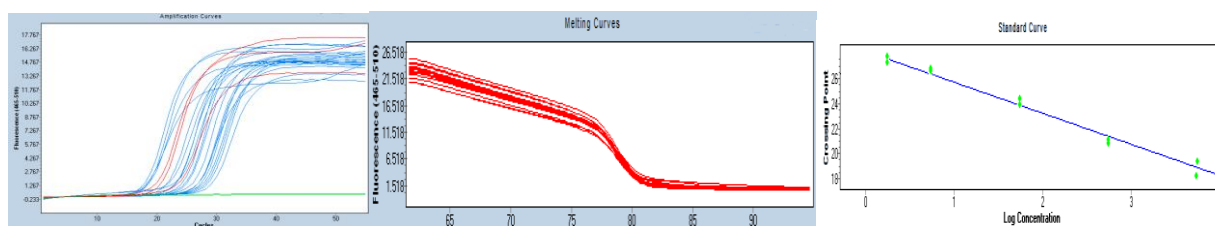


Рисунок 16. Параметры реакции амплификации фрагмента кДНК гена *IL-2*. Обозначения как в рисунке 15.

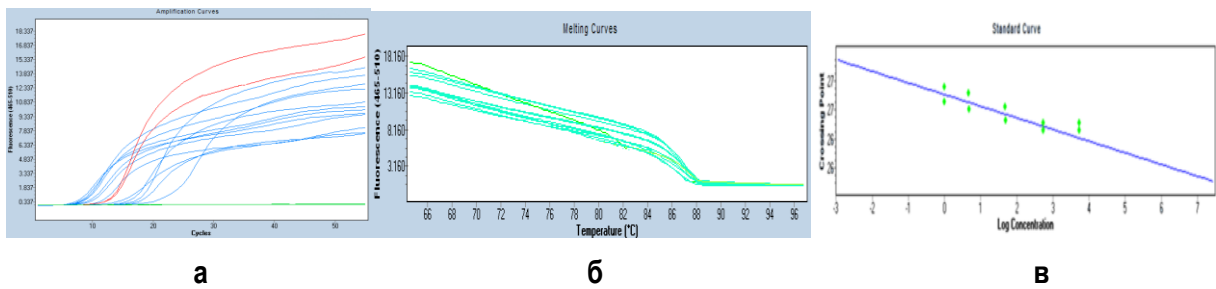


Рисунок 17. Параметры реакции амплификации фрагмента кДНК гена *IL-17*. Обозначения как в рисунке 15.

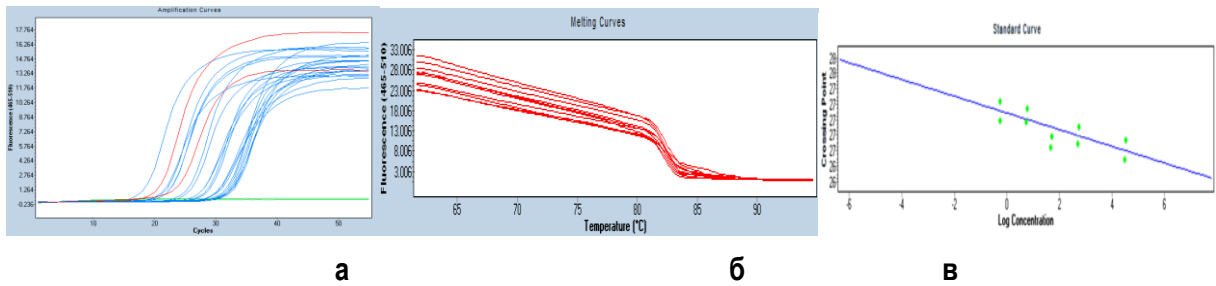


Рисунок 18. Параметры реакции амплификации фрагмента кДНК гена *IFN-γ*. Обозначения как в рисунке 15.

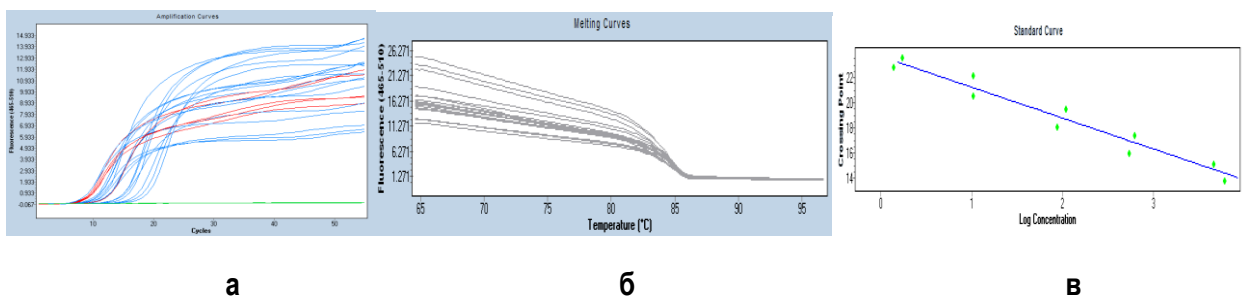


Рисунок 19. Параметры реакции амплификации фрагмента кДНК гена *TNF-α*. Обозначения как в рисунке 15.

2.2.9.2. Мультиплексная количественная ПЦР в реальном времени

Для определения уровня относительной экспрессии мРНК гена hTERT применяли мультиплексную ПЦР (qPCRmixHS («Евроген», Россия)), праймеры (10пМ («Beagle», Россия)) и специфические TaqMan зонды (5пМ («Beagle», Россия)). Реакционная смесь объемом 20 мкл состояла из 5 мкл кДНК, 2 мкл праймеров (F+R) 10рМ для таргентного гена, 2 мкл праймеров (F+R) 10рМ для референсного гена (*GAPDH*), 1 мкл флуоресцентного зонда 10рМ для таргентного гена, 1 мкл флуоресцентного зонда 10рМ для референсного гена (*GAPDH*), 5 мкл

реакционной смеси qPCRmixHS («Евроген», Россия) и 4 мкл деионизованной дистиллированной воды, свободной от РНКаз. ПЦР-реакцию ставили в 3 трех повторах.

Принцип метода заключается в использовании флуоресцирующих зондов, комплементарных внутренней последовательности амплифицируемых фрагментов в реакционной смеси. Флуоресцентный зонд несет на 5'-конце флуорофор, а на 3'-конце - так называемый «гаситель», который подобран таким образом, чтобы диапазон его поглощения соответствовал диапазону эмиссии флуорофора на 5'-конце.

Данный подход способствует гашению флуоресценции на 5'-флуорофоре за счет флуоресцентно-резонансного переноса энергии (FRET). При условии целостности зонда флуоресценция оказывается близкой к нулю.

ПЦР представляет повторяющиеся циклы синтеза (амплификации) участка кДНК, который ограничен праймерами. При каждом цикле амплификации зонд гибридизуется с комплементарным участком кДНК с последующим гидролизом зонда полимеразой.

Вследствие этого, происходит пространственное разобщение 5'- и 3'-концевых меток, способствуя флуоресценции.

Регистрируемые значения флуоресценции 5'-флуорофора прямо пропорциональны увеличению числа ампликонов, что отражает концентрацию кДНК в образце.

Нуклеотидные последовательности, соответствующие генам *hTERT* и *GAPDH* извлекали из баз данных NCBI (National Center for Biotechnological Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Дизайн праймеров для амплификации кДНК указанных генов осуществлялся с помощью программ «Primer.3», «OligoAnalyzer», «Primer-BLAST». Используемые олигонуклеотидные праймеры для определения уровня относительной экспрессии генов *hTERT* и *GAPDH* («Beagle», Россия) представлены в таблице 2.

Таблица 2. Олигонуклеотидные последовательности для определения уровня относительной экспрессии генов *hTERT* и *GAPDH*

<i>TERT</i> _for5'-TGACACCTCACCTCACCCACC-3'

<i>TERT</i> _rev5'-CACTGTCTTCCGCAAGTTCACC-3'
<i>TERT</i> _probe FAM-5'- ACCCTGGTCCGAGGTGTCCCTGAG -3'~BHQ-1 (зонд)
<i>GAPDH</i> _for 5'-GAAGGTGAAGGTCCGGAGTC-3'
<i>GAPDH</i> _rev 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'
<i>GAPDH</i> _probe HEX-5'-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-3'~BHQ-1 (зонд)

Для каждой пары праймеров для мультиплексной ПЦР были подобраны оптимальные режимы амплификации с использованием градиентной ПЦР (LightCycler 480 Real-Time PCR («Roche», Швейцария) (рисунок 20).

Протокол амплификации:

- первичная денатурация – 5 мин при 95°C;
- амплификационный цикл (x 40):
- денатурация – 15 с при 95°C;
- отжиг праймеров - 30 с при 60°C;
- элонгация - 60 с при 72°C.

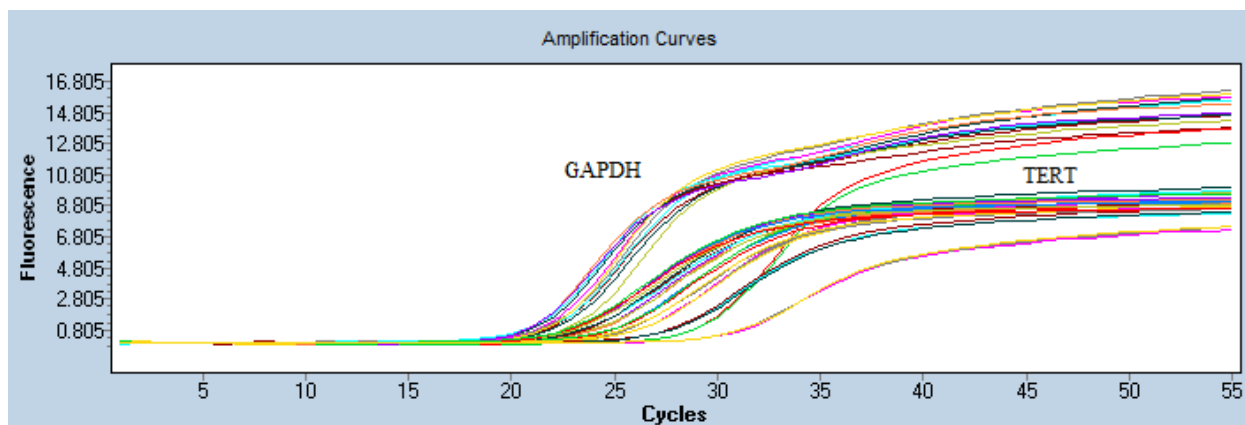


Рисунок 20. Графическое представление кинетики накопления продукта ПЦР исследуемых генов при амплификации экспериментальных образцов (*GAPDH*–референсный ген, *hTERT*–таргетный ген).

Результаты ПЦР анализировали методом максимума второй производной (SecondDerivativeMaximummethod), согласно которому, определяется значение некоторой характеристической точки *C_p* (Crossing point) на графиках накопления продуктов амплификации.

Определение уровня относительной экспрессии генов проводили с использованием модифицированной формулы Пфаффа для разных эффективностей амплификации.

Относительный уровень экспрессии таргетного гена вычислялся исходя из значения эффективности ПЦР в реальном времени (E) и разности (Δ) точек пересечения (C_p) исследуемого образца по сравнению с контрольным ($\Delta C_p = C_p$ контрольного образца – C_p исследуемого образца).

Применяемый количественный анализ (Relative Quantification), основанный на отношении экспрессий референсного и таргетного генов является достаточным для целей исследования, заключающихся в детекции патофизиологических изменений уровней экспрессии генов.

2.2.10. Методы статистического анализа данных

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences).

Оценку полученных результатов проводили методом проверки статистических гипотез и методом статистического описания. Для проверки гипотезы о принадлежности исследуемых выборок к нормальному закону распределения использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Для выборок, имеющих нормальное распределение данных вычисляли средневывборочные характеристики: среднее арифметическое (\bar{X}), среднее квадратичное отклонение (σ), ошибка среднего (m). В данных группах проверку гипотезы о равенстве средневывборочных величин проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа. Для выборок, распределение в которых отличалось от нормального, рассчитывали медиану (M), первый и третий квартили (Q1, Q3). Для оценки значимости различий между групп, не подчиняющихся нормальному распределению данных, применяли критерий Краскела-Уоллиса. Для попарного сравнения переменных использовали критерий Манна-Уитни для независимых групп и критерий Вилкоксона для зависимых выборок. Различие величин считались достоверным при уровне значимости $p < 0,05$. С целью выявления взаимосвязи между исследуемыми показателями проводили корреляционный

анализ, путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r) и регрессионный - путем вычисления коэффициента регрессии (r^2) [Кремер Н.Ш., 2004].

Статистическая обработка данных ПЦР с детекцией продуктов в режиме реального времени осуществлялась с помощью специализированной программы REST 2009 v. 2.0.12. Основной формулой данного софта, используемой для расчета относительных уровней экспрессии мРНК, является модифицированная формула Пфаффла, описанная выше. Основные алгоритмы программы для статистического анализа изложены в соответствующей работе, посвященной обзору данного приложения [Pfaffl M.W. et al., 2001]. Программа REST с использованием специального рандомизационного теста предназначена для наиболее оптимальной интерпретации данных относительного количественного анализа ПЦР в режиме реального времени. Стоит подчеркнуть, что в случае рандомизационного теста нет необходимости проверять предположения о нормальности распределения выборок или равенстве их дисперсий. Используемая в программе математическая модель объединяет в одном расчёте нормирование по референсному гену с количественной оценкой экспрессии исследуемых генов. Различия в уровнях экспрессии между контролем и исследуемой группой были оценены по каждому гену в группах средних значений C_p на статистическую значимость по рандомизации испытаний. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

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

Таблица 3. Распределение экспериментальных клеточных моделей *invitro* в соответствии с использованными методами исследования (число культур/число определений)

Методы исследования	Условия культивирования	Экспериментальные клеточные модели CD3 ⁺ CD45RO ⁺
		Число культур/определений
Определение общего числа клеток (в мл) и числа живых лимфоцитов в CD3 ⁺ CD45RO ⁻ культурах методом проточной цитометрии	Интактная проба + Ас/Exp Ас/Exp + Dex (2.00 мг) Ас/Exp + Dex (8.00 мг) Ас/Exp + Dex (16.00 мг) Ас/Exp + Dex (32.00 мг) Ас/Exp + Dex (64.00 мг) Ас/Exp + МР (10.60 мг) Ас/Exp + МР (21.30 мг) Ас/Exp + МР (42.60 мг) Ас/Exp + МР (85.30 мг) Ас/Exp + МР (170.70 мг)	70/840
Определение числа CD4 ⁺ CD25 ⁺ /CD28 ⁺ /CD71 ⁺ /CD95 ⁺ клеток методом проточной цитометрии		70/3360
Определение числа CD95 ⁺ HLA-DR-позитивных клеток методом проточной цитометрии		70/840
Определение содержания концентрации проспалительных цитокинов (IL-2, IL-17, IL-21, TNF-α, IFNγ) в супернатантах клеточных культур методом иммуноферментного анализа		70/840
Определение относительного уровня экспрессии мРНК генов <i>IL-2, IL-17, IL-21, TNF-α, IFN-γ</i> методом полимеразно-цепной реакции		70/2520 (на 1 ген)
Определение уровня экспрессии мРНК гена <i>hTERT</i> в Т-клетках методом полимеразно-цепной реакции		70/2520

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Оценка эффектов синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, метилпреднизолон) на общее количество (10^6 /мл) и содержание живых/мертвых (%) клеток в культурах TCR - активированных $CD3^+CD45RO^+$ Т-лимфоцитов у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом

После окончания срока культивирования (48 ч), общее количество клеток/мл в интактных культурах $CD3^+CD45RO^+$ Т-клеток у здоровых доноров составляло $1.01 (0.87-1.21) \times 10^6$ кл/мл. Инкубация Т-лимфоцитов памяти с активирующим анти-CD2/CD3/CD28-комплексом (Ac/Exp), приводила к достоверному ($p < 0.05$) увеличению числа клеток, в среднем, на 22% (таблица 4). Согласно полученным данным, глюкокортикоиды – дексаметазон (Dex) и метилпреднизолон (MP) в комбинации с активатором, не оказывали статистически значимого влияния на изменение общего числа (в мл) $CD3^+CD45RO^+$ Т-лимфоцитов в культурах здоровых доноров, по сравнению с пробами только с добавлением активатора (таблица 4). В интактных пробах здоровых доноров количество живых клеток в $CD3^+CD45RO^+$ -культурах было равным 71.68 (64.44-79.06)%. TCR-активация культур Т-клеток приводила к статистически значимому ($p < 0.01$) снижению числа живых клеток, по сравнению с неактивированной пробой (таблица 4). Добавление в активированную культуру Т-лимфоцитов Dex (2.00-16.00 мг) сопровождалось статистически значимым ($p < 0.05$) повышением числа живых $CD3^+CD45RO^+$ Т-клеток, по сравнению с пробами только с добавлением активирующих частиц. При культивации активированных $CD3^+CD45RO^+$ Т-лимфоцитов с максимальной концентрацией Dex (64.00 мг), количество живых клеток в культуре статистически значимо снижалось ($p < 0.01$), по сравнению с пробами только с активатором и культурами клеток с добавлением меньших концентраций ГК (таблица 4).

Инкубация TCR-активированных Т-клеток памяти здоровых доноров с MP (10.60-170.70 мг) приводила к достоверно значимому ($p < 0.01$) дозозависимому снижению числа живых клеток в культуре ($r^2 = -0.373$; $p < 0.05$).

Общее количество клеток в интактных культурах $CD45RO^+$ Т-лимфоцитов больных РА после окончания срока культивирования (48 ч) составляло, в среднем $0.88 (0.85-0.91) \times 10^6$ кл/мл (таблица 4). Инкубация Т-клеток с комплексом анти-

CD2/CD3/CD28 сопровождалась незначительным повышением числа клеток в культурах CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов (p>0.05). Сочетанное действие Ас/Ехр и ГК (Dex и МР) на CD3⁺CD45RO⁺ культуры Т-клеток больных РА не изменяло общее число клеток (в мл).

В интактных пробах больных РА число живых клеток было равным 51.33 (41.39-60.08)%. TCR-активация CD3⁺CD45RO⁺ Т-клеток больных РА значимо не изменяла значения данных показателей. Согласно полученным нами данным, снижение содержания живых клеток (по сравнению с пробами только с добавлением активатора) в культурах от больных РА регистрировалось только при добавлении высоких доз МР (85.30 и 170.70 мг) (таблица 4). Добавление Dex значимо не влияло на изменение числа живых клеток в TCR-активированных культурах CD3⁺CD45RO⁺ Т-клеток больных РА (таблица 4).

Содержание мертвых лимфоцитов (%) в культурах CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов в условиях инкубации *in vitro* с Т-клеточным активатором (Ас/Ехр) и разными концентрациями синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, Dex и метилпреднизолона, МР) у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом отражено в таблице 4.

Таблица 4. Общее количество клеток (10⁶/мл) и содержание живых/мертвых лимфоцитов (%) в культурах CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов в условиях инкубации *in vitro* с Т-клеточным активатором (Ас/Ехр) и разными концентрациями синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, Dex и метилпреднизолона, МР) у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом (Ме (Q1 - Q3))

Показатель	Условия культивирования	Здоровые доноры	Больные РА	
Общее число клеток (10 ⁶ клеток/мл)	Без активации	1.01 (0.88–1.21)	0.88 (0.85–0.91) [◇]	
	Ас/Ехр	1.21 (1.05–1.28) p ₀ <0.05	0.91 (0.80–0.96) [◇]	
	Ас/Ехр + Dex (мг)	2.00	1.19 (1.16–1.25)	0.93 (0.82–0.99) [◇]
		8.00	1.22 (1.18–1.27)	0.90 (0.79–0.98) [◇]
		16.00	1.20 (1.19–1.30)	0.95 (0.86–1.01) [◇]
		32.00	1.18 (1.15–1.22)	0.92 (0.88–0.98) [◇]
		64.00	1.21 (1.12–1.27)	0.94 (0.81–0.97) [◇]
	Ас/Ехр + МР (мг)	10.60	1.21 (1.05–1.28)	0.86 (0.76–0.91) [◇]
		21.30	1.21 (1.05–1.28)	0.86 (0.76–0.91) [◇]
		42.60	1.21 (1.05–1.28)	0.88 (0.77–0.93) [◇]
		85.30	1.20 (1.04–1.27)	0.91 (0.80–0.96) [◇]
		170.70	1.18 (1.02–1.25)	0.91 (0.80–0.95) [◇]

Содержание живых клеток (%)	Без активации		71.68 (64.44–79.06)	51.33 (41.39–60.08) [◇]	
	Ac/Exp		60.25 (55.73–66.84) $p_0 < 0.01$	55.29 (40.29–59.06)	
	Ac/Exp + Dex (мг)	2.00	68.72 (59.75–75.78) $p_1 < 0.05$	56.82 (48.32–61.97) [◇]	
		8.00	69.11 (63.68–76.23) $p_1 < 0.05$	56.56 (41.32–60.42) [◇] $p_1 < 0.05$	
		16.00	66.34 (60.07–74.64) $p_1 < 0.05$	57.20 (38.20–62.87) [◇]	
		32.00	64.52 (58.74–76.10)	59.89 (53.44–61.44) [◇]	
		64.00	48.30 (39.73–52.05) $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.01$ $p_3 < 0.05$ $p_4 < 0.05$ $p_5 < 0.05$	53.20 (31.20–55.35)	
	Ac/Exp + MP (мг)	10.60	54.40 (51.13–59.65) $p_1 < 0.05$	60.16 (44.84–64.91) $p_1 < 0.01$	
		21.30	50.40 (48.13–52.65) $p_1 < 0.01$ $p_2 < 0.05$	58.61 (44.84–63.91)	
		42.60	47.61 (44.54–52.32) $p_1 < 0.01$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.05$	54.76 (41.10–59.49)	
		85.30	36.67 (34.30–40.58) $p_1 < 0.01$ $p_2 < 0.01$ $p_3 < 0.01$ $p_4 < 0.01$	42.53 (30.99–48.06) $p_1 < 0.01$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.05$ $p_4 < 0.05$	
		170.70	18.31 (15.65–25.29) $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.05$ $p_4 < 0.05$ $p_5 < 0.01$	17.78 (12.95–18.99) $p_1 < 0.01$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.05$ $p_4 < 0.05$ $p_5 < 0.01$	
	Содержание мертвых клеток (%)	Без активации		27.89 (25.11–29.13)	46.87 (44.38–49.39) [◇]
		Ac/Exp		39.75 (34.32–42.29) $p_0 < 0.05$	45.33 (43.21–48.78) [◇]
Ac/Exp + Dex (мг)		2.00	34.94 (32.15–37.43) $p_1 < 0.05$	45.48 (42.34–49.39) [◇]	
		8.00	31.12 (28.36–35.41) $p_1 < 0.05$	44.18 (42.20–50.39) [◇]	
		16.00	35.74 (31.33–34.72)	42.24 (38.45–46.34) [◇]	
		32.00	36.01 (35.12–40.02)	43.32 (41.54–45.53) [◇]	
		64.00	47.21 (43.20–52.15) $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.05$ $p_4 < 0.05$	47.45 (45.23–51.65)	

			$p_5 < 0.01$	
	Ac/Exp + MP (мг)	10.60	37.23 (35.43-41.92)	42.34 (38.29-46.43)
		21.30	45.56 (41.38-48.32) $p_1 < 0.05$	41.30 (39.29-43.28)
		42.60	53.48 (49.34-57.11) $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$	45.24 (41.32-48.39)
		85.30	56.43 (53.41-59.12) $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$	53.92 (49.21-58.32) $p_1 < 0.05$ $p_1 < 0.01$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.05$
		170.70	64.03 (60.92-69.49) $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.05$ $p_4 < 0.01$ $p_5 < 0.01$	57.47 (54.67-61.67) $p_1 < 0.01$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.05$ $p_4 < 0.05$

Здесь и в сл. таблицах:

p_0 - достоверность различий по сравнению с интактной пробой

p_1 - достоверность различий по сравнению с активированной пробой

p_2 - достоверность различий по сравнению с активированной пробой с добавлением Dex (2.00 мг)/MP (10.60 мг)

p_3 - достоверность различий по сравнению с активированной пробой с добавлением Dex (8.00 мг)/MP (21.30 мг)

p_4 - достоверность различий по сравнению с активированной пробой с добавлением Dex (16.00 мг)/MP (42.60 мг)

p_5 - достоверность различий по сравнению с активированной пробой с добавлением Dex (32.00 мг)/MP (85.30 мг)

\diamond – достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров.

3.2. Оценка эффектов синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, метилпреднизолона) на экспрессию мембранных молекул ранней активации (CD25), коактивации (CD28), пролиферации (CD71), поздней активации (HLA-DR) и апоптоза (CD95) и CD45RA в культурах TCR-активированных CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом

3.2.1. Мембранная экспрессия молекулы ранней активации CD25

Молекула CD25 является α -цепью рецептора IL-2, экспрессируясь на ранних этапах активации лимфоцитов [Wieland E. et al., 2016].

По окончании срока инкубации (через 48 ч), в интактных пробах здоровых доноров количество CD4⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов, экспрессирующих на своей мембране активационную молекулу – CD25, составило 3.11 (2.99-3.14)%.

Культивирование с активационными частицами приводило к увеличению исследуемого показателя, в среднем, в 12 раз ($p < 0.05$) (таблица 5).

Добавление в культуры активированных $CD3^+CD45RO^+$ Т-клеток здоровых доноров Дех (16.00-64.00 мг) способствовало относительно равномерному снижению числа $CD4^+CD25^+$ Т-клеток, в среднем, на 34% ($p < 0.05$) (таблица 5). Инкубация Т-лимфоцитов в условиях добавления активатора и МР (во всем спектре концентраций), способствовала дозозависимому снижению числа $CD4^+CD45RO^+CD25^+$ Т-клеток ($r^2 = - 0.588$; $p < 0.05$) по сравнению с пробой только с добавлением активатора (таблица 5).

Количество $CD4^+CD45RO^+CD25^+$ лимфоцитов в интактных пробах больных РА на момент окончания инкубации (48 ч) было равным 1.95 (1.60-2.70)% (таблица 5). Инкубация $CD3^+CD45RO^+$ Т-лимфоцитов больных РА с активатором приводила к достоверному увеличению числа $CD4^+CD25^+$ клеток, в среднем, в 13 раз ($p < 0.05$).

Сочетанное действие Дех и активатора способствовало достоверному снижению ($p < 0.05$) количества $CD4^+CD45RO^+CD25^+$ Т-клеток в $CD3^+CD45RO^+$ культурах, полученных у больных РА (таблица 2). Добавление МР (во всем спектре концентраций) к активированным Т-клеткам сопровождалось значимым уменьшением ($p < 0.05$) числа $CD4^+CD25^+$ -позитивных лимфоцитов в культурах, полученных от больных РА (таблица 5). Наибольшее МР-индуцированное снижение числа $CD3^+CD4^+CD25^+CD45RO^+$ регистрировалось при добавлении максимальной дозы МР (таблица 5).

Таблица 5. Содержание $CD4^+CD25^+$ клеток (%) в культурах $CD3^+CD45RO^+$ Т-лимфоцитов в условиях инкубации *in vitro* с Т-клеточным активатором (Ас/Ехр) и разными концентрациями синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, Дех и метилпреднизолона, МР) у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом (Ме (Q1 - Q3))

Варианты культивирования		Количество $CD4^+CD25^+$ клеток, %	
		Здоровые доноры	Больные РА
Без активации		3.11 (2.99-3.14)	1.95 (1.60-2.70) $^{\diamond}$
Ас/Ехр		35.22 (30.19-36.29) $p_0 < 0.01$	25.13 (15.75-27.52) $^{\diamond}$ $p_0 < 0.01$
Ас/Ехр + Дех (мг)	2.00	35.92 (30.79-37.02)	19.75 (13.48-23.08) $^{\diamond}$ $p_1 < 0.01$
	8.00	34.87 (29.89-36.93)	19.48 (12.70-22.18) $^{\diamond}$ $p_1 < 0.01$

	16.00	26.68 (22.87-27.49) p ₁ <0.01 p ₂ <0.05 p ₃ <0.01	15.58 (9.85-17.54) [◇] p ₁ <0.01 p ₂ <0.05 p ₃ <0.05
	32.00	21.35 (18.29-21.99) p ₁ <0.05 p ₂ <0.05 p ₃ <0.05 p ₄ <0.01	16.37 (12.87-19.87) [◇] p ₁ <0.01 p ₂ <0.05
	64.00	22.15 (18.99-22.82) p ₁ <0.01 p ₂ <0.05 p ₃ <0.05 p ₄ <0.01	12.78 (9.05-15.80) [◇] p ₁ <0.01 p ₂ <0.05 p ₃ <0.05 p ₅ <0.01
Ac/Exp + MP (мг)	10.60	28.29 (23.82-31.03) p ₁ <0.05	18.76 (16.67-19.88) [◇] p ₁ <0.01
	21.30	24.29 (20.82-25.03) p ₁ <0.05	15.06 (13.42-16.74) [◇] p ₁ <0.01
	42.60	13.55 (11.61-13.96) p ₁ <0.05 p ₂ <0.05 p ₃ <0.05	14.87 (12.32-16.88) p ₁ <0.01 p ₂ <0.05
	85.30	10.71 (9.18-11.03) p ₁ <0.05 p ₂ <0.05 p ₃ <0.05	14.76 (12.25-16.16) [◇] p ₁ <0.01 p ₂ <0.01
	170.70	5.04 (4.32—5.49) p ₁ <0.05 p ₂ <0.05 p ₃ <0.05 p ₄ <0.05 p ₅ <0.05	11.43 (7.16-12.51) [◇] p ₁ <0.05 p ₂ <0.01 p ₃ <0.05 p ₄ <0.05 p ₅ <0.01

3.2.2. Мембранная экспрессия молекулы ко-стимуляции CD28

Молекула CD28 представляет собой ключевой рецептор ко-стимуляции, который необходим для процессов гомеостаза Т-лимфоцитов: активации, пролиферации, созревания и дифференцировки [Lee G.H. et al., 2016]. Репликативное старение клеток связано с постепенным снижением уровня экспрессии гликопротеина CD28 [Markovic-Plese S. et al., 2001; Broux V. et al., 2012; Pieper J. et al., 2014; Lee G.H. et al., 2016; Yu H.T. et al., 2016].

Количество CD4⁺CD28-позитивных клеток в интактной пробе здоровых доноров на момент окончания инкубации (48 ч) было равным 47.86 (45.83-50.57)% (таблица 6). Добавление активатора приводило к снижению показателя в среднем, в 1.2 раза (p<0.05).

Инкубация TCR-активированных Т-клеток здоровых доноров с Dex (16.00-64.00 мг) и MP (42.60-170.70 мг) значимо ($p < 0.05$) снижала число $CD4^+CD28^+$ лимфоцитов в $CD3^+CD45RO^+$ культурах (таблица 6).

На момент окончания срока инкубации (48 ч) количество $CD4^+CD28^+$ клеток в интактных пробах больных РА составило 33.65 (29.11-37.85)% (таблица 6). Культивирование $CD3^+CD45RO^+$ клеток в присутствии активатора сопровождалось достоверным снижением числа $CD4^+CD28^+$ Т-клеток ($p < 0.05$). Добавление в культуральную среду ГК (Dex и MP) на фоне TCR-активации $CD3^+CD45RO^+$ клеток, сопровождалось дозозависимым снижением числа $CD28^+$ лимфоцитов ($r^2 = -0.462$ и $r^2 = -0.568$; $p < 0.05$, соответственно).

Таблица 6. Содержание $CD4^+CD28^+$ клеток (%) в культурах $CD3^+CD45RO^+$ Т-лимфоцитов в условиях инкубации *in vitro* с Т-клеточным активатором (Ac/Exp) и разными концентрациями синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, Dex и метилпреднизолона, MP) у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом (Me (Q1 - Q3))

Варианты культивирования		Количество $CD4^+CD28^+$ клеток, %	
		Здоровые доноры	Больные РА
Без активации		47.86 (45.83-50.57)	33.65 (29.11-37.85) [◇]
Ac/Exp		41.70 (40.53-42.15) $p_0 < 0.05$	31.15 (26.44-36.96) [◇] $p_0 < 0.05$
Ac/Exp + Dex (мг)	2.00	41.74 (39.23-43.23)	30.01 (24.87-33.60) [◇]
	8.00	42.25 (39.98-44.38)	28.88 (23.98-31.87) [◇] $p_1 < 0.05$
	16.00	36.20 (34.22-38.42) $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.05$	25.59 (22.90-29.80) [◇] $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.05$
	32.00	31.20 (30.29-31.62) $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.05$	21.52 (18.00-24.70) [◇] $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.05$ $p_4 < 0.05$
	64.00	26.14 (25.43-26.40) $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.05$ $p_4 < 0.05$ $p_5 < 0.05$	13.39 (12.30-14.98) [◇] $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.01$ $p_3 < 0.05$ $p_4 < 0.01$ $p_5 < 0.05$
Ac/Exp + MP (мг)	10.60	38.35 (35.04-41.85)	29.20 (27.05-31.63) [◇]
	21.30	37.85 (32.98-42.70)	24.77 (21.20-29.80) [◇] $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$
	42.60	31.32 (27.83-34.87) $p_1 < 0.05$	21.22 (18.99-25.08) [◇] $p_1 < 0.05$

		$p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.05$	$p_2 < 0.01$ $p_3 < 0.05$
	85.30	24.30 (22.72-27.13) $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.05$ $p_4 < 0.05$	16.44 (15.23-18.21) [◇] $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.01$ $p_3 < 0.05$ $p_4 < 0.01$
	170.70	21.13 (19.50-23.14) $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.05$ $p_4 < 0.05$ $p_5 < 0.05$	11.33 (9.16-13.33) [◇] $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.01$ $p_4 < 0.05$ $p_5 < 0.01$

3.2.3. Мембранная экспрессия молекулы пролиферации CD71

Молекула CD71 представляет собой рецептор трансферрина, экспрессия которого возрастает на активированных лимфоцитах [Wieland E. et al., 2016].

Количество CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов в культурах здоровых доноров, экспрессирующих на своей мембране молекулу пролиферации – CD71, после инкубационного периода (48 ч), в интактных пробах составляло, в среднем 4.70 (4.58-5.43)%, соответственно. Культивирование с активационными частицами приводило к увеличению исследуемого показателя, в среднем, в 3 раза ($p < 0.01$) (таблица 7). Культивирование TCR-активированных CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ клеток здоровых доноров с добавлением Dex и MP приводило к достоверному ($p < 0.01$) дозозависимому снижению количества клеток, экспрессирующих молекулу CD71 ($r^2 = -0.556$ и $r^2 = -0.608$; $p < 0.05$, соответственно) (таблица 7).

Количество CD71-позитивных CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти в интактных пробах больных РА на момент окончания срока инкубации (48 ч) составило 0.64 (0.35-0.85)%, соответственно (таблица 7). Культивирование с активационными частицами приводило к увеличению исследуемого показателя, в среднем, в 13 раз ($p < 0.01$) (таблица 7). Инкубация TCR-активированных Т-клеток с Dex и MP способствовала достоверному снижению числа CD4⁺CD45RO⁺CD71⁺ лимфоцитов в культурах Т-клеток памяти больных РА ($r^2 = -0.339$; $r^2 = -0.684$, $p < 0.05$, соответственно) (таблица 7).

Таблица 7. Содержание CD4⁺CD71⁺ клеток (%) в культурах CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов в условиях инкубации *in vitro* с Т-клеточным активатором (Ac/Exp) и

разными концентрациями синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, Дех и метилпреднизолона, МР) у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом (Ме (Q1 - Q3))

Варианты культивирования		Количество CD4 ⁺ CD71 ⁺ клеток, %	
		Здоровые доноры	Больные РА
Без активации		4.70 (4.58-5.43)	0.64 (0.35-0.85) [◇]
Ac/Exp		15.04 (12.45-17.38) p ₀ <0.01	8.04 (5.42-11.02) [◇] p ₀ <0.01
Ac/Exp + Dex (мг)	2.00	12.43 (10.29-14.36) p ₁ <0.01	6.60 (4.02-8.61) [◇] p ₁ <0.05
	8.00	10.37 (8.59-11.98) p ₁ <0.01 p ₂ <0.01	5.29 (3.06-6.77) [◇] p ₁ <0.01
	16.00	9.77 (8.08-11.28) p ₁ <0.01 p ₂ <0.01	4.73 (2.61-5.37) [◇] p ₁ <0.01 p ₂ <0.05
	32.00	5.19 (4.29-5.99) p ₁ <0.01 p ₂ <0.05 p ₃ <0.05 p ₄ <0.05	4.68 (3.14-4.97) p ₁ <0.01 p ₂ <0.01
	64.00	3.39 (2.80-3.91) p ₁ <0.01 p ₂ <0.05 p ₃ <0.05 p ₄ <0.01 p ₅ <0.05	3.60 (2.53-4.47) p ₁ <0.01 p ₂ <0.01 p ₃ <0.01
Ac/Exp + МР (мг)	10.60	3.96 (3.28-4.57) p ₁ <0.05	3.39 (2.29-4.65) p ₁ <0.01
	21.30	3.56 (3.02-3.95) p ₁ <0.05 p ₂ <0.05	2.98 (2.05-3.74) p ₁ <0.01
	42.60	3.34 (2.77-3.86) p ₁ <0.05 p ₂ <0.05 p ₃ <0.05	2.70 (1.82-3.69) p ₁ <0.01 p ₂ <0.01
	85.30	2.84 (2.35-3.28) p ₁ <0.05 p ₂ <0.05 p ₃ <0.05 p ₄ <0.05	2.25 (1.52-3.09) p ₁ <0.01 p ₂ <0.01
	170.70	2.42 (2.00-2.79) p ₁ <0.05 p ₂ <0.05 p ₃ <0.05 p ₄ <0.05 p ₅ <0.05	1.79 (1.21-2.46) p ₁ <0.01 p ₂ <0.05 p ₃ <0.01 p ₄ <0.05 p ₅ <0.05

3.2.4. Мембранная экспрессия молекулы апоптоза CD95

Молекула CD95 обладает рядом функциональных свойств, среди которых, *не только* участие в программированной клеточной гибели, а также - пролиферации, канцерогенезе, созревании Т-лимфоцитов и др. [Gajate C. et al., 2015].

На момент окончания срока инкубации, количество CD4⁺CD95⁺ в интактных культурах CD45RO⁺ лимфоцитов здоровых доноров было равным 11.96 (11.19-14.01)%, соответственно; добавление активирующего анти-CD2/CD3/CD28 комплекса приводило к увеличению данного параметра в 2 раза по сравнению с аналогичными параметрами в контроле (таблица 8).

Культивирование CD3⁺CD45RO⁺ клеток здоровых доноров в присутствии активатора и Dex (2.00 – 16.00 мг) сопровождалось статистически значимым снижением ($p < 0.01$) числа CD4⁺CD95⁺ лимфоцитов, тогда как увеличение концентрации ГК (32.00-64.00 мг) в среде культивирования приводило к росту количества CD4⁺CD95⁺ клеток ($p < 0.01$) (по сравнению с пробами только с активатором) (таблица 8). Добавление к культуре активированных - CD3⁺CD45RO⁺ клеток МР (170.70 мг) сопровождалось достоверным снижением количества лимфоцитов, экспрессирующих молекулу CD95 ($p < 0.05$), тогда как более низкие концентрации ГК не оказывали влияния (по сравнению с пробой только с добавлением активатора) на исследуемый параметр (таблица 8).

Через 48 ч инкубации в интактных пробах CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов, полученных у больных РА, количество CD4⁺CD95⁺ составило 8.18 (7.01-9.87)%. Инкубация CD3⁺CD45RO⁺ Т-клеток в присутствии анти-CD2/CD3/CD28-комплекса, приводила к росту числа (по сравнению с интактными значениями) CD4⁺CD95⁺ клеток, средним, в 2 раза (таблица 8).

Культивирование TCR-активированных CD3⁺CD45RO⁺ клеток в присутствии Dex сопровождалось достоверным снижением содержания CD4⁺CD95⁺ Т-клеток в исследуемых культурах (по сравнению с пробой только с добавлением активатора) ($p < 0.01$). МР (10.60 – 85.20 мг), на фоне действия анти-CD2/CD3/CD28-комплекса, достоверно ($p < 0.01$) повышал число CD4⁺CD95⁺ Т-клеток в культурах CD3⁺CD45RO⁺ клеток, полученных у больных РА (по сравнению с пробой только с добавлением активатора); максимальная доза ГК (170.70 мг) снижала количество CD4⁺CD95-позитивных клеток в культурах больных РА (таблица 8).

Таблица 8. Содержание CD4⁺CD95⁺ клеток (%) в культурах CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов в условиях инкубации *in vitro* с Т-клеточным активатором (Ac/Exp) и разными концентрациями синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, Dex и метилпреднизолона, MP) у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом (Me (Q1 - Q3))

Варианты культивирования		Количество CD4 ⁺ CD95 ⁺ клеток, %	
		Здоровые доноры	Больные РА
Без активации		11.96 (11.19-14.01)	8.18 (7.01-9.87) [◇]
Ac/Exp		21.46 (20.07-25.05) p ₀ <0.01	28.99 (25.75-33.16) [◇] p ₀ <0.01
Ac/Exp + Dex (мг)	2.00	18.51 (16.24-22.78) p ₁ <0.01	17.44 (15.79-21.13) p ₁ <0.01
	8.00	17.96 (15.28-21.32) p ₁ <0.01	19.86 (18.71-22.72) p ₁ <0.01
	16.00	18.68 (16.88-20.32) p ₁ <0.01	19.29 (16.89-22.21) p ₁ <0.01
	32.00	26.60 (22.02-27.56) p ₁ <0.01 p ₂ <0.05 p ₃ <0.05 p ₄ <0.05	19.57 (16.55-21.54) [◇] p ₁ <0.01
	64.00	28.75 (26.88-33.57) p ₁ <0.01 p ₂ <0.01 p ₃ <0.01 p ₄ <0.01	22.05 (17.24-23.03) [◇] p ₁ <0.01
Ac/Exp + MP (мг)	10.60	19.76 (18.47-23.07)	38.38 (34.09-43.91) [◇] p ₁ <0,01
	21.30	20.98 (19.17-24.85)	39.16 (35.21-44.63) [◇] p ₁ <0.01
	42.60	23.60 (22.07-27.56)	40.29 (35.80-46.09) [◇] p ₁ <0.05
	85.30	24.03 (22.47-28.06)	35.08 (31.16-40.13) [◇] p ₁ <0.01 p ₂ <0.01 p ₃ <0.01 p ₄ <0.01
	170.70	12.06 (11.28-14.07) p ₁ <0.05 p ₂ <0.05 p ₃ <0.01 p ₄ <0.01 p ₅ <0.05	25.89 (22.99-29.61) [◇] p ₁ <0.01 p ₂ <0.05 p ₃ <0.05 p ₄ <0.01 p ₅ <0.05

3.2.5. Мембранная экспрессия молекулы поздней активации HLA-DR

HLA-DR, наряду с молекулой CD95 является маркером не только поздней, но и длительной активации [Imamichi H. et al., 2012; Arruvito L. et al., 2014]. Показано,

что в CD4⁺ и CD8⁺ популяциях эффекторных Т-клеток, более 99% лимфоцитов с фенотипом - CD3⁺HLA-DR⁺, экспрессируют маркер CD95. Однако не все CD95-позитивные Т-лимфоциты несут на своей поверхности маркер «поздней активации» HLA-DR⁺ [Сохоневич Н.А., 2015]. В связи с этим, мы оценивали содержание CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ Т-лимфоцитов в CD3⁺CD45RO⁺ культурах здоровых доноров и больных РА. Кроме того, нами было выявлено, что CD3⁺CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺CD45RO⁺ (далее CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺, T_{EM}) клетки были негативными по мембранной экспрессии молекулы CD28.

Число CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ в интактных пробах здоровых доноров составляло, 4.94 (3.95-5.79)% (таблица 9). Добавление активатора приводило к увеличению (p<0.05) исследуемого показателя (в среднем, в 2 раза) по сравнению с интактными цифрами (таблица 9).

Dex (8.00-16.00 мг) повышал (p<0.01) число CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ клеток в TCR-активированных CD3⁺CD45RO⁺ культурах здоровых доноров (таблица 9). Увеличение концентрации ГК в культуральной среде приводило к снижению числа CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ Т-клеток в культурах здоровых доноров (таблица 9). Инкубация активированных CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов здоровых доноров с МР (10.60-85.30 мг) сопровождалась увеличением количества CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ клеток, тогда как добавление максимальной концентрации ГК, напротив, приводило к резкому снижению числа CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺-лимфоцитов в культурах здоровых доноров (по сравнению с пробой только с добавлением активатора) (p<0.05) (таблица 9).

Число CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ клеток в интактных CD3⁺-CD45RO⁺ культурах больных РА было равным 7.52 (6.51-8.95)%, соответственно (таблица 9). При культивировании CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов в присутствии активатора, количество CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ увеличивалось, в среднем, в 2 раза (по сравнению с интактными цифрами) (таблица 9). Инкубация Т-клеток, полученных у больных РА с Dex (32.00 – 64.00 мг) способствовала (p<0.01) росту числа CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ клеток в CD3⁺CD45RO⁺ культурах, полученных у больных РА (по сравнению с пробой только с добавлением активатора) (таблица 9).

МР (весь диапазон концентраций) в сочетании с активатором индуцировал достоверное равномерное повышение (p<0.01) количества CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺

лимфоцитов, по сравнению с пробами с добавлением только анти-CD2/CD3/CD28 – комплекса. Эффекты МР не носили дозозависимого характера (таблица 9).

Таблица 9. Содержание CD4⁺CD28⁻CD95⁺HLA-DR⁺ клеток (%) в культурах CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов в условиях инкубации *in vitro* с Т-клеточным активатором (Ac/Exp) и разными концентрациями синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, Dex и метилпреднизолона, МР) у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом (Me (Q1 - Q3))

Варианты культивирования		Количество CD4 ⁺ CD28 ⁻ CD95 ⁺ HLA-DR ⁺ клеток, %	
		Здоровые доноры	Больные РА
Без активации		4.94 (3.95-5.79)	7.52 (6.51-8.95) [◇]
Ac/Exp		11.36 (9.08-13.33) p ₀ <0.01	14.12 (12.83-15.91) p ₀ <0.01
Ac/Exp + Dex (мг)	2.00	11.48 (9.71-13.47)	13.64 (11.96-16.00)
	8.00	12.38 (9.89-14.53)	14.21 (13.06-17.39)
	16.00	13.98 (11.17-16.40)	14.60 (13.79-17.15)
	32.00	9.36 (8.28-12.16) p ₁ <0.01 p ₃ <0.05 p ₄ <0.01	16.06 (14.52-18.20) [◇] p ₁ <0.01 p ₂ <0.01
	64.00	8.74 (6.98-10.28) p ₁ <0.05 p ₂ <0.01 p ₃ <0.05 p ₄ <0.01	15.37 (14.66-16.29) [◇] p ₁ <0.05 p ₂ <0.01
Ac/Exp + МР (мг)	10.60	12.04 (9.62-14.13)	27.54 (25.03-31.03) [◇] p ₁ <0.01
	21.30	12.36 (9.74-14.35)	26.54 (24.12-29.90) [◇] p ₁ <0.01 p ₂ <0.01
	42.60	12.50 (9.99-14.67)	24.88 (22.61-28.03) [◇] p ₁ <0.01 p ₂ <0.01
	85.30	12.84 (10.26-14.19)	29.49 (26.81-33.22) [◇] p ₁ <0.01 p ₄ <0.01
	170.70	4.80 (3.83-5.63) p ₁ <0.01 p ₂ <0.05 p ₃ <0.01 p ₄ <0.05 p ₅ <0.05	19.76 (17.96-22.27) [◇] p ₁ <0.01 p ₂ <0.01 p ₄ <0.01 p ₅ <0,01

3.2.6. Оценка эффектов синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, метилпреднизолона) на изменение числа CD3⁺CD4⁺CD28⁻CD95⁺HLA-DR⁺CD45RO⁻ в культурах TCR - активированных CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом

Содержание CD4⁺CD28⁻CD95⁺HLA-DR⁺CD45RO⁻ (далее, T_{EMRA}) лимфоцитов в интактных культурах CD3⁺CD45RO⁺ клеток здоровых доноров в конце периода инкубации (48ч) составило 2.50 (2.07-3.09)%. Культивирование CD3⁺CD45RO⁺ клеток здоровых доноров в присутствии активатора сопровождалось увеличением данного показателя в 2.5 раза (p<0.01) (таблица 10).

Добавление Dex (весь диапазон исследуемых концентраций) в культуральную среду, на фоне действия активатора, приводило к росту (по сравнению с пробой только с добавлением активатора) количества CD4⁺CD28⁻CD95⁺HLA-DR⁺CD45RO⁻ лимфоцитов в CD3⁺CD45RO⁺ пробах Т-клеток здоровых доноров (r² = 0.536; p<0.05) (таблица 10). Инкубация TCR-активированных CD3⁺CD45RO⁺ лимфоцитов, полученных у здоровых доноров в присутствии МР также сопровождалась дозозависимым увеличением относительного числа T_{EMRA} Т-клеток (r² = 0.556; p<0.05) (таблица 10).

После инкубации (48 ч) число T_{EMRA} клеток в интактных культурах CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов больных РА составило 5.59 (4.46-6.82)%; добавление в культуры CD3⁺CD45RO⁺ клеток активационных частиц приводило к достоверному увеличению исследуемого показателя (таблица 10). Культивирование TCR-активированных CD3⁺CD45RO⁺ клеток с Dex приводило к дозозависимому увеличению количества T_{EMRA} Т-клеток в пробах больных РА (r² = 0.767; p<0.05) (таблица 10). МР также способствовал дозозависимому росту (по сравнению с пробой только с добавлением активатора) числа CD4⁺CD28⁻CD95⁺HLA-DR⁺CD45RO⁻ Т-лимфоцитов в CD3⁺CD45RO⁺ культурах больных РА (r² = 0.785; p<0.05) (таблица 10).

Таблица 10. Содержание CD4⁺CD28⁻CD95⁺HLA-DR⁺CD45RO⁻ клеток (%) в культурах CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов в условиях инкубации *in vitro* с Т-клеточным активатором (Ac/Exp) и разными концентрациями синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, Dex и метилпреднизолона, МР) у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом (Me (Q1 - Q3))

Варианты культивирования		Количество CD4 ⁺ CD28 ⁻ CD95 ⁺ HLA-DR ⁺ CD45RO ⁻ клеток, %	
		Здоровые доноры	Больные РА
Без активации		2.50 (2.07-3.09)	5.59 (4.46-6.82) [◇]
Ac/Exp		6.48 (5.96-7.15) p ₀ <0.01	8.70 (8.37-8.75) [◇] p ₀ <0.01
Ac/Exp + Dex	2.00	6.92 (6.46-7.32)	9.87 (9.56-10.04) [◇]

(мг)			$p_1 < 0.05$
	8.00	7.15 (6.63-7.75) $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$	11.54 (11.18-12.25) [◇] $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$
	16.00	7.95 (7.44-8.50) $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$	14.15 (13.62-14.98) [◇] $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.05$
	32.00	9.13 (8.91-9.55) $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.05$	16.26 (15.54-16.93) [◇] $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.05$ $p_4 < 0.05$
	64.00	10.75 (9.60-12.31) $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.01$ $p_4 < 0.05$	19.25 (17.57-20.73) [◇] $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.01$ $p_4 < 0.05$ $p_5 < 0.01$
Ac/Exp + MP (мг)	10.60	7.75 (7.68-8.99) $p_1 < 0.05$	10.76 (10.54-10.93) [◇] $p_1 < 0.05$
	21.30	8.74 (8.55-9.05) $p_1 < 0.05$	12.30 (11.72-12.98) [◇] $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$
	42.60	9.57 (9.37-9.78) $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$	15.89 (15.37-17.00) [◇] $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.05$
	85.30	13.54 (13.35-13.59) $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.05$ $p_4 < 0.05$	20.08 (19.52-21.03) [◇] $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.01$ $p_3 < 0.05$ $p_4 < 0.05$
	170.70	14.13 (13.36-14.71) $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.01$ $p_3 < 0.01$ $p_4 < 0.05$	23.25 (21.91-24.49) [◇] $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.05$ $p_4 < 0.01$ $p_5 < 0.05$

3.3. Оценка эффектов синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, метилпреднизолона) на продукцию провоспалительных медиаторов (IL-2, IFN- γ , IL-17, IL-21, TNF- α) TCR - активированными CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитами у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом

3.3.1. Продукция IL-2

Уровень IL-2 в интактных культурах CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов здоровых доноров (48 ч инкубации) был равным 88.14 (79.05-89.84) пг/мл. Добавление активационных частиц способствовало повышению содержания IL-2 в

супернатантах клеточных культур здоровых доноров, в среднем, в 8 раз (таблица 11).

Инкубация с активатором и Dex (16.00-64.00 мг) приводила к достоверному снижению ($p < 0.01$) уровня секреции IL-2 CD3⁺CD45RO⁺ культурами здоровых доноров (по сравнению с пробой только с добавлением активатора). МР аналогичным образом, способствовал дозозависимому снижению исследуемого показателя ($r^2 = -0.684$; $p < 0.05$) в культурах Т-клеток, полученных у здоровых доноров (таблица 11).

В супернатантах интактных проб Т-клеток, полученных у больных РА, концентрация IL-2 составила 61.84 (61.04-63.79) пг/мл. TCR-активация клеток приводила к увеличению данного показателя, в среднем, в 7 раз (таблица 11). Добавление Dex и МР способствовало дозозависимому угнетению ($p < 0.01$) секреции TCR-активированными CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитами IL-2 ($r^2 = -0.616$ и $r^2 = -0.478$, $p < 0.05$, соответственно) (таблица 11).

Таблица 11. Количество IL-2 (пг/мл) в супернатантах CD3⁺CD45RO⁺ культур лимфоцитов, в условиях инкубации *in vitro* с Т-клеточным активатором (Ac/Exp) и разными концентрациями синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, Dex и метилпреднизолона, МР) у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом (Me (Q1 - Q3))

Варианты культивирования		Количество IL-2 (пг/мл) в супернатантах CD45RO ⁺ Т - клеточных культур	
		Здоровые доноры	Больные РА
Без активации		88.14 (79.05-89.84)	61.84 (61.04-63.79) [◇]
Ac/Exp		741.30 (672.95-869.30) $p_0 < 0.01$	421.55 (396.60-430.96) [◇] $p_0 < 0.01$
Ac/Exp + Dex (мг)	2.00	720.30 (675.80-803.63)	281.03 (264.40-287.31) [◇] $p_1 < 0.01$
	8.00	765.30 (692.78-786.03)	135.98 (127.94-139.02) [◇] $p_1 < 0.01$ $p_2 < 0.01$
	16.00	680.35 (655.80-765.45) $p_1 < 0.05$	102.07 (96.03-104.35) [◇] $p_1 < 0.01$ $p_2 < 0.01$ $p_3 < 0.01$
	32.00	550.40 (485.33-597.90) $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.01$ $p_4 < 0.05$	77.35 (72.77-79.07) [◇] $p_1 < 0.01$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.05$ $p_4 < 0.01$
	64.00	410.80 (305.53-446.78) $p_1 < 0.01$ $p_2 < 0.01$	57.59 (54.18-58.87) [◇] $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.01$

		$p_3 < 0.05$ $p_4 < 0.05$ $p_5 < 0.01$	$p_3 < 0.05$ $p_4 < 0.05$ $p_5 < 0.05$
Ac/Exp + MP (мг)	10.60	733.97 (666.29-866.69) $p_1 < 0.01$	169.98 (159.92-173.78) [◇] $p_1 < 0.01$
	21.30	726.77 (659.76-852.25) $p_1 < 0.01$	142.90 (134.44-146.09) [◇] $p_1 < 0.01$ $p_2 < 0.01$
	42.60	537.18 (487.65-629.93) $p_1 < 0.01$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.01$	120.10 (112.99-122.78) [◇] $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.01$ $p_3 < 0.01$
	85.30	392.23 (356.06-439.95) $p_1 < 0.01$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.05$ $p_4 < 0.05$	101.58 (95.57-103.85) [◇] $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.01$ $p_3 < 0.05$ $p_4 < 0.01$
	170.70	353.00 (320.45-413.95) $p_1 < 0.01$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.05$ $p_4 < 0.05$ $p_5 < 0.05$	86.21 (81.11-88.13) [◇] $p_1 < 0.01$ $p_2 < 0.01$ $p_3 < 0.05$ $p_4 < 0.05$ $p_5 < 0.01$

3.3.2. Продукция IFN- γ

Содержание IFN- γ в интактных культурах CD3⁺CD45RO⁺ Т-клеток здоровых доноров составляло 18.66 (16.92-20.95) пг/мл. Данный показатель возрастал почти в 20 раз при добавлении в культуры Т-лимфоцитов активатора (таблица 12).

Инкубация TCR-активированных CD3⁺CD45RO⁺ Т-клеток, полученных у здоровых доноров с Dex сопровождалось дозозависимым снижением ($p < 0.01$) уровня IFN- γ в супернатантах клеточных культур ($r^2 = - 0.536$, $p < 0.05$) (таблица 12).

Добавление MP (весь спектр исследуемых концентраций) в культуры здоровых доноров приводило к резкому снижению секреции IFN- γ ($p < 0.01$) (таблица 12).

После окончания срока инкубации (48 ч) содержание IFN- γ в супернатантах интактных проб CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов больных РА было равным 25.32 (24.42-28.13) пг/мл. Концентрация IFN- γ в супернатантах клеточных культур больных РА значительно возрастала (почти в 25 раз, $p < 0.01$) при инкубации Т-лимфоцитов с активатором (таблица 12). Эффект Dex на продукцию IFN- γ

CD3⁺CD45RO⁺ Т-клетками больных РА в присутствии активационных частиц, имел супрессивный характер (p<0.01) (таблица 12). Инкубация активированных CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов с МР также сопровождалась снижением содержания IFN-у в супернатантах культур. Угнетающий эффект МР наблюдался во всем спектре исследуемых концентраций (p<0.01) и носил дозозависимый характер (r² = - 0.616; p<0.05).

Таблица 12. Количество IFN-у (пг/мл) в супернатантах CD3⁺CD45RO⁺ культур лимфоцитов, в условиях инкубации *in vitro* с Т-клеточным активатором (Ac/Exp) и разными концентрациями синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, Dex и метилпреднизолона, МР) у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом (Ме (Q1 - Q3))

Варианты культивирования		Количество IFN-у (пг/мл) в супернатантах CD45RO ⁺ Т - клеточных культур	
		Здоровые доноры	Больные РА
Без активации		18.66 (16.92-20.95)	25.32 (24.42-28.13) [◇]
Ac/Exp		365.32 (332.07-400.30) p ₀ <0.01	632.88 (610.50-703.13) [◇] p ₀ <0.01
Ac/Exp + Dex (мг)	2.00	341.48 (335.30-373.35) p ₁ <0.01	540.92 (512.79-600.97) [◇] p ₁ <0.01
	8.00	319.88 (312.58-343.13) p ₁ <0.01 p ₂ <0.01	349.66 (337.29-388.47) p ₁ <0.01 p ₂ <0.01
	16.00	311.62 (298.71-321.31) p ₁ <0.01 p ₂ <0.05	405.69 (391.35-450.72) [◇] p ₁ <0.01 p ₂ <0.05 p ₃ <0.05
	32.00	303.37 (278.39-315.12) p ₁ <0.05 p ₂ <0.05 p ₃ <0.01 p ₄ <0.01	381.25 (367.78-423.57) [◇] p ₁ <0.05 p ₂ <0.05 p ₃ <0.05 p ₄ <0.01
	64.00	281.43 (266.72-293.58) p ₁ <0.01 p ₂ <0.01 p ₃ <0.05 p ₄ <0.05 p ₅ <0.05	314.86 (303.73-349.81) [◇] p ₁ <0.01 p ₂ <0.01 p ₃ <0.01 p ₄ <0.01 p ₅ <0.01
Ac/Exp + МР (мг)	10.60	68.25 (65.00-78.75) p ₁ <0.01	439.50 (423.96-488.28) [◇] p ₁ <0.01
	21.30	61.31 (58.34-68.01) p ₁ <0.01	218.23 (210.52-242.46) [◇] p ₁ <0.05 p ₂ <0.01
	42.60	57.88 (55.07-64.95) p ₁ <0.01 p ₂ <0.01	200.92 (193.81-223.22) [◇] p ₁ <0.05 p ₂ <0.05 p ₃ <0.01
	85.30	57.48 (54.69-64.95)	146.17 (140.99-162.39) [◇]

		$p_1 < 0.01$ $p_2 < 0.01$	$p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.01$ $p_3 < 0.05$ $p_4 < 0.01$
	170.70	59.98 (57.07-67.31) $p_1 < 0.01$ $p_2 < 0.01$	70.24 (67.76-78.04) [◇] $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.05$ $p_4 < 0.05$ $p_5 < 0.01$

3.3.3. Продукция ИЛ-17

Содержание ИЛ-17 в интактных пробах CD3⁺CD45RO⁺ Т-клеток здоровых доноров после 48 ч культивации составляло, в среднем 2.90 (2.38-3.18) пг/мл. Культивирование клеток с Ас/Exp способствовало увеличению данного показателя по сравнению с интактными значениями (в 6 раз) (таблица 13).

Инкубация TCR-активированных Т-клеток памяти с ГК (Dex и MP) способствовала дозозависимому снижению ($p < 0.01$) уровня ИЛ-17 в супернатантах культур здоровых доноров ($r^2 = -0.672$ и $r^2 = -0.415$, $p < 0.05$, соответственно) (таблица 13). В супернатантах интактных проб CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов больных РА содержание ИЛ-17 составило 1.93 (1.58-2.11) пг/мл (таблица 13). TCR-активация способствовала увеличению исследуемого показателя (в 28 раз) по сравнению с базальным уровнем ($p < 0.01$) (таблица 13).

Добавление активатора и Dex (2.00-16.00 мг) в культуры CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов больных РА не влияло на содержание ИЛ-17 в клеточных супернатантах (таблица 13), тогда как рост концентрации ГК (32.00-64.00 мг) в культуральной среде способствовал достоверному снижению исследуемого показателя в культурах больных РА (таблица 13). MP дозозависимым образом ($r^2 = -0.512$, $p < 0.05$) угнетал секрецию ИЛ-17 CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитами, полученными у больных РА (таблица 13).

Таблица 13. Количество ИЛ-17 (пг/мл) в супернатантах CD3⁺CD45RO⁺ культур лимфоцитов, в условиях инкубации *in vitro* с Т-клеточным активатором (Ас/Exp) и разными концентрациями синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, Dex и метилпреднизолона, MP) у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом (Me (Q1 - Q3))

Варианты культивирования	Количество ИЛ-17 (пг/мл) в супернатантах CD45RO ⁺ Т - клеточных культур
---------------------------------	--

		Здоровые доноры	Больные РА
Без активации		2.90 (2.38-3.18)	1.93 (1.58-2.11) [◇]
Ac/Exp		17.98 (14.76-19.73) p ₀ <0.01	54.04 (44.31-59.08) [◇] p ₀ <0.01
Ac/Exp + Dex (мг)	2.00	19.78 (16.23-21.70) p ₁ <0.01	48.60 (41.65-52.20) [◇]
	8.00	16,21 (13.30-17.79) p ₂ <0.05	49.78 (47.93-56.93) [◇]
	16.00	11.24 (9.22-13.33) p ₁ <0.05 p ₂ <0.05 p ₃ <0.01	49.52 (45.94-57.92) [◇]
	32.00	3.28 (1.74-3.78) p ₁ <0.01 p ₂ <0.05 p ₃ <0.05 p ₄ <0.01	43.36 (37.35-56.47) [◇] p ₁ <0.01 p ₂ <0.01 p ₃ <0.01 p ₄ <0.01
	64.00	1.77 (0.32-2.55) p ₁ <0.01 p ₂ <0.05 p ₃ <0.01 p ₄ <0.05 p ₅ <0.05	42.82 (34.89-43.19) [◇] p ₁ <0.01 p ₃ <0.01
Ac/Exp + MP (мг)	10.60	16.50 (13.54-18.10) p ₁ <0.01	42.89 (35.17-46.89) [◇] p ₁ <0.01
	21.30	16.35 (13.66-18.03) p ₁ <0.01	38.88 (31.88-42.50) [◇] p ₁ <0.01 p ₂ <0.01
	42.60	14.86 (12.20-16.31) p ₁ <0.01 p ₂ <0.05 p ₃ <0.01	29.69 (24.35-32.46) [◇] p ₁ <0.01 p ₂ <0.01 p ₃ <0.01
	85.30	13.62 (11.18-14.95) p ₁ <0.01 p ₂ <0.05 p ₃ <0.01	24.34 (19.96-26.61) [◇] p ₁ <0.01 p ₂ <0.01 p ₃ <0.01 p ₄ <0.01
	170.70	12.40 (10.18-13.61) p ₁ <0.01 p ₂ <0.05 p ₃ <0.05 p ₄ <0.05	21.53 (17.65-23.54) [◇] p ₁ <0.01 p ₂ <0.01 p ₃ <0.01 p ₄ <0.01 p ₅ <0.01

3.3.4. Продукция ИЛ-21

Содержание провоспалительного цитокина ИЛ-21 в супернатантах интактных CD3⁺CD45RO⁺ культур здоровых доноров было равным 1.20 (0.00-1.23) пг/мл. Секретция ИЛ-21 CD3⁺CD45RO⁺ Т-клетками здоровых доноров увеличивалась в процессе их TCR-активации (в 6 раз по сравнению с его первоначальным уровнем) (p<0.01) (таблица 14).

Добавление к активированным CD3⁺CD45RO⁺ лимфоцитам здоровых доноров ГК (Dex и MP, весь спектр концентраций ГК), сопровождалось дозозависимым снижением уровня IL-21 в клеточных супернатантах (p<0.01) (r²=0.565 и r²=-0.728, p<0.05, соответственно) (таблица 14).

Содержание IL-21 в супернатантах интактных CD3⁺CD45RO⁺ клеточных культур больных РА составило 1.40 (1.37-1.60) пг/мл (таблица 14), значительно возрастая при TCR-активации (в среднем, в 10 раз) (таблица 14). Культивирование CD3⁺CD45RO⁺ Т-клеток с активационными частицами и Dex не выявило изменения концентрации IL-21 в клеточных супернатантах больных РА (таблица 14). Достоверное понижение уровня секреции IL-21 (p<0.05) активированными CD3⁺CD45RO⁺ лимфоцитами больных РА регистрировалось только при добавлении высоких концентраций MP (42.60-170.70 мг) в культуральную среду (таблица 14).

Таблица 14. Количество IL-21 (пг/мл) в супернатантах CD3⁺CD45RO⁺ культур лимфоцитов, в условиях инкубации *in vitro* с Т-клеточным активатором (Ac/Exp) и разными концентрациями синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, Dex и метилпреднизолона, MP) у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом (Me (Q1 - Q3))

Варианты культивирования		Количество IL-21 (пг/мл) в супернатантах CD45RO ⁺ Т - клеточных культур	
		Здоровые доноры	Больные РА
Без активации		1.20 (0.00-1.23)	1.40 (1.37-1.60) [◇]
Ac/Exp		7.11 (5.11-7.20) p ₀ <0.01	13.97 (13.67-15.97) [◇] p ₀ <0.05
Ac/Exp + Dex (мг)	2.00	6.45 (4.65-6.55)	12.45 (11.21-13.09) [◇]
	8.00	5.46 (3.93-5.54) p ₁ <0.01	11.92 (11.00-12.57) [◇]
	16.00	5.38 (3.87-5.45) p ₁ <0.01	12.75 (11.50-13.43) [◇]
	32.00	4.73 (3.41-4.80) p ₁ <0.01 p ₃ <0.01	11.03 (10.79-12.60) [◇]
	64.00	4.39 (3.19-4.44) p ₁ <0.01 p ₂ <0.01	12.94 (11.69-13.65) [◇]
Ac/Exp + MP (мг)	10.60	2.35 (2.18-2.54) p ₁ <0.05	11.00 (10.77-12.57) [◇]
	21.30	2.20 (2.04-2.38) p ₁ <0.05	12.83 (11.60-16.38) [◇]
	42.60	2.05 (1.90-2.22)	11.21 (10.82-15.30) [◇]

		$p_1 < 0.05$	
	85.30	1.94 (1.79-2.09) $p_1 < 0.05$	8.22 (8.04-9.39) [◊] $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.05$ $p_4 < 0.05$
	170.70	1.87 (1.81-2.11) $p_1 < 0.05$	7.72 (7.55-8.82) [◊] $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.05$ $p_4 < 0.05$

3.3.5. Продукция TNF- α

Уровень TNF- α в супернатантах интактных CD3⁺CD45RO⁺ культур Т-клеток здоровых доноров (через 48 ч), составил 44.38 (38.22-51.29) пг/мл (таблица 15). Активация способствовала росту исследуемого параметра в 6 раз ($p < 0.01$), по сравнению с не активированными пробами (таблица 15).

Добавление к TCR-активированным CD3⁺CD45RO⁺ культурам Т-клеток Dex (весь ряд концентраций), сопровождалось резким снижением уровня TNF- α в супернатантах проб, полученных у здоровых доноров ($p < 0.01$) (таблица 15). Инкубация активированных CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов, полученных у здоровых доноров с МР, сопровождалась снижением уровня TNF- α в супернатантах культуральных образцов (по сравнению с пробой только с добавлением активатора) ($p < 0.05$). Данный эффект имел дозозависимый характер ($r^2 = -0.670$, $p < 0.05$) (таблица 15).

Уровень TNF- α в супернатантах интактных CD3⁺CD45RO⁺ клеточных культур больных РА составил 55.89 (48.39-61.29) пг/мл (таблица 15), возрастая в 20 раз при добавлении к культуре клеток анти- CD2/CD3/CD28-комплекса ($p < 0.01$). Dex, не зависимо от тестируемой концентрации, оказывал супрессорный эффект ($p < 0.01$) на продукцию Т-клетками больных РА TNF- α (таблица 15). Культивирование TCR-активированных CD3⁺CD45RO⁺ лимфоцитов с МР приводило к дозозависимому снижению ($p < 0.05$) концентрации TNF- α в клеточных супернатантах ($r^2 = -0.530$, $p < 0.05$) (таблица 15).

Таблица 15. Количество TNF- α (пг/мл) супернатантах CD3⁺CD45RO⁺ культур лимфоцитов в условиях инкубации *in vitro* с Т-клеточным активатором (Ac/Exp) и разными концентрациями синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, Dex и

метилпреднизолона, МР) у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом (Ме (Q1 - Q3))

Варианты культивирования		Количество TNF-α (пг/мл) в супернатантах CD45RO ⁺ T - клеточных культур	
		Здоровые доноры	Больные РА
Без активации		44.38 (38.22-51.29)	55.89 (48.39-61.29) [◇]
Ac/Exp		279.59 (240.79-323.13) p ₀ <0.01	1100.70 (885.05-1120.99) [◇] p ₀ <0.05
Ac/Exp + Dex (мг)	2.00	93.20 (80.26-115.20) p ₁ <0.01	163.79 (131.70-166.81) [◇] p ₁ <0.01
	8.00	50.84 (50.39-58.75) p ₁ <0.01 p ₂ <0.01	118.23 (95.06-120.41) [◇] p ₁ <0.01 p ₂ <0.01
	16.00	55.48 (47.78-64.11) p ₁ <0.05 p ₂ <0.01	121.79 (97.93-124.03) [◇] p ₁ <0.01 p ₂ <0.01
	32.00	41.12 (35.41-47.52) p ₁ <0.01 p ₂ <0.05 p ₃ <0.05 p ₄ <0.05	128.89 (103.64-131.26) [◇] p ₁ <0.01 p ₂ <0.05
	64.00	31.42 (27.05-36.31) p ₁ <0.05 p ₂ <0.01 p ₃ <0.05 p ₄ <0.01 p ₅ <0.05	105.48 (84.82-107.43) [◇] p ₁ <0.01 p ₂ <0.05 p ₄ <0.01 p ₅ <0.01
Ac/Exp + МР (мг)	10.60	279.82 (189.32-288.74) p ₁ <0.05	201.96 (162.40-205.69) p ₁ <0.05
	21.30	151.03 (102.19-155.85) p ₁ <0.05 p ₂ <0.05	104.23 (83.81-106.15) p ₁ <0.05 p ₂ <0.05
	42.60	123.20 (83.35-127.12) p ₁ <0.05 p ₂ <0.01 p ₃ <0.05	50.05 (40.25-50.98) [◇] p ₁ <0.05 p ₂ <0.01 p ₃ <0.05
	85.30	106.17 (71.83-109.55) p ₁ <0.05 p ₂ <0.01 p ₃ <0.05 p ₄ <0.01	43.44 (34.93-44.24) [◇] p ₁ <0.05 p ₂ <0.01 p ₃ <0.05 p ₄ <0.01
	170.70	72.34 (48.94-74.64) p ₁ <0.05 p ₂ <0.01 p ₃ <0.01 p ₄ <0.05 p ₅ <0.05	28.09 (22.59-28.61) [◇] p ₁ <0.05 p ₂ <0.05 p ₃ <0.01 p ₄ <0.05 p ₅ <0.01

3.4. Оценка эффектов синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, метилпреднизолона) на уровень экспрессии мРНК генов провоспалительных медиаторов (IL-2, IFN-γ, IL-17, IL-21, TNF-α) в TCR-активированных

CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитах у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом

3.4.1. Экспрессия мРНК гена IL-2

Активация CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов здоровых доноров приводила к значительному (в 22 раза) возрастанию уровня экспрессии мРНК гена IL-2 (относительно базальной пробы). При инкубации активированных CD3⁺CD45RO⁺ Т-клеток с Dex (2.00-64.00 мг), уровень экспрессии мРНК гена IL-2 значимо снижался (рисунок 21). Культивирование CD3⁺CD45RO⁺ Т-клеток с активатором и MP (весь диапазон концентраций) сопровождалось дозозависимым угнетением уровня экспрессии мРНК гена IL-2 ($r^2 = -0.456$; $p < 0.05$) по сравнению с пробами, только с добавлением активатора (рисунок 21).

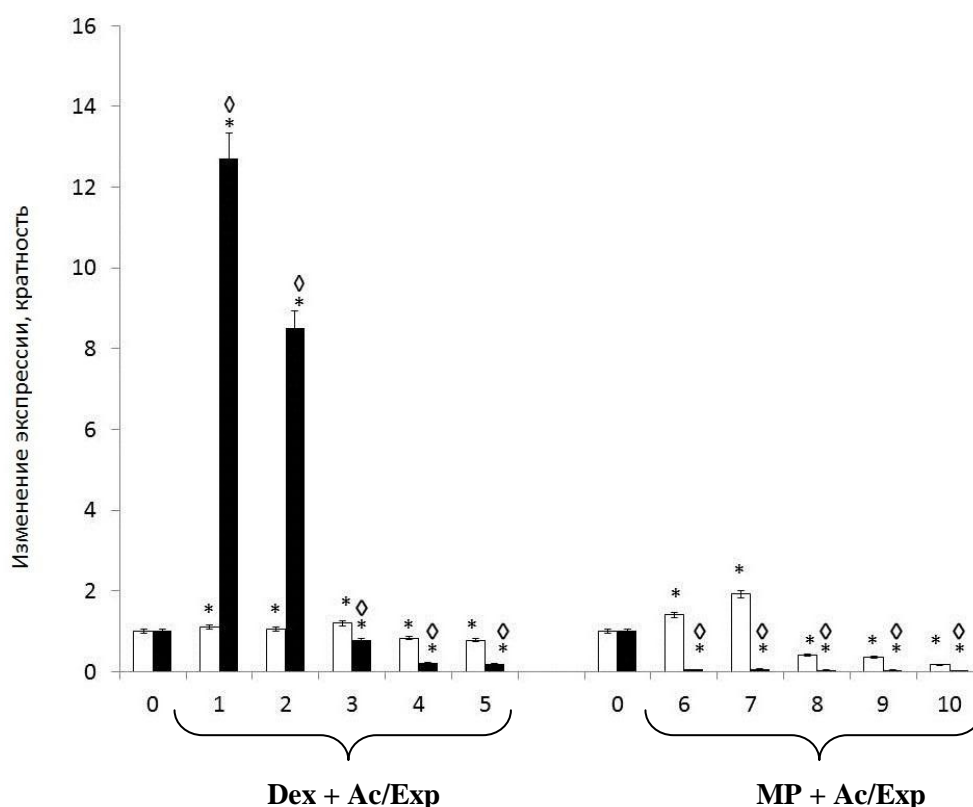


Рисунок 21. Изменение относительного уровня транскрипции мРНК гена *IL-2* в CD3⁺CD45RO⁺ Т-клетках в условиях инкубации *in vitro* с Т-клеточным активатором (Ac/Exp) и разными концентрациями синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, Dex и метилпреднизолон, MP) у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом (кратность).

Примечание: здесь в след. рисунках:

0 - kont/exp – отношение уровня экспрессии мРНК исследуемых генов в контрольных образцах (без воздействия) и пробах с Т-клеточным активатором (exp); 1 – 5 - exp/Dex - отношение уровня экспрессии мРНК исследуемых генов в образцах с Т-клеточным активатором (exp) относительно разных концентраций дексаметазона (Dex) (2.00-64.00 мг) (кратность); 6 – 10 - exp/MP - отношение уровня экспрессии мРНК исследуемых генов в образцах с Т-клеточным активатором (exp) относительно разных концентраций метилпреднизолона (MP) (10.60-170.70 мг) (кратность).

□ – группа здоровых доноров;

■ – группа больных ревматоидным артритом;

* - $p < 0.05$ – достоверность различий по сравнению с Т-клетками, культивируемыми с активационными частицами;

◇ - $p < 0.05$ - достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров.

Активация $\text{CD3}^+\text{CD45RO}^+$ Т-клеток, полученных у больных РА, сопровождалась возрастанием (в 4.03 раза) в них уровня экспрессии мРНК гена IL-2, относительно интактной пробы (рисунок 21). Инкубация активированных $\text{CD3}^+\text{CD45RO}^+$ Т-лимфоцитов с ГК (Dex и MP) способствовала дозозависимому снижению ($r^2 = -0.616$ и $r^2 = -0.623$, $p < 0.05$) уровня экспрессии мРНК гена IL-2 в Т-клетках больных РА, по сравнению с пробами только с добавлением активатора (рисунок 21).

3.4.2. Экспрессия мРНК гена IFN- γ

Уровень экспрессии мРНК гена IFN- γ в $\text{CD3}^+\text{CD45RO}^+$ Т-клетках здоровых доноров возрастал при активации в 7.22 раза, по сравнению со значениями интактных образцов (рисунок 22).

Культивирование TCR-активированных $\text{CD3}^+\text{CD45RO}^+$ Т-лимфоцитов с ГК (Dex и MP) сопровождалось снижением уровня экспрессии мРНК исследуемого гена, по сравнению с пробами только с добавлением активатора (рисунок 22).

Уровень экспрессии мРНК гена IFN- γ в $\text{CD3}^+\text{CD45RO}^+$ Т-клетках больных РА увеличивался в 10.80 раз после TCR-активации, по сравнению с аналогичными значениями интактных проб (рисунок 22). Добавление Dex (2.00 мг) в культуры $\text{CD3}^+\text{CD45RO}^+$ Т-лимфоцитов на фоне их TCR-стимуляции, приводило к увеличению уровня экспрессии мРНК гена IFN- γ , по сравнению с пробами с добавлением только активатора (рисунок 22).

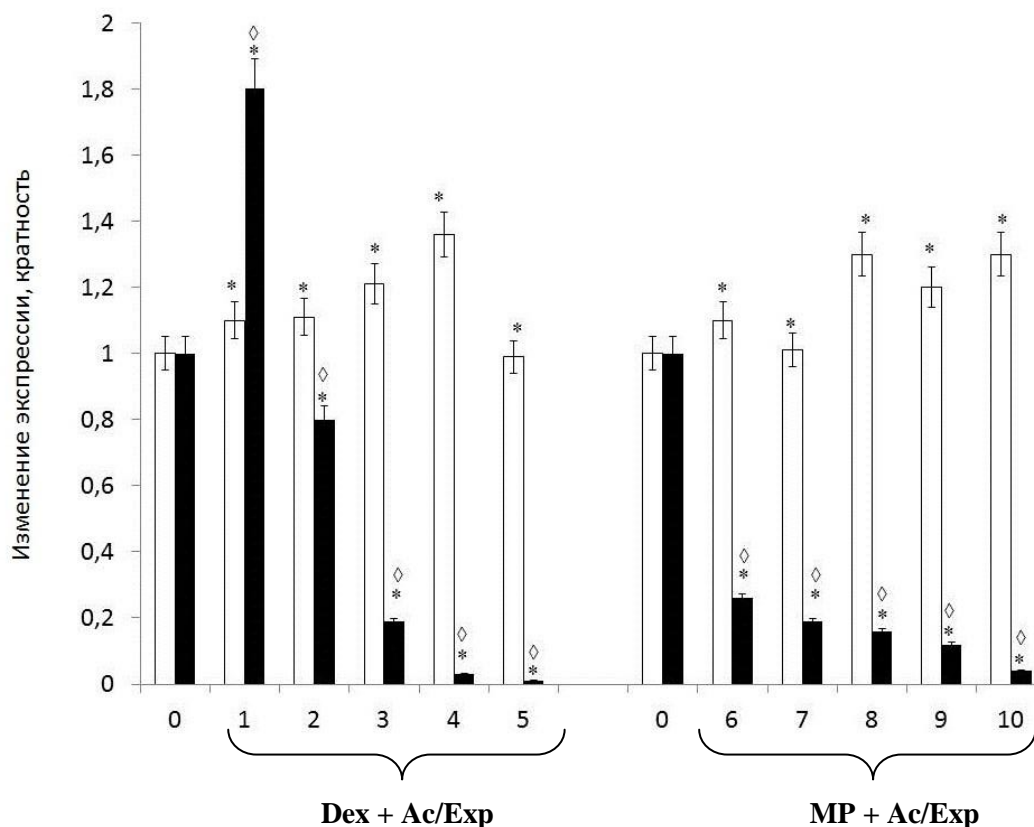


Рисунок 22. Изменение относительного уровня транскрипции мРНК гена *IFN-γ* в $CD3^+CD45RO^+$ Т-клетках в условиях инкубации *in vitro* с Т-клеточным активатором (Ac/Exp) и разными концентрациями синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, Dex и метилпреднизолона, MP) у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом (кратность). Обозначения как в рисунке 21.

Повышение в среде культивирования концентрации Dex (8.00-64.00 мг) способствовало резкому снижению уровня экспрессии гена *IFN-γ* в $CD3^+CD45RO^+$ Т-лимфоцитах, полученных у больных РА. MP также демонстрировал выраженное супрессивное влияние в отношении экспрессии гена *IFN-γ* $CD3^+CD45RO^+$ Т-лимфоцитами больных РА. Его эффекты носили дозозависимый характер (рисунок 22).

3.4.3. Экспрессия мРНК гена *IL-17*

Инкубация $CD3^+CD45RO^+$ Т-лимфоцитов здоровых доноров с комплексом анти-CD2/CD3/CD28 способствовала возрастанию уровня экспрессии мРНК гена *IL-17* (в 5.45 раз), по сравнению с интактными пробами (рисунок 23).

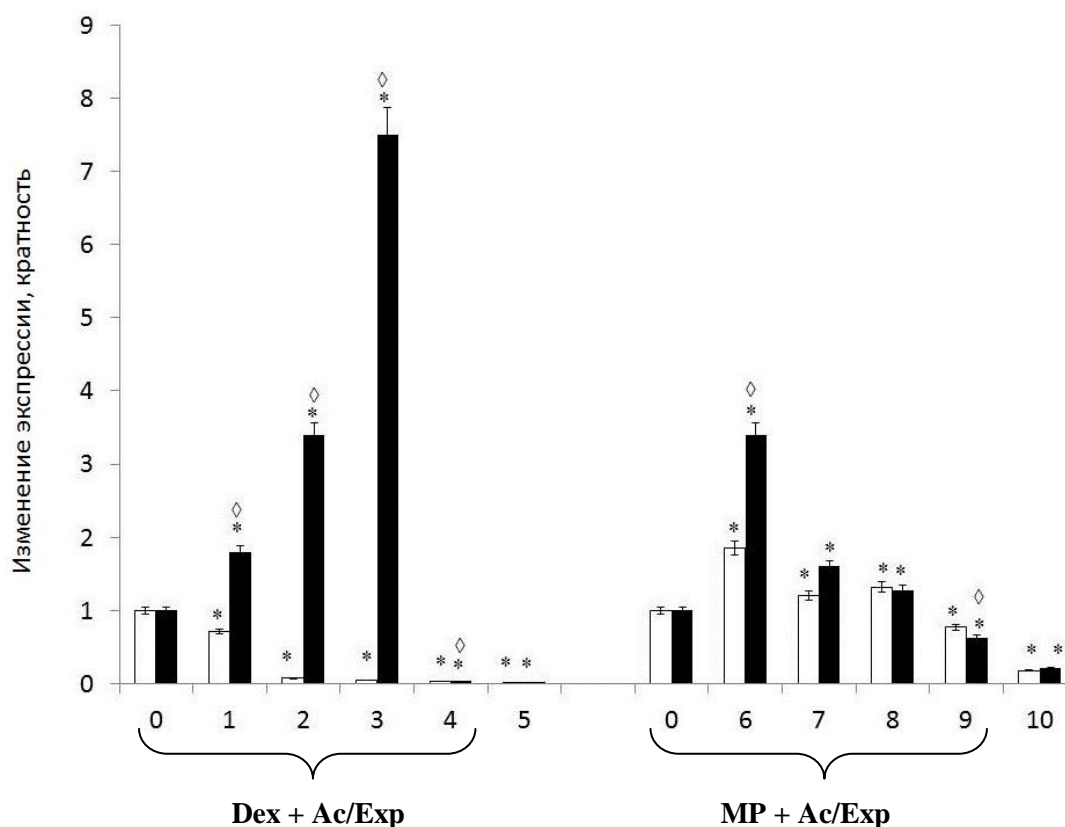


Рисунок 23. Изменение относительного уровня транскрипции мРНК гена *IL-17* в $CD3^+CD45RO^+$ Т-клетках в условиях инкубации *in vitro* с Т-клеточным активатором (Ac/Exp) и разными концентрациями синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, Dex и метилпреднизолонa, MP) у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом (кратность). Обозначения как в **рисунке 21**.

На фоне TCR-активации, инкубация с Dex приводила к дозозависимому снижению уровня экспрессии гена *IL-17* в $CD3^+CD45RO^+$ Т-клетках здоровых доноров (рисунк 23). MP также оказывал супрессивное влияние на изменение изучаемого показателя в культурах клеток, полученных от здоровых доноров (рисунк 23). TCR-активация $CD3^+CD45RO^+$ Т-лимфоцитов больных РА способствовала возрастанию уровня экспрессии мРНК гена *IL-17* (почти в 123 раза), по сравнению с интактными пробами (рисунк 23). Культивирование TCR-активированных культур Т-клеток больных РА с Dex (2.00-16.00 мг) приводило к увеличению уровня экспрессии мРНК гена *IL-17* в $CD3^+CD45RO^+$ Т-лимфоцитах больных РА, тогда как увеличение дозы ГК (32.00-64.00 мг), способствовало снижению исследуемого показателя по сравнению с пробами с добавлением только активатора. Аналогичные закономерности прослеживались в отношении действия MP на $CD3^+CD45RO^+$ культуры Т-лимфоцитов больных РА (рисунк 23).

3.4.4. Экспрессия мРНК гена IL-21

Уровень относительной экспрессии мРНК гена IL-21 в TCR-активированных Т-клетках здоровых доноров увеличивался в 2.30 раза, по сравнению с базальной пробой (рисунок 24).

Добавление ГК (Dex и MP) в TCR-активированные культуры сопровождалось относительно равномерным снижением уровня экспрессии мРНК гена IL-21 в CD3⁺CD45RO⁺ Т-клетках здоровых доноров (рисунок 24).

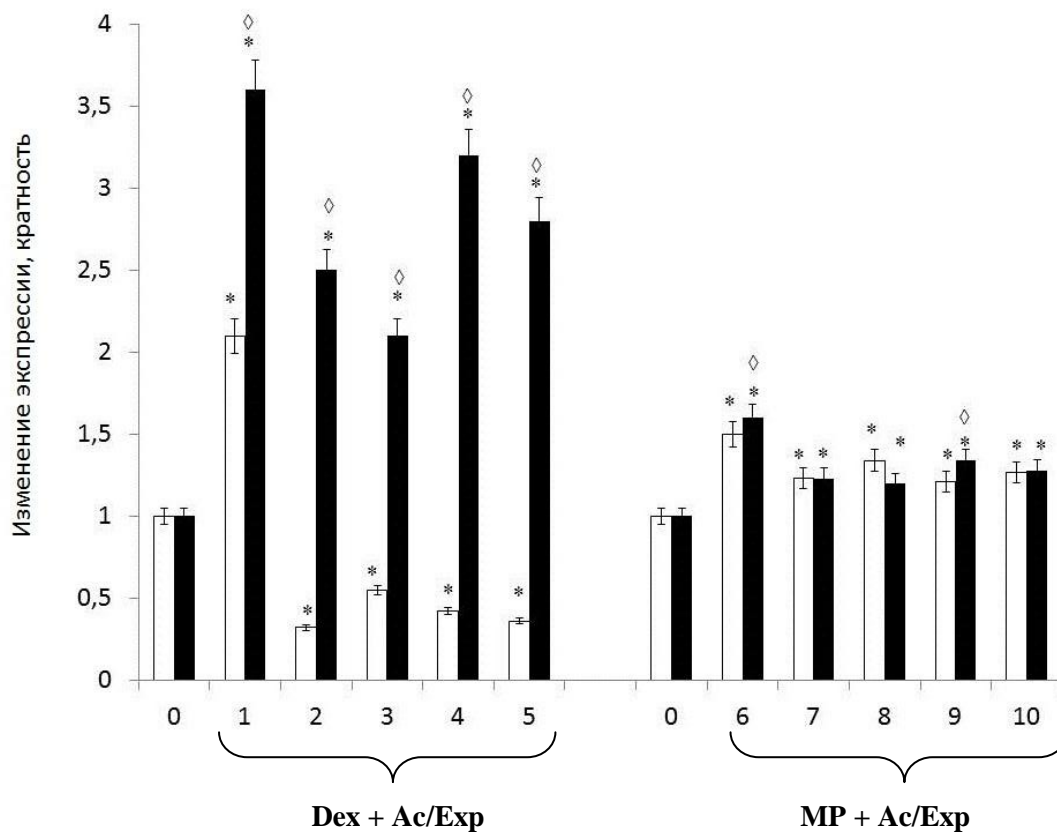


Рисунок 24. Изменение относительного уровня транскрипции мРНК гена *IL-21* в CD3⁺CD45RO⁺ Т-клетках в условиях инкубации *in vitro* с Т-клеточным активатором (Ac/Exp) и разными концентрациями синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, Dex и метилпреднизолона, MP) у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом (кратность). Обозначения как в **рисунке 21**.

Уровень относительной экспрессии мРНК гена IL-21 в CD3⁺CD45RO⁺ Т-клетках больных РА увеличивался в 5.90 раз, по сравнению с интактной пробой (рисунок 24). Одновременное культивирование с активатором и ГК (Dex и MP) сопровождалось однонаправленным повышением (разной степени выраженности)

уровня экспрессии гена мРНК гена IL-21 в CD3⁺CD45RO⁺ Т-клетках больных РА, по сравнению с пробами с добавлением только активирующих частиц (рисунок 24).

3.4.5. Экспрессия мРНК гена TNF-α

Культивирование CD3⁺CD45RO⁺ Т-клеток здоровых доноров в присутствии анти- CD2/CD3/CD28-комплекса сопровождалось увеличением уровня экспрессии мРНК гена TNF-α в клетках (в среднем, в 6.30 раз), по сравнению с интактной пробой (рисунок 25).

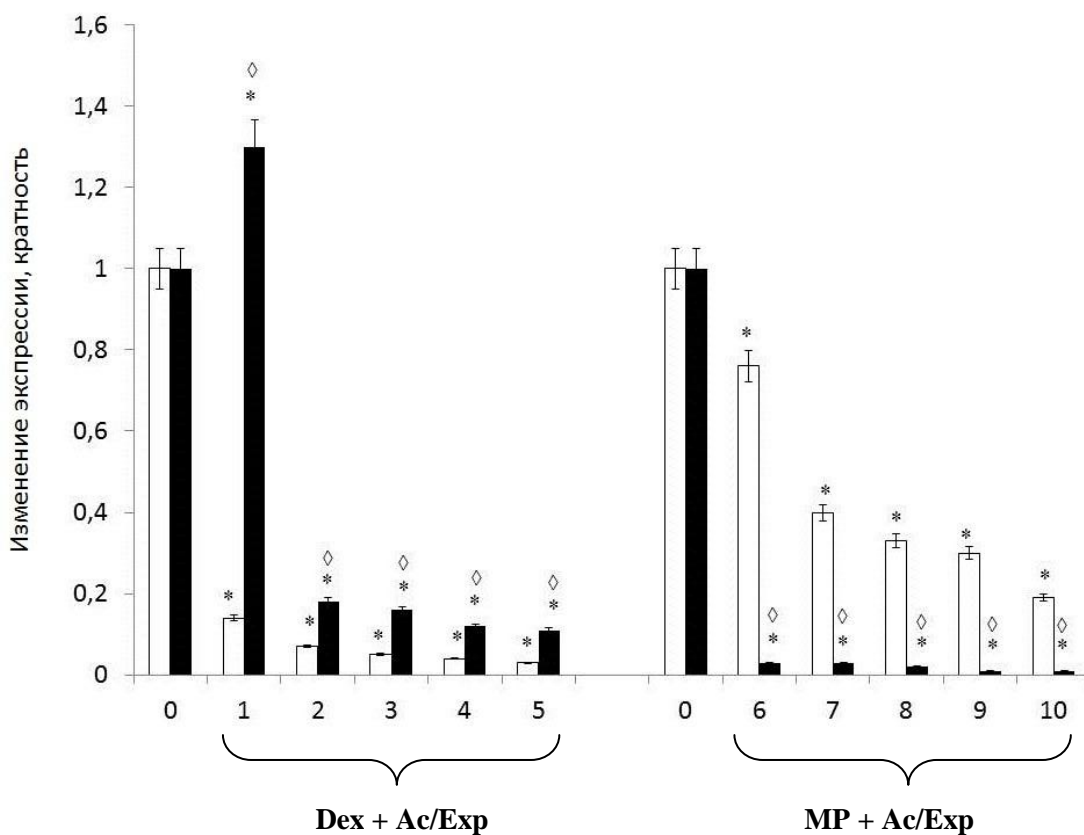


Рисунок 25. Изменение относительного уровня транскрипции мРНК гена *TNF-α* в CD3⁺CD45RO⁺ Т-клетках в условиях инкубации *in vitro* с Т-клеточным активатором (Ac/Exp) и разными концентрациями синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, Dex и метилпреднизолонa, MP) у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом (кратность). Обозначения как в рисунке 21.

Уровень относительной экспрессии мРНК гена TNF-α в CD3⁺CD45RO⁺ Т-клетках резко снижался (относительно проб с добавлением только активирующих частиц) при их культивировании с Dex ($r^2 = -0.791$, $p < 0.05$) и MP ($r^2 = -0.670$, $p < 0.05$).

Культивирование CD3⁺CD45RO⁺ Т-клеток больных РА в присутствии активирующих частиц проводило к увеличению уровня экспрессии мРНК гена

TNF- α в 9.82 раза по сравнению с интактной пробой (рисунок 25). Уровень относительной экспрессии гена TNF- α в CD3⁺CD45RO⁺ Т-клетках больных РА значительно снижался (относительно проб с добавлением только активирующих частиц) при их инкубации в комбинации с активатором и ГК (Dex - $r^2=-0.536$, $p<0.05$ и MP - $r^2 = -0.490$, $p<0.05$, соответственно) (рисунок 25).

3.5. Оценка эффектов синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, метилпреднизолона) на уровень экспрессии мРНК каталитической субъединицы фермента теломеразы (*hTert*) в TCR-активированных CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитах у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом

Культивирование CD3⁺CD45RO⁺ клеток здоровых доноров с активирующими частицами сопровождалось угнетением уровня экспрессии в этих клетках мРНК гена *hTert* (в 3.70 раз, относительно интактных проб) (рисунок 26).

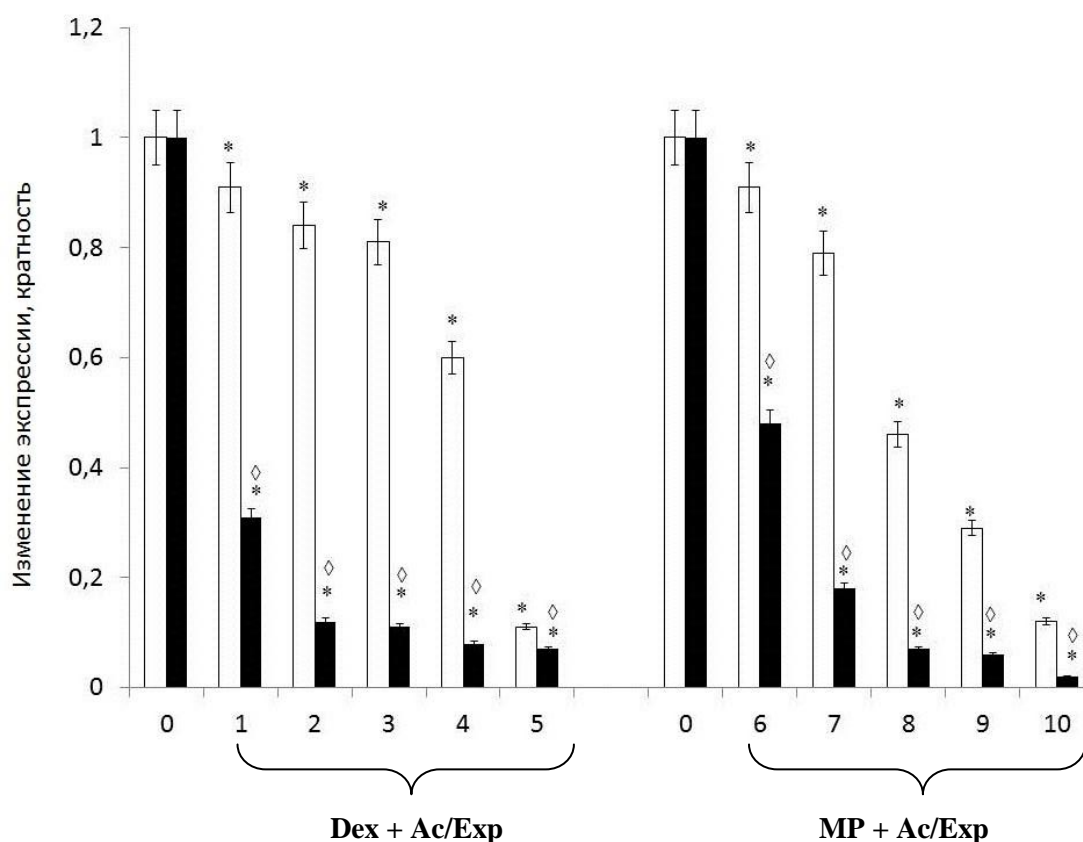


Рисунок 26. Изменение относительного уровня транскрипции мРНК гена *hTert* в CD3⁺CD45RO⁺ Т-клетках в условиях инкубации *in vitro* с Т-клеточным активатором (Ac/Exp) и разными концентрациями синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона,

Дех и метилпреднизолона, МР) у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом (кратность). Обозначения как в **рисунке 21**.

Добавление к TCR-активированным CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитам здоровых доноров ГК (Дех и МР) приводило к дозозависимому снижению исследуемого параметра ($r^2 = -0.976$ и $r^2 = -0.894$, $p < 0.05$, соответственно) (рисунок 26).

Инкубация CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов больных РА с активатором способствовала резкому снижению уровня экспрессии мРНК гена *hTert* (в 25 раз) в культурах изучаемых клеток, по сравнению с интактными пробами (рисунок 26).

На фоне активации, инкубация с ГК (Дех и МР) приводила к дозозависимому снижению экспрессии гена *hTert* в CD3⁺CD45RO⁺ Т-клетках ($r^2 = -0.976$, $r^2 = -0.958$, $p < 0.05$, соответственно) по сравнению с интактными пробами (рисунок 26).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе выполненного исследования были получены данные, освещающие процессы созревания и функциональной активности CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов на синтетические глюкокортикоиды в норме и при ревматоидном артрите, на фоне (TCR) CD2/CD3/CD28 – стимуляции, в эксперименте *in vitro*.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В основе патогенеза АИЗ, в частности, ревматоидного артрита, лежит формирование патологической иммунной памяти, основанной на генерации аутореактивных CD4⁺ Т-клеток [Hidaka T. et al., 1999; Mamoune A. et al., 2000; Fournier C., 2005; Afzali B. et al., 2007; Matteucci E., et al., 2011; Chen J. et al., 2012; Raychaudhuri S.P., 2012; Cho B.A.et.al., 2012; Hayashi M. et al., 2013; Gasper D.J. et al., 2014; Noack M. et al., 2014; Buck M.D. et al., 2015; Wang D. et al., 2015; Klehmet J. et al., 2015; Chen J. et al., 2016; Pandya et al., 2016; Marusina A.I. et al., 2017; McInnes I.B. et al., 2017]. В связи с этим, логичным является тот факт, что патогенетическая терапия АИЗ должна быть направлена на блокирование начальных этапов аутоиммунного процесса, не затрагивая общую иммунореактивность организма. На сегодняшний день лечение АИЗ ориентировано, в большей степени, на подавление гипервоспалительной реакции организма, в основном, за счет применения синтетических глюкокортикоидов (ГК) [Baschant U. et al., 2011; Noack M. et al., 2014; Wendt E. et al., 2016; Olnes M.J. et al., 2016; de Salvi Guimarães F. et al., 2016], длительное применение которых сопровождается развитием разрушительных побочных эффектов [Baschant U. et al., 2011; Noak M. et al., 2014; Gabryel M. et al., 2016; Kloster-Jensen K. et al., 2016].

В целом, ГК характеризуются многогранным влиянием на компоненты иммунной системы, участвуя в инволюции тимуса, процессах активации, созревания и дифференцировки Т-лимфоцитов [Berki T. et al., 2002; Tischner D. et al., 2011; Gruver-Yates A.L. et al., 2013; Ayroldi E. et al., 2014; Moleriu R.D., 2014; Yakimchuk K.et al., 2014; Fischer A. et al., 2015; Talaber G., 2015; Тодосенко Н.М. и соавт., 2017; Taves M.D. et al., 2017]. В то же время данные относительно *прямого* влияния ГК на формирование аутореактивных CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти и процессы их клеточного гомеостаза, носят весьма фрагментарный характер.

В связи с вышесказанным, *целью исследования* явилось изучение клеточно-молекулярных реакций, лежащих в основе процессов созревания и функционального ответа CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов на синтетические глюкокортикоиды (дексаметазон, метилпреднизолон) в норме и при ревматоидном артрите, на фоне (TCR) CD2/CD3/CD28 – стимуляции в системе *in vitro*.

В работе нами были использованы культуры $CD3^+CD45RO^+$ Т-клеток, полученные методом иммуномагнитной сепарации из *взвеси* мононуклеарных клеток периферической крови условно здоровых доноров и больных РА (полная характеристика обследованных групп приведена в гл.2. – п.2.1.1.).

Для выявления эффектов глюкокортикоидов (дексаметазон, Дех и метилпреднизолон, МР) на процессы, *определяющие функциональную активность и созревание $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ Т-лимфоцитов в норме и при ревматоидном артрите*, была применена активационная модель (*in vitro*), исходя из *тех представлений, что макроорганизм представляет собой сложную систему, которая постоянно подвергается антигенной нагрузке, что, по сути, является нормой, а в условиях РА является неотъемлемой составляющей патогенеза аутоиммунного расстройства.*

Спектр концентраций ГК, используемый в эксперименте был определен, исходя из математической фармакокинетической двухкамерной модели (центральная камера - плазма крови и хорошо кровоснабжаемые органы, периферическая камера - плохо кровоснабжаемые ткани), где учитывался расчётный объем распределения ГКС в организме (т.е. гипотетический объём жидкости организма (Vd), в котором лекарственное вещество распределено равномерно и находится в концентрации, равной концентрации (Q) данного вещества в плазме крови (Cp); $Vd = Q/Cp$; для ГКС величина Vd составляет $\approx 0,35$ л/кг). Таким образом, добавляемые нами концентрации ГК на 1 млн. культивируемых Т-клеток/мл, составили ($10^{-6}M$; $2 \times 10^{-6}M$; $4 \times 10^{-6}M$; $8 \times 10^{-6}M$; $1.6 \times 10^{-5}M$), что соответствует действию МР в концентрациях 10.6; 21.3; 46.2; 85.3; 170.7 мг и Дех 2.00; 8.00; 16.00; 32.00; 64.00 мг, распределённых, условно, в 5л крови. Таким образом, используемые нами в работе концентрационные характеристики ГК не превышают рекомендованные стандартные дозы ГК для внутривенного введения (10.00-500.00 мг) пациентам с РА [Баранов А.А. и соавт., 2013; Федеральные клинические рекомендации по оказанию медицинской помощи детям с ювенильным артритом, 2015; Справочник Видаль, ред. Е. Толмачевой, 2016; Zhang Y. et al., 2017].

В течение последних лет все большую популярность в биологии и экспериментальной медицине приобретают методы исследования *in vitro*,

позволяющие оценить процессы жизнедеятельности клеток при воздействии разнообразных физических и химических факторов. Известно, что в результате активационного процесса на поверхности лимфоцитов последовательно экспрессируются молекулы активации, костимуляции, пролиферации и апоптоза [Shipkova M. et al., 2012; Литвинова Л.С. и соавт., 2014]. Становится очевидным, что определение поверхностных биомаркеров, принимающих участие в процессах клеточного гомеостаза лимфоцитов позволит оценить аспекты их функциональной активности в норме и при формировании патологического процесса.

*При проведении сравнительного анализа клеточно-молекулярных реакций, лежащих в основе процессов созревания и функционального ответа $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ Т-лимфоцитов на активатор в норме и при ревматоидном артрите, на фоне (TCR) $CD2/CD3/CD28$ – стимуляции в эксперименте *in vitro*, в зависимости от гендерных критериев, достоверных различий тестируемых параметров выявлено не было.*

Согласно представленным нами данным, стимуляция $CD3^+CD45RO^+$ культур здоровых доноров и больных РА активатором, сопровождалась однонаправленным ростом числа $CD4^+$ Т-лимфоцитов, экспрессирующих фенотипические маркеры, характеризующие состояние активации (ранней - $CD25$ и поздней – HLA-DR), пролиферации ($CD71$) и апоптоза ($CD95$) клетки, и, напротив, снижением содержания $CD4^+CD28^+$ Т-клеток (таблицы 5-9). Как уже упоминалось ранее, имитируя действие АПК, используемые нами анти- $CD2/CD3/CD28$ -частицы стимулируют Т-клеточный рецептор (TCR) и корецепторные молекулы ($CD28$, $CD58$) на Т-лимфоцитах, что способствует формированию иммунного синапса, активации клетки и экспрессии многих генов, способствующих пролиферации лимфоцитов, в частности, генов IL-2 и его рецептора – IL-2R ($CD25$) [Zhang J. et al., 2001; Sallusto F., Lanzavecchia A., 2009; Spreafico R. et al., 2016a]. Т-клетки памяти находятся в фазе G_1 , что способствует их быстрому входу в IL-2-зависимую стадию иммунного ответа [Spreafico R. et al., 2016a]. Появление на мембране Т-лимфоцита рецептора к *трансферрину* ($CD71/TfR1$) характеризует стадию пролиферации, менее зависимую от IL-2 [Marsee D.K. et al., 2010; Литвинова Л.С. и соавт., 2014]. Установлено, что экспрессия TfR1 значительно увеличивается через 48-60 часов после неспецифической стимуляции

лимфоцитов митогенами (ФГА, конканавалин) и антигенами. Молекула CD71 на клеточной мембране связывает комплекс железо-трансферрин, после чего он поглощается клеткой путем эндоцитоза, и тем самым обеспечивается вхождение в активированную клетку ионов железа, необходимых для дальнейшего процесса пролиферации [Li L. et al., 2010; Литвинова Л.С. и соавт., 2014]. Выявленное нами повышение общего числа клеток (в мл) в CD3⁺CD45RO⁺ культурах здоровых доноров при действии Ас/Ехр имело ассоциацию с содержанием CD4⁺ Т-лимфоцитов, экспрессирующих молекулы CD71 и CD25 ($r = 0.675$; $r = 0.489$, $p < 0.05$, соответственно).

Согласно данным литературы, молекулы HLA-DR и CD95 являются маркерами не только поздней, но и длительной активации Т-клеток [Bertho N. et al., 2000; Imamichi H. et al., 2012]. Относительно недавно было установлено, что CD3⁺HLA-DR⁺ Т-клетки периферической крови здоровых доноров, в основном, несут короткую изоформу рецептора CD45 – CD45RO (до 78-88%); характеризуются отсутствием маркеров недавней TCR-активации и низким уровнем экспрессии белков семейства Bcl-2 [Imamichi H. et al., 2012]. Предполагают, что CD3⁺HLA-DR⁺ представляют собой зрелые регуляторные Т-клетки с высокой супрессивной активностью и участвуют в процессах нормальной иммунорегуляции [Imamichi H. et al., 2012; Arruvito L. et al., 2014]. В то же время молекула CD95 обладает рядом функциональных свойств, среди которых, *не только* участие в процессах апоптоза, но и в пролиферации, канцерогенезе, созревании Т-лимфоцитов и др. [Gajate C. et al., 2015]. Ранее нами было показано, что все CD3⁺HLA-DR⁺ лимфоциты здоровых доноров экспрессируют гликопротеин CD95, однако не все CD3⁺CD95⁺ клетки являются HLA-DR-позитивными [Сохоневич Н.А., 2015; Тодосенко Н.М. и соавт., 2017].

Согласно полученным нами результатам, содержание CD4⁺CD95⁺ и CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ Т-клеток в интактных CD3⁺CD45RO⁺ - культурах больных РА почти в 2 раза превышало аналогичные показатели здоровых доноров (таблицы 8, 9), что в целом, согласуется с данными литературы. Увеличение числа лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней и поздней активации (CD69, CD25, HLA-DR и CD95), регистрируется в периферической крови больных аутоиммунной патологией (гранулематоз Вегенера, РА) [Abdulahad W.H. et al.,

2006], микозом [Du-Thanh A. et al., 2017], вирусом Эбола [Agrati C. et al., 2016], системной красной волчанкой [Aldahlawi A.M. et al., 2015].

Индукцированный добавлением активатора рост числа $CD4^+$ Т-клеток, несущих мембранные молекулы CD95 и HLA-DR, в культурах здоровых доноров, может свидетельствовать о развитии клеточной гибели, опосредованной активацией (activation-induced cell death, AICD), которая является важным механизмом, обеспечивающим толерантность на периферии, за счет устранения аутореактивных лимфоцитов [Arakaki R. et al., 2014]. Вышесказанное подтверждается отрицательными корреляциями между содержанием живых клеток и числом $CD4^+CD95^+$ и $CD4^+CD95^+HLA-DR^+$ Т-клеток в культурах здоровых доноров, выявляемые при действии на клетки активатора ($r = -0.873$, $r = -0.367$, $p < 0.05$). Тогда как у больных РА подобные закономерности отсутствовали.

Следует отметить меньшую чувствительность $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ Т-клеток больных РА к пролиферативному и апоптогенному действию активатора, что может быть связано с изменением их функциональной активности, опосредованной непрерывной стимуляцией Т-клеточного рецептора аутоантигенами *in vivo* [Tsubaki M. et al., 2015]. Доказано, что хроническая АГ-стимуляция при РА приводит к снижению разнообразия TCR-репертуара на Т-клетках, что сопровождается ограничением притока наивных Т-лимфоцитов на периферию, вследствие нарушения механизма обратной связи. В связи с этим, для поддержания общего количества клеток в пуле, аутореактивные Т-лимфоциты пролиферируют, пополняя количество клеток с агрессивным потенциалом [Matsuki F. et al., 2014].

В контексте изучаемой тематики особого внимания заслуживает изменение (потеря) экспрессии Т-лимфоцитами молекулы костимуляции CD28 в ответ на стимулы эндо- и экзогенной природы. До недавнего времени придерживались парадигмы, что Т-клетки памяти для экспансии во время вторичного иммунного ответа не нуждаются в дополнительной костимуляции [Younes S.A. et al., 2016; Saidakova E.V. et al., 2017]. Однако, относительно недавно стали появляться работы, свидетельствующие, что в процессе репликативного старения, ассоциированного с непрерывной TCR-стимуляцией (вирусной или антигенной) или в условиях длительного провоспалительного цитокинового микроокружения, отсутствие CD28-трансдуцированных сигналов во время активации Т-лимфоцитов

памяти, индуцирует состояние анергии и приводит к снижению их реакции на АГ-стимуляцию [Thewissen M. et al., 2007a; Boesteanu A.C. et al., 2009, Echeverría A. et al., 2015]. Для этих клеток характерна сниженная экспрессия белков семейства Bcl-2, обладающих антиапоптотической активностью, а также высокая экспрессия gH2AX и уровень фосфорилирования p38 [Di Mitri D. et al., 2011].

В связи с вышесказанным, выявленное нами повышение числа мертвых Т-клеток в *культурах здоровых доноров*, индуцированное активатором, может быть связано с высокой чувствительностью CD4⁺CD28-негативных (r=0.763, p<0.05) Т-клеток эффекторов к дисбалансу иницирующих сигналов, усиленных аутопродукцией IL-2 [Krueger et al., 2003]. Исследованиями Юровой К.А. (2015) также показано, что *TCR-индуцированная потеря экспрессии молекулы CD28* антиген-специфическими Т-клетками памяти (CD45RO⁺) в норме предотвращает их спонтанную пролиферацию в отсутствии *антигенного стимула in vivo* [Юрова К.А., 2015].

Интерес представляют данные других авторов, согласно которым, CD4⁺CD28⁻ (null) Т-лимфоциты играют ключевую роль в патогенезе АИЗ, являясь *аутореактивными клетками*, способными к экспансии в ответ на повторную ауто-антигенную стимуляцию [Dumitriu I.E., 2015; Fessler J. et al., 2016]. Так, снижение числа CD3⁺CD4⁺CD28⁺, опосредованное хронической активацией, отражает процессы образования популяции аутореактивных CD3⁺CD4⁺CD28⁻ лимфоцитов, способных к немедленной реализации эффекторных функций [Dumitriu I.E., 2015], которые отличаются высоким провоспалительным потенциалом и короткими теломерами [Pieper J. et al., 2014]. Также установлено, что для активации процесса пролиферации и индукции эффекторных функций этих клеток при аутоиммунной патологии *достаточными* могут быть сигналы иного рода (лиганды для НК-клеточных рецепторов, хемокины, адгезивные молекулы), а не антигены [Dumitriu I.E., 2015].

Интересно отметить, что обнаруженная нами популяция CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ Т-клеток в CD3⁺CD45RO⁺ - культурах здоровых доноров и больных РА, согласно данным проведенного логистического цитометрического анализа, была негативной по маркеру CD28 (рисунок 12).

Таким образом, согласно источникам литературы [Matsuki F. et al., 2014; Хазиахматова О.Г., 2016] и полученным нами данным, потеря экспрессии молекулы коактивации (CD28) TCR-активированными CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ Т-клетками больных РА, наряду с усилением экспрессии таких мембранных маркеров, как CD95 и HLA-DR (и отсутствием ассоциаций с числом мертвых/живых клеток), может косвенно указывать на процессы их созревания в эффекторы под действием антиген-неспецифической активации. В научной литературе *факт антиген-неспецифической активации* и созревания клонов Т-лимфоцитов активно обсуждается с позиций физиологической и иммунопатологической модуляции активности иммунного ответа [Camargo J.F. et al., 2009; Duraisingham S.S. et al., 2009; Wieckowski E.U. et al., 2009].

Как уже упоминалось ранее в обзоре, в процессе TCR-стимуляции Т-лимфоциты претерпевают активационные изменения, затрагивающие экспрессию общелейкоцитарного рецептора - молекулы CD45 [Furlan G. et al., 2014; Saunders A.E. et al., 2014], различные изоформы которой, генерируемые в результате альтернативного сплайсинга, обуславливают активность Т-клеток во время иммунного ответа [Krzywinska E. et al., 2016; Landskron J. et al., 2017].

Выше мы продемонстрировали участие TCR-активации в процессах созревания CD4⁺CD45RO⁺ клеток в эффекторные клетки (CD3⁺CD4⁺CD28⁻CD95⁺HLA-DR⁺). Выявление (*по результатам проведения логистического цитометрического анализа*) популяции T_{EMRA} лимфоцитов в исследуемых нами культурах CD3⁺CD45RO⁺ Т-клеток (через 48 ч), полученных как у здоровых доноров, так и больных РА, при культивировании с активатором позволило нам сделать предположение, что антиген-неспецифическая TCR-активация способствует также образованию терминально-дифференцированных, реэкспрессирующих высокомолекулярную изоформу рецептора CD45 – CD45RA эффекторных клеток. Последние, как и T_{EM} клетки иммунной памяти, отличаются способностью продуцировать провоспалительные молекулы, высокой экспрессией поверхностного маркера CD57, ростом содержания перфорина и гранзима А внутри клетки, а также низкой теломеразной активностью [Pieper J. et al., 2014; Dumitriu I.E., 2015; Fessler J. et al., 2016].

Снижение или полное отсутствие активности фермента теломеразы в клетках приводят к тому, что длина теломер укорачивается при каждом клеточном делении, являясь, таким образом, детерминантой возраста клетки – определяя ее «репликативную историю» [Aubert G. et al., 2008; Veirne C. et al., 2014; Paiva R.M. et al., 2014]. Т-лимфоциты, как высоко-пролиферирующая популяция, представляют интерес в отношении исследования теломеразной активности [Bagherpour V. et al., 2009; Molgora V. et al., 2013]. Предполагают, что активность фермента теломеразы эквивалентна уровню относительной экспрессии мРНК гена ее каталитической единицы - *hTERT* [Matsumura-Arioka Y. et al., 2005; Benko A.L. et al., 2012]. Между активностью теломеразы и степенью дифференцировки Т-клеток выявлены сильные ассоциации [Fletcher J.M. et al., 2005; Fritsch R.D. et al., 2005].

Выявленное нами снижение уровня относительной экспрессии мРНК гена каталитической субъединицы теломеразы (*hTERT*) в TCR-активированных Т-клетках подтверждает роль стойкой/хронической стимуляции в подавлении активности теломеразы [Colella M.P. et al., 2017], способствуя, тем самым укорочению длины теломер и завершая репликативный потенциал антиген-специфических Т-клеток [Dumitriu I.E., 2015]. Более выраженное снижение изучаемого показателя в пробах больных РА (в 23.5 раза по сравнению с интактными), обусловлено, вероятно, «поломкой» в теломерном механизме, приводящем к изменению функций Т-клеток и преждевременной эрозии теломер при РА [Pieper J. et al., 2014].

Проведение корреляционного анализа позволило выявить негативные ассоциации между уровнем относительной экспрессии мРНК гена *hTERT* в CD3⁺CD45RO⁺ Т-клетках с содержанием T_{EM} и T_{EMRA} лимфоцитов у больных РА при действии активатора ($r = - 0.654$ и $r = - 0.874$, $p < 0.05$), у здоровых доноров между уровнем относительной экспрессии мРНК гена *hTERT* и содержанием T_{EM} Т-клеток ($r = - 0.524$, $p < 0.05$); а также отрицательные взаимосвязи между числом CD3⁺CD4⁺CD28⁺CD45RO⁺ Т-клеток и содержанием T_{EMRA} лимфоцитов при действии активатора как у здоровых доноров ($r = - 0.342$, $p < 0.05$), так и у больных РА ($r = - 0.562$, $p < 0.05$). Вышесказанное свидетельствует об TCR-индуцированных процессах активации и созревании Т-клеток в эффекторные, как в норме, так и при РА.

Таким образом, активация анти-*CD2/CD3/CD28*-частицами способствовала однонаправленным, разной степени выраженности, изменениям фенотипических особенностей $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ Т-клеток как у здоровых доноров, так и больных РА. Нами продемонстрировано влияние антиген-неспецифической активации на созревание $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ Т-клеток в эффекторные, в том числе, терминально-дифференцированные (T_{EMRA}), более выраженное в культурах больных РА.

Как уже упоминалось ранее, обладая мощным противовоспалительным потенциалом, ГК оказывают комплексное воздействие на клетки иммунной системы: блокируют высвобождение молекул воспаления, оказывают влияние на пролиферативную, миграторную и функциональную активность Т-лимфоцитов модулируют их апоптотическую гибель [Гуцол А.А. и соавт., 2013; Шуплецова В.В., 2015].

*При проведении сравнительного анализа клеточно-молекулярных реакций, определяющих процессы созревания и функциональную активность $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ Т-лимфоцитов на ГК (дексаметазон и метилпреднизолон) в норме и при ревматоидном артрите, на фоне (TCR) *CD2/CD3/CD28* – стимуляции в эксперименте *in vitro*, в зависимости от гендерных критериев, достоверных различий тестируемых параметров выявлено не было.*

ГК (Dex и MP) (весь диапазон концентраций) значимо не изменяли число клеток (в мл) в $CD3^+CD45RO^+$ культурах здоровых доноров и больных РА, что вполне согласуется с антипролиферативным действием ГК [Gruver-Yates A.L. et al., 2013; Cheng Q. et al., 2014; Ayroldi et al., 2014]. Известно, что наиболее чувствительными к воздействию ГК являются гены, обеспечивающие переход G_1 -периода в S-фазу [Li H. et al., 2012; Mutsaers H.A. et al., 2012]. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что под влиянием ГК снижается продукция IL-2, увеличивается концентрация внутриклеточного цАМФ и резко возрастает уровень образования активных форм кислорода, а также повышается экспрессия кальмодулина [Jiang N. et al., 2011; Zhao Y. N. et al., 2011; Huseby S. et al., 2011; Zambon A. C. et al., 2011; Heidari N. et al., 2012; Гуцол А.А. и соавт., 2013, Baschant U. et al., 2013; Dong H. et al., 2015; Jing D. et al., 2015].

Согласно полученным нами данным, МР также значимо снижал содержание живых клеток в культурах от здоровых доноров (дозозависимый эффект МР: результаты регрессионного анализа $r^2 = -0.373$, $p < 0.05$) и в культурах от больных РА (только концентрации 85.30 и 170.70 мг) по сравнению с пробами только с добавлением активатора (таблица 4). Полученные нами результаты вполне согласуются с данными научной периодики. ГК индуцируют апоптоз в Т-лимфоцитах, способствуя, таким образом, прекращению воспалительного ответа [Cheng Q. et al., 2014]. Установлено, что наиболее чувствительными к ГК-индуцированной клеточной гибели являются наивные Т-клетки и зрелые Th1-лимфоциты, тогда как наиболее устойчивые – Th2 и Th17 – Т-клетки [Gruver-Yates A.L. et al., 2013].

Интересно, что низкие концентрации Dex (2.00-16.00 мг) достоверно повышали число живых клеток в TCR-активированных $CD3^+CD45RO^+$ культурах контрольной группы, тогда как высокие дозы (64.00 мг), напротив, способствовали снижению исследуемого показателя в сравнении с пробами только с добавлением активатора. Добавление Dex значимо не влияло на изменение числа живых клеток в TCR-активированных культурах $CD3^+CD45RO^+$ Т-клеток больных РА (таблица 4). Протекторное действие низких концентраций Dex в отношении жизнеспособности TCR-активированных $CD3^+CD45RO^+$ клеточных культур может быть опосредовано посредством механизма, реализуемого при синергичной активации TCR и GR [Banuelos J. et al., 2016].

Так, сигнальные молекулы, активируемые при TCR-лигировании, такие как AP-1 и NF κ B, ингибируют ГК-индуцированный апоптоз Т-лимфоцитов; и наоборот, ГК способны предотвращать TCR-активированную гибель клеток. Многими исследователями выявлена избирательная цитотоксическая активность ГК, связанная с наличием/отсутствием экспрессии молекулы CD25 на Т-лимфоцитах [Maślanka T., 2014].

Выявленное нами однонаправленное супрессорное действие ГК (Dex и МР) на экспрессию молекул активации (CD25), костимуляции (CD28) и пролиферации (CD71) $CD4^+CD45RO^-$ Т-клетками, полученными от здоровых доноров и больных РА, вполне укладывается в эффекты, оказываемые ГК. Прямая связь

между ингибирующим действием ГК на продукцию IL-2 и зависимым от IL-2 снижением маркеров CD25 и CD71 на активированных CD4⁺- лимфоцитах подтверждена многими исследованиями [Crockard A.D. et al., 1996; Baschant U. et al., 2010; Shipkova M. et al., 2012; Гуцол А.А. и соавт., 2013]. Реакция TCR-активированных CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺- Т-клеток больных РА на действие ГК была сопоставима с аналогичными параметрами контроля.

Как уже упоминалось ранее, конститутивная экспрессия молекулы CD95 на эффекторных лимфоцитах и Т-клетках памяти является не только признаком, определяющим готовность к запуску активационного апоптоза, но и маркером их созревания и дифференцировки [Gajate C. et al., 2015]. Полученные нами данные относительно ингибирующего действия МР (170.70 мг) и Dex (2.00-16.00 мг) на экспрессию молекулы CD95 CD4⁺ Т-клетками здоровых доноров, а также влияние Dex (весь диапазон концентраций ГК) на число CD4⁺CD95⁺ Т-клеток в культурах больных РА, вполне укладываются в геномный механизм действия ГК. Многими авторами выявлена способность ГК опосредованно снижать экспрессию молекулы CD95 через взаимодействие лигированного ядерного рецептора ГК с промоторной областью CD95L, содержащей негативные ГР-элементы ответа (nGRE) [Lieberman A.C. et al., 2007; Vaumann S. et al., 2005; Liberman A.C. et al., 2012].

Интересным является выявленный нами рост числа CD4⁺CD95⁺ Т-лимфоцитов, индуцированный добавлением МР (во всем спектре концентраций) в TCR-активированные CD3⁺CD45RO⁺- культуры клеток, полученные от больных РА (таблица 8). Исследование функциональной активности Т-лимфоцитов при протеогликан-индуцированном артрите (ПГИА) у животных [Zhang J. et al., 2001] позволило констатировать наличие дефекта в механизмах клеточной гибели CD4⁺-лимфоцитов, опосредованной активацией системы Fas/FasL. По мнению авторов, этот механизм лежит в основе генерации аутореактивных периферических CD4⁺-Th1-лимфоцитов [Zhang J. et al., 2001]. Этот тезис подтверждается отсутствием обратных корреляций между числом CD95⁺ Т-клеток и числом живых лимфоцитов в культурах, полученных от больных РА, подвергшихся действию активатора, а также сочетанному влиянию активатора и МР. Клетки, полученные от здоровых доноров, напротив, демонстрировали реципрокные отношения между содержанием живых клеток и числом CD4⁺CD95⁺ Т-лимфоцитов, выявляемые при действии на

клетки активатора ($r = -0.367, p < 0.05$) и сочетанном добавлении активатора и МР в концентрации 85.30 и 170.70 мг ($r = -0.423$ и $r = -0.392, p < 0.05$, соответственно). По аналогии, обнаруженное нами увеличение числа $CD4^+CD95^+$ клеток в $CD45RO^+$ культурах *здоровых доноров* (но не у больных РА) в результате действия активатора и Dex (32.00-64.00 мг) отрицательно коррелировало с содержанием живых клеток в культурах ($r = -0.563, r = -0.861, p < 0.05$), что подтверждает проапоптогенный эффект высоких концентраций ГК [Baumann S. et al., 2005]. Тогда как отсутствие таких ассоциаций при действии ГК (Dex и МР) в пробах больных РА и при добавлении низких доз ГК в культуры здоровых доноров может свидетельствовать об участии гликопротеина CD95 в процессах активации и созревания Т-клеток [Сохоневич Н.А., 2015; Gutsol A.A. et al., 2015].

В последнее время в литературе появляются данные, свидетельствующие, что в развитии РА ключевую роль играют аутореактивные $CD4^+CD45RO^+HLA-DR^+$ Т-лимфоциты, рециркулирующие через воспаленную синовиальную оболочку [Spreafico R. et al., 2016a; Spreafico R. et al., 2016b]. В тоже время Т-лимфоциты с фенотипом $CD3^+CD4^+CD95^+$, выделенные у больных РА, демонстрируют высокую экспрессию поверхностной молекулы CCR7, что опосредует рост активированных клеток во вторичных лимфоидных органах, лимфатических узлах и синови, обеспечивая высокую продукцию воспалительных цитокинов [Aldahlawi A.M. et al., 2015]. Lorenz Н.М (2000) продемонстрировано, что высокое содержание $CD4^+CD95^+CCR7^+$ клеток на периферии при РА способствует сверхпрезентации апоптотических телец лимфоцитам и сопровождается усилением аутоиммунного ответа [Lorenz Н.М. et al., 2000]. Кроме того выявлена ассоциация между частотой $CD4^+CD28^{null}$ Т-клеток с тяжестью РА и внесуставными поражениями (например, сосудистым воспалением) [Matsuki F. et al., 2013; Matsuki F. et al., 2014; Dumitriu I.E., 2015].

Согласно полученным результатам, добавление ГК (Dex и МР) в культуральную среду ТCR-активированных $CD3^+CD45RO^+$ Т-клеток способствовало увеличению (в сравнении с пробами только с активатором) числа T_{EM} клеток только у больных РА (таблица 9).

На фоне активации, добавление Dex (2.00-16.00 мг) и МР (10.60 - 85.30 мг) значимо не влияло на изменение содержания $CD4^+CD95^+HLA-DR^+CD28^-$ Т-клеток

у здоровых доноров (таблица 9), тогда как действие максимальных концентраций ГК (Dex 32.00-64.00 мг и МР 170.70 мг) способствовало снижению их содержания в культурах. Обнаруженные нами отрицательные взаимосвязи между числом T_{EM} клеток и содержанием живых лимфоцитов в пробах здоровых доноров с добавлением ГК (Dex 32.00-64.00 мг и МР 170.70 мг) и активатора может быть доказательством регуляторной активности $CD3^+HLA-DR^+$ Т-клеток, механизмы которой опосредованы контактными взаимодействиями между *соседними* клетками (включая CTLA-4-сигнализацию) [Matsuki F. et al., 2013; Matsuki F. et al., 2014]. В то же время, как уже упоминалось ранее, сигналы, генерируемые с помощью HLA-DR, приводят к гибели зрелых профессиональных АПК и активированных Т- и В-лимфоцитов, утративших способность к экспрессии Fas-антигена (каспаз-независимый механизм) [Bertho A.L. et al., 2000; Di Mitri D. et al., 2011; Imamichi H. et al., 2012].

Напротив, в TCR-активированных $CD3^+CD45RO^+$ культурах больных РА добавление Dex (8.00-64.00 мг) и МР (весь диапазон исследуемых концентраций) индуцировало равномерный рост содержания $CD4^+CD95^+HLA-DR^+CD28^-$ Т-клеток (таблица 9) в $CD3^+CD45RO^+$ культурах, по сравнению с пробой с добавлением только активатора (таблица 9). Отсутствие значимых ассоциаций между содержанием $CD4^+CD95^+$ и $CD4^+CD95^+HLA-DR^+CD28^-$ клеток и числом живых/мертвых лимфоцитов (таблицы 4, 9) в культурах больных РА может свидетельствовать о нарушении супрессорных функций этой популяции клеток. Полученные нами результаты согласуются с опубликованными ранее данными о наличии в периферической крови больных РА популяции активированных $CD4^+CCR7^-CD45RA^-HLA-DR^+$ Т-лимфоцитов с выраженными провоспалительными свойствами, способных рециркулировать через воспаленную синовиальную оболочку сустава, численность которых возрастает на периферии во время активной фазы заболевания [Bertho N. et al., 2000; Matsuki F. et al., 2013; Spreafico R. et al., 2016a; Muehling L.M. et al., 2016; Spreafico R. et al., 2016b].

Сочетанное действие активатора и ГК (Dex и МР) сопровождалось дозозависимым увеличением числа клеток, реэкспрессирующих молекулу CD45RA - $CD4^+CD45RO^-CD28^-CD95^+HLA-DR^+$ в культурах здоровых доноров (*данные регрессионного анализа* $r^2=0.697$, $r^2=0.897$; $p<0.05$, соответственно) и больных РА

(данные регрессионного анализа $r^2=0.924$, $r^2=0.922$; $p<0.05$, соответственно). Важно отметить, что количество T_{EMRA} клеток в культурах, полученных у больных РА, превосходило таковое в пробах здоровых доноров, индуцированное действием ГК (\approx в 1.5-2.0 раза).

Как уже упоминалось ранее, созревание Т-клеток характеризуется последовательной потерей костимуляционных и хемокиновых рецепторов CD27, CD28 и CCR7, сопровождается уменьшением длины теломер [Akbar A.N. et al., 2005]. Так, Т-клетки эффекторной памяти ($CD4^+CD27^-CD28^-CCR7^-$ и $CD8^+CD27^-CD28^-CCR7^-$) а также терминально-дифференцированные эффекторы (T_{EMRA}) имеют самые короткие теломеры.

Обнаруженное нами снижение транскрипции мРНК гена *hTERT* ($r^2=-0.976$, $p<0.05$ - в культурах здоровых доноров, $r^2=-0.976$, $p<0.05$ - в культурах больных РА при действии Dex и $r^2=-0.894$, $p<0.05$ - в культурах здоровых доноров, $r^2=-0.958$, $p<0.05$ - в культурах больных РА при действии MP), наряду с уменьшением содержания $CD3^+CD4^+CD28^+$ лимфоцитов, в ответ на сочетанное действие Т-клеточного активатора и ГК, а также выявленные корреляционные взаимосвязи между T_{EMRA} и $CD3^+CD4^+CD28^+CD45RO^+$ ($r=-0.728$, $p<0.05$ - в культурах здоровых доноров при действии Dex; $r=-0.690$, $r=-0.430$, $p<0.05$ - в культурах больных РА - при действии Dex и MP (общая корреляция), соответственно), T_{EMRA} и *hTERT* ($r=-0.891$ и $r=-0.762$, $p<0.05$ - в культурах больных РА при действии Dex и MP (общая корреляция), соответственно), $CD4^+CD28^+$ и *hTERT* ($r=0.450$, $p<0.05$ - в культурах здоровых доноров при действии MP; $r=0.940$; $r=0.736$, $p<0.05$ - в культурах больных РА при действии Dex и MP, (общая корреляция), соответственно) также подтверждают участие ГК в созревании $CD4^+CD45RO^+$ клеток в T_{EMRA} эффекторы в норме и при РА.

Таким образом, ограничивая процессы активации и пролиферации $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ Т-клеток при РА, ГК подавляют их чрезмерный рост. Индуцированное ГК повышение числа эффекторных T_{EM} / T_{EMRA} Т-лимфоцитов у больных РА может свидетельствовать об относительной резистентности этих клеток, возможно связанной с дефектами их апоптоза, к противовоспалительному супрессорному действию исследуемых ГК. Возможно, выявленные нами эффекторные популяции Т-лимфоцитов являются ключевыми участниками в

патогенезе РА, ускоренно приобретающими свой негативный потенциал на фоне ГК терапии, способствуя прогрессии заболевания, в частности, за счет мощного выброса провоспалительных факторов.

Играя роль мессенджеров при активации иммунной системы в результате индукции аутоиммунитета, развитием хронического воспалительного процесса и деструкцией суставов, медиаторы с провоспалительным действием (IL-17, IL-21, TNF- α , IFN- γ) опосредуют патологические изменения при РА [Matsuki F. et al., 2013; Vanuelos J., Lu N.Z, 2016; Spreafico R. et al., 2016a]. Так, IL-17 и IFN- γ играют ключевую роль в инициации РА, приводя к появлению первичных симптомов заболевания, усиливая воспалительный ответ [Bertho N. et al., 2016; Muehling L.M. et al., 2016]. Тогда как IL-21 и TNF- α играют ключевую роль в пролонгации заболевания, способствуя инфильтрации клеток в синовиальные ткани с последующим разрушением суставного хряща при РА [Spreafico R. et al., 2016b].

Основываясь на предположении, что обнаруженные нами популяции T_{EM} / T_{EMRA} Т-клеток являются вероятными артритогенными лимфоцитами, далее мы предприняли попытку оценить влияние ГК (Dex и MP) на секрецию активированными $CD3^+CD45RO^+/CD45RO^-$ Т-клеточными культурами основных провоспалительных цитокинов (IL-2, IL-17, IL-21, TNF- α и IFN- γ), принимающих участие в патогенезе РА.

Согласно полученным нами данным, у больных РА регистрировалось более высокое содержание цитокинов (IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-21) в супернатантах клеточных культур в *интактных пробах* (по сравнению с контрольной группой), за исключением секреции Т-клетками IL-2 (таблица 11). Добавление активатора способствовало достоверному повышению уровня экспрессии мРНК генов провоспалительных цитокинов (IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-21), и, как следствие, увеличению их содержания в супернатантах клеточных культур, как у здоровых доноров, так и больных РА (таблицы 11-15, рисунки 21-25). Изменения носили однонаправленный характер, но имели разную степень выраженности (таблицы 11-15, рисунки 21-25).

Нами был обнаружен ряд интересных зависимостей между содержанием T_{EM} / T_{EMRA} Т-клеток и показателями, отражающими продукцию провоспалительных медиаторов. Так, в активированных пробах больных РА, число T_{EM} Т-клеток

позитивно коррелировало с уровнем относительной экспрессии генов TNF-а ($r=0.430$, $p<0.05$), IL-17 ($r=0.592$, $p<0.05$), IL-21 ($r=0.372$, $p<0.05$), а также с содержанием провоспалительных цитокинов в супернатантах клеточных культур: IL-17 ($r=0.617$, $p<0.05$), IL-21 ($r=0.430$, $p<0.05$). Тогда как содержание T_{EMRA} Т-клеток положительно коррелировало с уровнем относительной экспрессии мРНК генов TNF-а и его секрецией Т-клетками ($r=0.893$, $r=0.624$, $p<0.05$, соответственно). Выявленные нами взаимосвязи подтверждают участие T_{EM} / T_{EMRA} Т-клеток в продукции провоспалительных медиаторов у больных РА при TCR-активации.

У здоровых доноров ассоциации были выявлены только между содержанием T_{EM} Т-клеток и уровнем относительной экспрессии гена TNF-а ($r=0.348$, $p<0.05$), а T_{EMRA} с концентрацией TNF-а в супернатантах клеточных культур ($r=0.420$, $p<0.05$). Кроме того, у здоровых доноров обнаружена отрицательная взаимосвязь между содержанием T_{EM} Т-клеток с содержанием IL-2 в супернатантах клеточных культур в пробах с добавлением активатора ($r=-0.781$, $p<0.05$). Вышесказанное подтверждает тезис, что уникальная роль IL-2 в регуляции иммунитета, в большей степени, связана с контролем за гиперактивацией иммунной системы или индукцией толерантности за счет стимуляции дифференцировки Treg лимфоцитов *in vivo*, а не с выполнением функции ростового фактора лимфоцитов, где его действие дублируется другими цитокинами [Malek T.R. et al., 2004]. Доказано, что дефицит компонентов системы IL-2-CD25 (или IL-2R β) приводит к полиорганному воспалению и системному аутоиммунитету у животных и человека [Céniat M.C. et al., 2013]. Более низкая (в сравнении с контрольной группой) продукция CD3⁺CD45RO⁺ Т-клетками IL-2 у больных РА в ответ на TCR-стимуляцию, в целом, может свидетельствовать об ослаблении у них пролиферативных иммунных реакций, что может приводить к нарушению механизмов, ответственных за формирование Т-клеточной памяти.

Интересные результаты были получены при изучении сочетанного влияния ГК (Dex и MP) и активатора на уровень относительной экспрессии мРНК генов провоспалительных цитокинов (IL-2, IL-17, IL-21, TNF-а и IFN- γ) и их секрецию CD3⁺CD45RO⁺ Т-культурами, полученными у здоровых доноров и больных РА.

У здоровых доноров статистически значимый супрессорный эффект Dex ($p < 0.05$) в отношении продукции IL-2 отмечался только при действии высоких концентраций ГК (16.00-64.00 мг). TCR-активированные CD3⁺CD45RO⁺ клетки, полученные у больных РА, были чувствительны ко всему диапазону концентраций Dex в отношении продукции IL-2 ($r^2 = -0.616$, $p < 0.05$ – содержание IL-2 в супернатантах культур; $r^2 = -0.668$ – уровень экспрессии мРНК гена IL-2 в Т-клетках). Аналогично влиянию Dex, сочетанное добавление активатора и МР в CD3⁺CD45RO⁺ культуры сопровождалось дозозависимым снижением уровня экспрессии мРНК генов IL-2 и его секреции Т-клетками как у здоровых доноров ($r^2 = -0.456$ – уровень экспрессии мРНК гена IL-2; $r^2 = -0.684$ – содержание IL-2 в супернатантах клеточных культур), так и у больных РА ($r^2 = -0.623$ – уровень экспрессии мРНК гена IL-2; $r^2 = -0.478$ – содержание IL-2 в супернатантах клеточных культур).

Как уже упоминалось ранее, одним из ключевых эффектов ГК является подавление TCR-сигналинга и пролиферации Т-клеток за счет супрессии продукции ростового фактора лимфоцитов – IL-2 [Gao L. et al., 2011; Boldizar F. et al., 2013]. Описан прямой ингибирующий эффект ГК на экспрессию гена IL-2 в лимфоцитах [Vacca A. et al., 1990] и как следствие, снижение его продукции активированными Т-клетками [Vacca A. et al., 1990; Boldizar F. et al., 2013; Gutsol A.A. et al., 2013]. В основе супрессорного действия ГК лежит подавление активности транскрипционного фактора STAT4, фосфорилирование которого осуществляется под действием IL-12 [Franchimont D. et al., 2000; Baschant U. et al., 2010]. Установлено также прямое действие ГК на фактор транскрипции Th1-лимфоцитов – T-bet [Franchimont D. et al., 2000; Liberman A.C. et al., 2007] и описан ГК-опосредованный механизм ингибирования промоторной области гена IL-2 через белок-белковое взаимодействие, предотвращающее кооперативное связывание димеров AP-1 и NFAT между собой и с таргетной последовательностью ДНК [Liberman A.C. et al., 2007]. Кроме того ГК, взаимодействуя с белковой субъединицей RelA, принадлежащей к большому семейству транскрипционных факторов NF-κB [Liberman A.C. et al., 2007], приводит к снижению секреции IL-2 Т-клетками, вследствие отсутствия контакта RelA с промоторной областью гена [Liberman A.C. et al., 2007]. Выявлено также,

что ГК ингибируют транскрипцию гена IL-2, снижая стабильность его мРНК [Koetz K. et al., 2000].

Многочисленными исследованиями доказано, что хроническое воспаление и тяжелые симптомы, регистрируемые при РА, во многом опосредованы участием TNF- α [Kawashima M. et al., 2005; Sethi G. et al., 2008; Aringer M. et al., 2012; Érsek V. et al., 2012; Bystrom J. et al., 2016; Kalliolias G.D. et al., 2016]. Установлено прямое влияние данного медиатора на Т-лимфоциты при РА [Sethi G. et al., 2008; Makrygiannakis D. et al., 2012; Brenner D. et al., 2015]. Доказано, что хроническое влияние TNF- α на Т-клетки приводит к снижению реакции TCR-опосредованной стимуляции, преждевременному старению, потере разнообразия Т-клеточного репертуара и снижению чувствительности иммунной системы к инфекциям [Makrygiannakis D. et al., 2012; Bishu S. et al., 2014; Brenner D. et al., 2015; Bystrom J. et al., 2016; McInnes I.B. et al., 2017].

Добавление Dex (весь диапазон концентраций) в TCR-активированные CD3⁺CD45RO⁺ культуры, полученные у здоровых доноров и больных РА, приводило к значимому снижению относительного уровня экспрессии гена TNF- α и как следствие, содержания TNF- α в супернатантах клеточных культур (результаты корреляционного анализа между уровнем экспрессии мРНК гена TNF- α и его содержанием в супернатантах клеточных культур: здоровые доноры 2.00 мг $r=0.521$, $p<0.05$; 8.00 мг $r=0.675$, $p<0.05$; 16.00 мг $r=0.798$, $p<0.05$; 32.00 мг $r=0.434$, $p<0.05$; 64.00 мг $r=0.576$, $p<0.05$; больные РА, 2.00 мг $r=0.492$, $p<0.05$). Результаты регрессионного анализа выявили дозозависимое влияние Dex на снижение экспрессии гена TNF- α у здоровых доноров ($r^2=-0.791$, $p<0.05$) и у больных РА ($r^2=-0.536$, $p<0.05$). Следует отметить *более выраженные изменения, регистрируемые в пробах больных РА.*

Культивирование CD3⁺CD45RO⁺ клеток здоровых доноров в присутствии МР сопровождалось угнетением секреции TNF- α ($r^2 = - 0.670$, $p<0.05$) и снижением экспрессии гена мРНК ($r^2 = - 0.598$, $p<0.05$). У больных РА, при внесении в культуру активированных Т-клеток памяти МР, наблюдалось дозозависимое снижение продукции TNF- α ($r^2 = - 0.530$, $p<0.05$ – содержание в супернатантах клеточных культур; $r^2 = - 0.490$, $p<0.05$ - уровень экспрессии мРНК гена TNF- α).

Полученные нами данные согласуются с мировой периодикой. Выявлено супрессивное влияние пульс-терапии МР при РА на продукцию лейкоцитами периферической крови TNF- α [Sloka J.S. et al., 2005]. Учитывая ранее описанный механизм действия ГК, основанный на снижении активности STAT4 через прямое взаимодействие с транскрипционным фактором T-bet [Baschant U. et al., 2013], не исключается изменение уровня секреции цитокина, связанное с процессом фосфорилирования STAT4 [Lieberman A.C. et al., 2007]. Как и в случае IL-2, ГК могут супрессировать продукцию TNF- α за счет механизма прямого взаимодействия с мРНК гена TNF- α и последующей ее деградацией [Banuelos J. et al., 2016]. Исследования, посвященные поиску nGRE областей в области промотора гена TNF- α не дали положительного результата [Banuelos J. et al., 2016], однако, подобный механизм инактивации продукции TNF- α нельзя полностью исключать, так как известно, что полидромные последовательности ДНК отличаются нестабильной структурой, что затрудняет их идентификацию [Lieberman A.C. et al., 2007]. Таким образом, существует множество возможных молекулярных путей ГК-опосредованного механизма снижения экспрессии гена TNF- α , что только подтверждает факт жесткой регуляции экспрессии TNF- α с помощью транскрипционных и пост-транскрипционных механизмов [Shah S. et al., 2016].

Обнаруженная нами корреляционная взаимосвязь между содержанием IL-2 и TNF- α в супернатантах TCR-активированных CD3⁺CD45RO⁺ клеточных культур больных РА под влиянием Dex ($r = 0.430$, $r = 0.656$, при действии Dex в дозах 32.00 и 64.00 мг, соответственно, $p < 0.05$ во всех случаях) и МР ($r = 0.900$, $r = 0.637$, $r = 0.452$ при действии МР в дозах 46.20; 85.30 и 170.70 мг, соответственно, $p < 0.05$ во всех случаях) подтверждает единый механизм геномного действия исследуемых нами ГК [Lieberman A.C. et al., 2007].

Еще одним из медиаторов, играющим ключевую роль в патогенезе РА является IFN- γ . Исследования, проведенные на модельных животных, позволили выявить, что IFN- γ играет ключевую роль в инициации развития РА, его уровень повышается практически после первого столкновения Т-лимфоцитов с ауто-АГ [Tuncel J. et al., 2017]; тогда как нейтрализация IFN- γ предотвращала развитие тяжелого артрита у крыс [Tuncel J. et al., 2017].

Культивирование TCR-активированных CD3⁺CD45RO⁺ клеток, полученных у здоровых доноров с добавлением Dex сопровождалось умеренным супрессорным эффектом (*результаты регрессионного анализа* $r^2 = - 0.298$, $p < 0.05$) в отношении секреции IFN- γ , тогда как уровень экспрессии мРНК изучаемого гена в Т-клетках был сопоставим с контрольными значениями (*пробы только с добавлением активатора*).

В культурах больных РА, подвергнутых TCR-активации, Dex способствовал одновременному снижению уровня экспрессии мРНК гена IFN- γ в CD3⁺CD45RO⁺ клетках и его содержания в супернатантах клеточных культур (*результаты регрессионного анализа* - $r^2 = - 0.321$, $p < 0.05$). Влияние МР на уровень экспрессии мРНК гена IFN- γ и его секрецию Т-клетками больных РА носило дозозависимый угнетающий характер (*результаты регрессионного анализа* $r^2 = - 0.476$, $r^2 = - 0.673$, $p < 0.05$). Интересно отметить, что по аналогии с Dex, добавление МР в культуры TCR-активированных клеток, полученных у здоровых доноров, регистрировалось резкое снижение секреции Т-клетками IFN- γ , тогда как уровень экспрессии мРНК гена IFN- γ значимо не изменялся (таблица 12, рисунок 22).

Полученные нами данные, находят частичное отражение в мировой литературе [Noack M. et al., 2014]. Установлено, что фармакологические дозы ГК снижают синтез и секрецию IFN- γ , ингибируя активность T-bet зависимого фактора STAT4 [Ratman D. et al., 2013]. Описан также механизм супрессии гена IFN- γ за счет влияния ГК на комплекс транскрипционных факторов (AP-1/CREB/ATF), взаимодействующих с таргетной промоторной областью исследуемого гена, известный как непрямая трансрепрессия [Liberman A.C. et al., 2007]. Кроме того, не исключается участие ГК в механизмах постраскрипционной модификации мРНК гена IFN- γ (снижение стабильности мРНК гена) и в процессах трансляции этого фактора.

Учитывая роль клона Th17 лимфоцитов в патогенезе РА, мы провели исследование влияния ГК на продукцию CD3⁺CD45RO⁺ Т-клетками IL-17 и IL-21. Клинические исследования свидетельствуют, что IL-17, наряду с IFN- γ , является первичным эффекторным цитокином, опосредующим проявление симптомов при большинстве, но не всех, Th17-опосредованных АИЗ [Patel D.D., et al., 2015; Kerr J.R., 2016]. Ключевая роль IL-17 в индукции аутоиммунных нарушений

установлена как у животных [Ishigame H. et al., 2009; Banuelos J. et al., 2016; Wu Q. et al., 2016], так и у человека [Bishu S. et al., 2014; Patel D.D. et al., 2015; Banuelos J. et al., 2016; Wu Q. et al., 2016]. Интересным является тот факт, что в экспериментальной модели (мышь) IL-17 напрямую активировал Т- и В-лимфоциты во время фазы сенсибилизации, что в дальнейшем приводило к развитию АИЗ [Iwakura Y. et al., 2011; Rooleveld D.M. et al., 2015].

Как уже было описано ранее в обзоре литературы, у пациентов с РА высокое содержание IL-17 регистрируется в сыворотке крови и синовиальной жидкости [Brzustewicz E. et al., 2015; Alunno A. et al., 2015; Wu Q. et al., 2016]. Аналогичные данные получены с использованием экспериментальных животных моделей (крыса, мыши) [Astry B. et al., 2011]. Блокирование продукции IL-17 в модели коллаген-индуцированного артрита у мышей снижало воспалительную реакцию и костную деструкцию [Astry B. et al., 2011; Lee J. et al., 2015].

Влияние Dex (весь диапазон концентраций ГК) на CD3⁺CD45RO⁺ Т-клетки *здоровых доноров* в отношении продукции IL-17 и IL-21 носило угнетающий характер, при этом снижение уровня экспрессии мРНК гена IL-17 в Т-клетках и его содержания в супернатантах культур носило дозозависимый характер ($r^2 = - 0.533$, $r^2 = - 0.672$, $p < 0.05$) (таблица 13, рисунок 23). Интересно, что CD3⁺CD45RO⁺ Т-клетки больных РА были нечувствительны к супрессорному действию Dex в отношении секреции цитокинов IL-17 (2.00-16.00 мг) и IL-21 (весь диапазон концентраций) (таблицы 13, 14). Лишь максимальные дозы ГК (32.00-64.00 мг) достоверно снижали уровень экспрессии мРНК гена IL-17 и секрецию активированными CD3⁺CD45RO⁺ Т-клетками (таблица 13).

Добавление МР способствовало незначительному росту уровня относительной экспрессии мРНК генов IL-17 и IL-21 активированными Т-клетками в обеих группах (за исключением высоких концентраций ГК – 85.30 и 170.70 мг). Влияние МР (весь диапазон концентраций) на Т-клетки *здоровых доноров* в отношении секреции IL-21 носило резкий (равномерный) угнетающий характер, снижая содержание IL-21 в супернатантах клеточных культур, в среднем, в 3 раза (по сравнению с действием только активатора). Тогда как на CD3⁺CD45RO⁺ Т-клетки больных РА супрессивное действие оказывали только высокие дозы МР (85.30 и 170.70 мг). МР-индуцированное снижение секреции IL-17 Т-клетками в

культурах контрольной группы (дозозависимый эффект: $r^2 = -0.415$, $p < 0.05$) и больных РА ($r^2 = -0.512$, $p < 0.05$) вполне согласуется с данными литературы [Noack M. et al., 2016].

Данные литературы в отношении эффектов ГК на продукцию ИЛ-17 Т-клетками крайне противоречивы. Согласно одним источникам, Th17 клоны устойчивы к супрессорному влиянию ГК; более того, ГК опосредуют дифференцировку Th17-клеток *in vitro* [Banuelos J. et al., 2016]. Тогда как другими исследователями были получены прямо противоположные данные [Banuelos J. et al., 2016]. Noack M. (2016) был описан ингибиторный эффект ГК в отношении продукции ИЛ-17 *in vitro* в смешанной культуре периферических клеток крови и синовиоцитов больных РА [Noack M. et al., 2016]. ГК-опосредованное угнетение секреции ИЛ-17 Т-лимфоцитами ассоциируют с белок-белковыми взаимодействиями, при которых GR изолирует транскрипционные факторы (такие как STAT3, NFκB и AP-1) от промотора его гена [Pandya J.M. et al., 2016]. В источниках научной периодики данных, освещающих влияние ГК на продукцию Т-клетками памяти ИЛ-21, крайне мало. В целом, снижение уровня секреции ИЛ-21 Т-клетками связывают с прямым блокированием экспрессии гена ИЛ-21 за счет взаимодействия ГК с транскрипционным фактором AP-1/NFAT [Lieberman A.C. et al., 2007; Hermann-Kleiter N. et al., 2010]. Выявленные нами противоположные эффекты МР на уровень экспрессии мРНК и секрецию Т-клетками провоспалительных цитокинов ИЛ-17 и ИЛ-21 вполне согласуются с геномным действием ГК, опосредованным ранее описанным механизмом непрямого трансрепрессии, реализуемым через белок-белковые взаимодействия рецептора к ГК с транскрипционными факторами [Lieberman A.C. et al., 2007].

Проведенный нами корреляционный анализ позволил обнаружить взаимосвязь числа T_{EM} клеток с содержанием ИЛ-17 в супернатантах TCR-активированных $CD3^+CD45RO^+$ культур больных РА при действии Dex ($r = 0.563$, $r = 0.470$, $r = 0.783$, $r = 0.873$, $p < 0.05$ при добавлении в среду активатора и Dex в дозе 8.00, 16.00, 32.00 и 64.00 мг соответственно); с ИЛ-21 ($r = 0.352$, $r = 0.465$, $p < 0.05$ при добавлении в среду активатора и Dex в дозе 16.00 и 32.00 мг, соответственно) и IFN-γ ($r = 0.673$, $r = 0.782$, $r = 0.820$, $p < 0.05$ при добавлении в среду активатора и Dex в дозе 16.00, 32.00 и 64.00 мг, соответственно); а также содержания T_{EMRA} клеток с

уровнем экспрессии мРНК гена TNF-а ($r = 0.352$, $r = 0.611$, $p < 0.05$ при добавлении в среду активатора и Dex в дозе 32.00 и 64.00 мг соответственно) и его секрецией Т-клетками ($r = 0.642$, $r = 0.521$, $r = 0.591$, $p < 0.05$ при добавлении в среду активатора и Dex в дозе 16.00, 32.00 и 64.00 мг, соответственно); с уровнем экспрессии мРНК гена IFN- γ ($r = 0.290$, $r = 0.473$, $p < 0.05$ при добавлении в среду активатора и Dex в дозе 16.00 и 64.00 мг, соответственно).

Также нами обнаружены сильные корреляционные взаимосвязи между числом T_{EM} Т-лимфоцитов и уровнем IL-21 в супернатантах клеточных культур при сочетанном действии активатора и МР (все коэффициенты корреляции $r > 0.700$, $p < 0.05$), а также с содержанием IL-17 ($r = 0.563$, $r = 0.362$, $r = 0.471$, $p < 0.05$ при добавлении в среду активатора и МР в дозе 10.60, 21.30 и 85.30 мг, соответственно), уровнем экспрессии мРНК гена TNF-а ($r = 0.521$, $r = 0.348$, $p < 0.05$ при добавлении в среду активатора и МР в дозах 85.30 и 170.70 мг, соответственно) и содержанием TNF-а в супернатантах клеточных культур ($r = 0.341$, $r = 0.298$, $p < 0.05$ при добавлении в среду активатора и МР в дозах 21.30 и 85.30 мг, соответственно); числа T_{EMRA} клеток с уровнем экспрессии мРНК гена TNF-а ($r = 0.298$, $r = 0.520$, $r = 0.459$, $r = 0.673$, $p < 0.05$ при добавлении в среду активатора и МР в дозах 21.30, 42.60, 85.30 и 170.70, соответственно) и его секрецией Т-клетками ($r = 0.651$, $r = 0.720$, $p < 0.05$ при добавлении в среду активатора и МР в дозах 42.60 и 85.30 мг, соответственно); негативные с уровнем IL-2 в супернатантах клеточных культур ($r = -0.674$, $r = -0.873$, $r = -0.651$, $p < 0.05$ при добавлении в среду активатора и МР в дозах 42.60, 85.30, 170.70 мг, соответственно). Выявленные ассоциации могут свидетельствовать о резистентности эффекторных (T_{EM} , T_{EMRA}) популяций Т-клеток больных РА к противовоспалительному действию синтетических ГК и сохранению высокого провоспалительного потенциала

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя вышесказанное, можно выделить ряд закономерностей, отражающих *клеточно-молекулярные реакции* $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ Т-лимфоцитов определяющих процессы их созревания и функциональную активность на синтетические ГК в норме и при ревматоидном артрите, на фоне (TCR) CD2/CD3/CD28 – стимуляции в эксперименте *in vitro* (рисунок 27).

Согласно полученным нами результатам, синтетические ГК, ограничивая процессы активации и пролиферации $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ Т-клеток при РА, подавляют их чрезмерный рост. Рост числа эффекторных T_{EM} / T_{EMRA} лимфоцитов у больных РА может свидетельствовать об относительной резистентности этих клеток, возможно связанной с дефектами их апоптоза, к противовоспалительному супрессорному действию исследуемых ГК. Выявленные нами эффекторные популяции Т-лимфоцитов, вероятно, являются ключевыми участниками в патогенезе РА, ускоренно приобретающими свой негативный потенциал на фоне ГК терапии, способствуя прогрессии заболевания, в частности, за счет мощного выброса провоспалительных факторов (рисунок 27).

В целом, эффекты ГК на продукцию TCR-активированными $CD3^+CD45RO^+$ клетками провоспалительных факторов (IFN- γ , IL-2, IL-17, IL-21 и TNF- α) здоровых доноров и больных РА носят угнетающий характер, подтверждая общий иммуносупрессорный механизм действия ГК. Выявленные нами ассоциации между содержанием T_{EM} / T_{EMRA} клеток с показателями, отражающими продукцию провоспалительных медиаторов у больных РА, свидетельствуют о сохранении провоспалительного потенциала этих популяций эффекторных Т-клеток на фоне действия ГК. Мы предполагаем, что относительная резистентность эффекторных популяций (T_{EM} / T_{EMRA}) клеток больных РА к супрессорному действию ГК приводит к сохранению и усилению функциональных возможностей аутореактивных клеток в патогенезе РА.

Полученные нами результаты, безусловно, нуждаются в дальнейшем изучении. На наш взгляд, дальнейшее исследование механизмов клеточного и молекулярно-генетического контроля, обеспечивающих процессы активации и созревания Т-клеток памяти в ответ на воздействия антигенной и не антигенной природы в условиях ГК терапии, может иметь актуальность при детальном *изучении* ключевых звеньев патогенеза АИЗ, а также при оценке новых патогенетических подходов к лечению данной патологии. В целом, выявление механизмов действия синтетических глюкокортикоидов на процессы гомеостаза лимфоцитов позволит расширить представления о регулирующих механизмах адаптивного иммунитета на разных этапах его реализации в норме и при патологии, ассоциированной с дисрегуляцией иммунного ответа.

ВЫВОДЫ

1. Установлена однонаправленная, в большей степени выраженная у больных ревматоидным артритом, супрессия экспрессии молекул активации (CD25), костимуляции (CD28) и пролиферации (CD71) на TCR-стимулированных CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ Т-клетках, обусловленная введением синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона и метилпреднизолона) в супрафизиологических и терапевтических дозах *in vitro*.
2. Иммунофенотипические изменения CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ Т-клеток (увеличение числа лимфоцитов, экспрессирующих молекулы CD95 и HLA-DR на фоне снижения содержания CD28 - и CD45RO - позитивных клеток), ассоциированные со снижением экспрессии гена *hTERT*, свидетельствуют о процессах их созревания в эффекторные Т-клетки (T_{EM}, T_{EMRA}) как в норме, так и при ревматоидном артрите, в условиях *in vitro* TCR-активации и введения глюкокортикоидов.
3. Увеличение количества эффекторных T_{EM} и T_{EMRA} Т-лимфоцитов, индуцированное *in vitro* введением дексаметазона или метилпреднизолона на фоне TCR-активации, наряду с отсутствием корреляций с клеточной гибелью, свидетельствуют об относительной резистентности этих *популяций* лимфоцитов к супрессорному действию глюкокортикоидов у больных ревматоидным артритом (*но не у здоровых доноров*).
4. В системе *in vitro* синтетические глюкокортикоиды ингибируют (в большей степени у здоровых доноров) продукцию провоспалительных медиаторов (IFN- γ , IL-17, IL-21 и TNF- α) TCR-активированными CD3⁺CD45RO⁺ клетками.
5. Корреляционные связи между высоким содержанием эффекторных T_{EM} и T_{EMRA} Т-клеток и продукцией медиаторов воспаления у больных ревматоидным артритом, в условиях *in vitro* TCR-активации и введения супрессирующих доз синтетических глюкокортикоидов, является предиктором сохранения их аутоиммунного потенциала при патогенетически оправданной противовоспалительной терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранов А.А. Ювенильный артрит: клинические рекомендации для педиатров / А.А. Баранов, Е.И. Алексеева. - М.: ПедиатрЪ, 2013. - 120 с.
2. Видаль 2016. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России / под ред. Е. Толмачевой. - Видаль Рус, 2016. –2275 с.
3. Гуцол, А.А. Влияние дексаметазона на активацию и пролиферацию Т-клеток иммунной памяти / А.А. Гуцол, Н.А.Сохоневич, В.И. Селедцов, Л.С. Литвинова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Том 155, № 4. – С. 468–470.
4. Кремер, Н.Ш. Теория вероятностей и математическая статистика / Н.Ш. Кремер. - М.: ЮНИТИ-ДАНА, 2004. - 573 с.
5. Литвинова, Л.С. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов / Л.С. Литвинова, А.А. Гуцол, Н.А. Сохоневич и соавт. // Медицинская иммунология. - 2014. – Том 16, №1. – С. 7-26.
6. Симбирцев, А.С. Цитокины в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний человека. Аналитический обзор. / А.С. Симбирцев // Медицинский Академический Журнал. – 2013. – Том 13, №3. – С. 18-41.
7. Сохоневич Н.А. 2015. Роль цитокинов, имеющих общую γ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15), в регуляции функциональной активности Т-лимфоцитов. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Н.А. Сохоневич. – Калининград, 2015.– 24 с.
8. Сытыбалдиев, А.М. Лечение ревматической полимиалгии. / А.М. Сытыбалдиев // Современная ревматология. - 2013. – Том 7, №1. – С. 66-72.
9. Тодосенко, Н.М. Влияние *in vitro* метилпреднизолона на процессы активации Т-клеток CD4⁺CD45RO⁺ в норме и при ревматоидном артрите / Н.М. Тодосенко, О.Г. Хазиахматова, К.А. Юрова и соавт. // Цитология. – 2017. – Том.59, №6. – С. 421-427.
10. Баранов, А.А. Федеральные клинические рекомендации по оказанию медицинской помощи детям с ювенильным артритом / А.А. Баранов. – Москва, 2015. – 25 с.
11. Хазиахматова, О.Г. Роль стероидных гормонов в дифференцировке Т-лимфоцитов: молекулярно-генетический и иммуно-морфологический аспекты. Автореферат

- диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / О.Г. Хазиахматова. – Калининград, 2016.– 24 с.
12. Шуплецова, В.В. Стероидная регуляция функциональной активности Т-клеток разной степени дифференцировки. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / В.В. Шуплецова. – Калининград, 2015.– 24 с.
 13. Юрова, К.А. Роль цитокинов, имеющих общую γ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15) в регуляции механизмов молекулярно-генетического контроля дифференцировки Т-клеток. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / К.А. Юрова. – Калининград, 2015.– 24 с.
 14. Abdulahad, W.H. Persistent expansion of CD4⁺ effector memory T cells in Wegener's granulomatosis / W.H. Abdulahad, Y.M. van der Geld, C.A. Stegeman et al. // *Kidney Int.* – 2006. - Vol. 70(5) - P. 938-947.
 15. Acuto, O. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signaling / O. Acuto, F. Michel // *Nat Rev Immunol.* – 2003. – Vol.3 - P. 939-951.
 16. Afzali, B. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease / B. Afzali, G.Lombardi, R.I. Lechler et al.// *Clin Exp Immunol.* – 2007. - Vol.148. – P. 32-48.
 17. Agrati, C. Longitudinal characterization of dysfunctional T cell-activation during human acute Ebola infection / C. Agrati, C. Castilletti, R. Casetti et al. // *Cell Death Dis.* – 2016. - Vol.7. – P. 2164. doi: 10.1038/cddis.2016.55.
 18. Ahmad, S.F. Amelioration of autoimmune arthritis by naringin through modulation of T regulatory cells and Th1/Th2 cytokines / S.F. Ahmad, K.M. Zoheir, H.E. Abdel-Hamied et al. // *Cell Immunol.*- 2014. - Vol.287(2) – P. 112-120. doi: 10.1016/j.cellimm.2014.01.001.
 19. Akbar, A.N. Will telomere erosion lead to a loss of T-cell memory? / A.N. Akbar, P.C. Beverley, M. Salmon // *Nat Rev Immunol.* – 2004. - Vol.4(9) – P. 737-743. doi: 10.1038/nri1440.
 20. Aldahlawi, A.M. Chemokine receptors expression on peripheral CD4-lymphocytes in rheumatoid arthritis: Coexpression of CCR7 and CD95 is associated with disease activity / A.M. Aldahlawi, M.F. Elshal, F.T. Ashgan et al. // *Saudi J Biol Sci.* – 2015. - Vol.22(4) – P. 453-458. doi: 10.1016/j.sjbs.2015.02.011.

21. Altonsy, M.O. Context-dependent cooperation between nuclear factor κ B (NF- κ B) and the glucocorticoid receptor at a TNFAIP3 intronic enhancer: a mechanism to maintain negative feedback control of inflammation / M.O. Altonsy, S.K. Sasse, T.L. Phang et al.// *J Biol Chem.* – 2014. - Vol.289(12) – P. 8231-8239. doi: 10.1074/jbc.M113.545178.
22. Alunno, A. Altered immunoregulation in rheumatoid arthritis: the role of regulatory T cells and proinflammatory Th17 cells and therapeutic implications / A. Alunno, M. Manetti, S. Caterbi et al.// *Mediators Inflamm.* – 2015.- P. 1-12. doi: 10.1155/2015/751793.
23. Amsen, D. Decisions on the road to memory / D. Amsen, R.A. Backer, C. Helbig // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2013.- Vol.785. – P. 107-120.
24. Anderson, R. Smoking and Air Pollution as Pro-Inflammatory Triggers for the Development of Rheumatoid Arthritis / R. Anderson, P.W. Meyer, M.M. Ally et al. // *Nicotine Tob Res.* – 2016. - Vol.18(7). – P. 1556-1565. doi: 10.1093/ntr/ntw030.
25. Annunziato, F. Reasons for rarity of Th17 cells in inflammatory sites of human disorders / F. Annunziato, V. Santarlasci, L. Maggi et al. // *Seminars in Immunology.* – 2013. - Vol.25(4). – P. 299-304.
26. Antunica-Noguerol, M. The activity of the glucocorticoid receptor is regulated by SUMO conjugation to FKBP51 / M. Antunica-Noguerol, M.L. Budziński, J. Druker et al. // *Cell Death Differ.* – 2016.- Vol.23(10). – P. 1579-1591. doi: 10.1038/cdd.2016.44.
27. Appleman, L.J. T cell anergy and costimulation / L.J. Appleman, V.A.Boussiotis // *Immunol Rev.* – 2003.- Vol.192 – P. 161-180.
28. Arakaki, R. The impact of dermatology consultation on diagnostic accuracy and antibiotic use among patients with suspected cellulitis seen at outpatient internal medicine offices: a randomized clinical trial / R.Y. Arakaki, L. Strazzula, E. Woo et al. // *JAMA Dermatol.* – 2014. - Vol.150(10) – P. 1056-1061. doi: 10.1001/jamadermatol.2014.1085.
29. Aringer, M. Therapeutic blockade of TNF in patients with SLE-promising or crazy? / M. Aringer, J.S. Smolen // *Autoimmun Rev.* – 2012. - Vol.11(5) – P. 321-325. doi: 10.1016/j.autrev.2011.05.001.
30. Arruvito, L. Identification and clinical relevance of naturally occurring human CD8+HLA-DR+ regulatory T cells / L. Arruvito, F. Payaslián, P. Baz et al.// *J Immunol.* – 2014.- Vol.193(9). – P. 4469-4476. doi: 10.4049/jimmunol.1401490.

31. Asai, S. Predictors of biologic discontinuation due to insufficient response in patients with rheumatoid arthritis who achieved clinical remission with biologic treatment: A multicenter observational cohort study / S. Asai, T. Fujibayashi, T. Oguchi et al. // *Mod Rheumatol.* – 2017. - Vol.13. – P. 1-6. doi: 10.1080/14397595.2017.1332558.
32. Astry, B. A cytokine-centric view of the pathogenesis and treatment of autoimmune arthritis / B. Astry, E. Harberts, K.D. Moudgil // *J Interferon Cytokine Res.* – 2011. - Vol.31(12). – P. 927-940. doi: 10.1089/jir.2011.0094.
33. Aubert, G. Telomeres and aging / G. Aubert, P.M. Lansdorp // *Physiol Rev.* – 2008. - Vol.88(2). – P. 557-579. doi: 10.1152/physrev.00026.2007.
34. Aurora, A.B. NF-kappaB balances vascular regression and angiogenesis via chromatin remodeling and NFAT displacement / A.B. Aurora, D. Biyashev, Y. Mirochnik, et al. // *Blood.* – 2010. - Vol.116(3). – P. 475-484. doi: 10.1182/blood-2009-07-232132.
35. Ayroldi, E. Targeting glucocorticoid side effects: selective glucocorticoid receptor modulator or glucocorticoid-induced leucine zipper? A perspective / E. Ayroldi, A. Macchiarulo, C. Riccardi // *FASEB J.* – 2014. - Vol.28(12). – P. 5055-5070. doi: 10.1096/fj.14-254755.
36. Bagherpour, B. The influence of iron loading and iron chelation on the proliferation and telomerase activity of human peripheral blood mononuclear cells / B. Bagherpour, M. Gharagozloo, B. Moayedi // *Iran J Immunol.* – 2009. - Vol.6(41). – P. 33-39. doi: IJiv6i1A5.
37. Bangs, S.C. Human CD4⁺ memory T cells are preferential targets for bystander activation and apoptosis // S.C. Bangs, D. Baban, H.J. Cattan et al. // *J Immunol.* – 2009.- Vol.182(4). – P. 1962-1971. doi: 10.4049/jimmunol.0802596.
38. Bansal, A.S. T helper cell subsets in arthritis and the bene Wts of immunomodulation by 1,25(OH)₂ vitamin D / A.S. Bansal // *Rheumatol Int.* – 2012 - Vol.32(4). – P. 845-852. doi: 10.1007/s00296-011-2077-6.
39. Banuelos, J. A gradient of glucocorticoid sensitivity among helper T cell cytokines / J. Banuelos , N.Z. Lu // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2016.- Vol.31. – P. 27-35. doi: 10.1016/j.cytogfr.2016.05.002.
40. Barzilai, O. Viral infection can induce the production of autoantibodies / O. Barzilai, M. Ram, Y. Shoenfeld // *Curr Opin Rheumatol.* – 2007.- Vol.19(6). – P. 636-643.

41. Bas, S. Diagnostic tests for rheumatoid arthritis: comparison of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, anti-keratin antibodies and IgM rheumatoid factors / S. Bas, T.V. Perneger, M. Seitz et al. // *Rheumatology (Oxford)*. – 2002.- Vol.41(7). – P. 809-814.
42. Baschant, U. Glucocorticoid therapy of antigen-induced arthritis depends on the dimerized glucocorticoid receptor in T cells / U. Baschant, L. Frappart, U. Rauchhaus et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2011.- Vol.108(48). – P. 19317-19322. doi: 10.1073/pnas.1105857108.
43. Baschant, U. Molecular determinants of glucocorticoid actions in inflammatory joint diseases / U. Baschant, S. Culemann, J. Tuckermann // *Mol Cell Endocrinol*. – 2013.- Vol.380(1-2). – P. 108-118. doi: 10.1016/j.mce.2013.06.009.
44. 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. doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.03.058.
45. Basdeo, S.A. Polyfunctional, pathogenic CD161⁺ Th17 lineage cells are resistant to regulatory T cell-mediated suppression in the context of autoimmunity / S.A. Basdeo, B. Moran, D. Cluxton et al. // *J Immunol*. – 2015.- Vol.195. – P. 528-540.
46. Baumann, S. 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. doi: 10.1182/blood-2004-11-4390.
47. Beirne, C. Age-related declines and disease-associated variation in immune cell telomere length in a wild mammal / C. Beirne, R. Delahay, M. Hares et al. // *PLoS One*. – 2014. - Vol.9(9). doi: 10.1371/journal.pone.0108964.
48. Beltrametti, S.P. Chronotherapy with low-dose modified-release prednisone for the management of rheumatoid arthritis: a review / S.P. Beltrametti , A. Ianniello, C. Ricci // *Ther Clin Risk Manag*. – 2016. - Vol.12. – P. 1763-1776.
49. Bender, P. Serum antibody levels against *Porphyromonas gingivalis* in patients with and without rheumatoid arthritis - a systematic review and meta-analysis / P. Bender, W.B. Bürgin, A. Sculean et al. // *Clin Oral Investig*. – 2017.- Vol.21(1). – P. 33-42. doi: 10.1007/s00784-016-1938-5.

50. 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. doi: 10.1016/j.mce.2012.08.012.
51. Berki, T. Glucocorticoid (GC) sensitivity and GC receptor expression differ in thymocyte subpopulations / T. Berki, L. Pálkás, F. Boldizsár et al. // *Int Immunol.* – 2002. - Vol.14(5). – P. 463-469.
52. Bernard, N.J. Who knows why regulatory T cells are defective in RA ... IDO / N.J. Bernard // *Nature Reviews Rheumatology.* – 2014.- Vol.10(7). – P. 381. doi:10.1038/nrrheum.2014.96.
53. Bertho, N. HLA-DR-mediated apoptosis susceptibility discriminates differentiation stages of dendritic/monocytic APC / N. Bertho, B. Drénou, B. Laupeze et al. // *J Immunol.* – 2000. - Vol.164(5). – P.2379-2385.
54. Bhargava, P. Novel therapies for memory cells in autoimmune diseases / P. Bhargava, P.A. Calabresi // *Clin Exp Immunol.* – 2015.- Vol.180(3). – P. 353-360. doi: 10.1111/cei.12602.
55. Biddie, S.C. Genome-wide mechanisms of nuclear receptor action / S.C. Biddie, S. John, G.L. Hager // *Trends Endocrinol Metab.* – 2010.- Vol.21. – P. 3.
56. Biddie, S.C. Transcription Factor AP1 Potentiates Chromatin Accessibility and Glucocorticoid Receptor Binding / S.C. Biddie, S. John , P.J. Sabo et al. // *Mol Cell.* – 2011.- Vol.43(1). – P. 145-155. doi: 10.1016/j.molcel.2011.06.016.
57. Billiau, A. Interferon-gamma: a historical perspective / A. Billiau, P. Matthys // *Cytokine Growth Factor Rev.*- 2009.- Vol.20(2). – P. 97-113. doi: 10.1016/j.cytogfr.2009.02.004.
58. Birru Talabi, M. HLA-Shared Epitope, Inflammation, Mortality, CVD and Malignancy Among Postmenopausal Women With and Without Rheumatoid Arthritis in the Women's Health / M. Birru Talabi, R.H. Mackey, L.H. Kuller et al. // *Am J Epidemiol.* – 2017. doi: 10.1093/aje/kwx087.
59. Bishu, S. Rheumatoid arthritis patients exhibit impaired *Candida albicans*-specific Th17 responses / S. Bishu, E.W. Su, E.R. Wilkerson et al. // *Arthritis Res Ther.* – 2014. - Vol.16(1). – P. 50. doi: 10.1186/ar4480.
60. Bjelaković, G. Metabolic correlations of glucocorticoids and polyamines in inflammation and apoptosis / G. Bjelaković, I. Stojanović, T. Jevtović Stoimenov et al. // *Amino Acids.* – 2010.- Vol.39(1). – P. 29-43. doi: 10.1007/s00726-010-0489-3.

61. Black, R.J. Half of UK patients with rheumatoid arthritis are prescribed oral glucocorticoid therapy in primary care: a retrospective drug utilisation study / R.J. Black, R.M. Joseph, B. Brown et al. // *Arthritis Res Ther.* – 2015.- Vol.17. – P. 375. doi: 10.1186/s13075-015-0895-8.
62. Blüml, S. Phosphatase and tensin homolog (PTEN) in antigen-presenting cells controls Th17-mediated autoimmune arthritis / S. Blüml, E. Sahin, V. Saferding et al. // *Arthritis Res Ther.* – 2015. doi: 10.1186/s13075-015-0742-y.
63. Boesteanu, A.C. Memory T cells need CD28 costimulation to remember/ A.C. Boesteanu, P.D. Katsikis // *Semin Immunol.* – 2009.- Vol.21.– P. 69-77.
64. Boissier, M.C. Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction / M.C. Boissier , L. Semerano , S. Challal et al. // *J Autoimmun.* – 2012.- Vol.39(3).– P. 222-228. doi: 10.1016/j.jaut.2012.05.021.
65. Boissier, M.C. Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/treg: the changing rheumatoid arthritis paradigm / M.C. Boissier, E. Assier, G. Falgarone et al. // *Joint Bone Spine.* – 2008. - Vol.75(4).– P. 373-375. doi: 10.1016/j.jbspin.2008.04.005.
66. Boldizar, F. ZAP-70 tyrosines 315 and 492 transmit non-genomic glucocorticoid (GC) effects in T cells / F. Boldizar , M. Szabo , K. Kvell et al. // *Mol Immunol.* – 2013. - Vol.53(1-2).– P. 111-117. doi: 10.1016/j.molimm.2012.07.007.
67. Bossowski, A. Analysis of changes in the percentage of B (CD19) and T (CD3) lymphocytes, subsets CD4, CD8 and their memory (CD45RO), and naive (CD45RA) T cells in children with immune and non-immune thyroid diseases / A. Bossowski, M. Urban, A. Stasiak-Barmuta // *J Pediatr Endocrinol Metab.* – 2003. - Vol.16(1).– P. 63-70.
68. Brasted, M. Blockade of IFN-gamma does not affect the arthritogenicity of T cells generated during the induction of adjuvant arthritis but exacerbates the polyarthritis produced by adoptive transfer of arthritogenic effector cells / M. Brasted, L.D. Spargo, G. Mayrhofer et al. // *Immunol Cell Biol.* – 2005. - Vol.83(2).– P. 189-195. doi: 10.1111/j.1440-1711.2005.01313.x
69. Brennan, F.M. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis / F.M. Brennan, I.B. McInnes // *J Clin Invest.* – 2008. - Vol.118(11).– P. 3537-3545. doi: 10.1172/JCI36389.

70. Brenner, D. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die / D. Brenner, H. Blaser, T.W.Mak // *Nat Rev Immunol.* – 2015. - Vol.15 (6).– P. 362-374. doi: 10.1038/nri3834.
71. Broadley, I. Expansions of Cytotoxic CD4⁺CD28⁻ T Cells Drive Excess Cardiovascular Mortality in Rheumatoid Arthritis and Other Chronic Inflammatory Conditions and Are Triggered by CMV Infection / I. Broadley, A. Pera, G. Morrow et al. // *Front Immunol.* – 2017. - Vol.8.– P. 195. doi: 10.3389/fimmu.2017.00195.
72. Broux, B. Pathogenic features of CD4⁺CD28⁻ T cells in immune disorders / B. Broux, S. Markovic-Plese, P. Stinissen et al. // *Trends Mol Med.* – 2012. - Vol.18.– P. 446-453.
73. Brzustewicz, E. The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis— Practical and potential application of cytokines as biomarkers and targets of personalized therapy / E. Brzustewicz, E. Bryl // *Cytokine.* – 2015. - Vol.76 (2).– P. 527-536. doi: 10.1016/j.cyto.2015.08.260.
74. Buck, M.D. T cell metabolism drives immunity / M.D. Buck, D. O'Sullivan, E.L. Pearce // *J Exp Med.* – 2015. - Vol.212(9).– P. 1345-1360. doi: 10.1084/jem.20151159.
75. Butler, J.S. Silencing Dkk1 expression rescues dexamethasone-induced suppression of primary human osteoblast differentiation / J.S. Butler, J.M. Queally, B.M. Devitt et al. // *BMC Musculoskeletal Disorders.* – 2010. - Vol.11.– P. 210.
76. Byng-Maddick, R. The impact of biological therapy on regulatory T cells in rheumatoid arthritis / R. Byng-Maddick, M.R.Ehrenstein // *Rheumatology (Oxford).* – 2015. - Vol.54(5).– P. 768-775. doi: 10.1093/rheumatology/keu487.
77. Bystrom, J. TNF α in the regulation of Treg and Th17 cells in rheumatoid arthritis and other autoimmune inflammatory diseases / J. Bystrom, F.I. Clanchy, T.E. Taher et al. // *Cytokine.* – 2016. - Vol.14.– P. -. doi: 10.1016/j.cyto.2016.09.001.
78. Camargo, J.F. CCR5 expression levels influence NFAT translocation, IL-2 production, and subsequent signaling events during T lymphocyte activation / J.F. Camargo, M.P. Quinones, S. Mummidi et al. // *J Immunol.* – 2009. - Vol.182(1).– P. 171-182.
79. Campisi, J. Cellular senescence: when bad things happen to good cells / J. Campisi, F. d'Adda di Fagagna // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2007. - Vol.8.– P. 729-740.
80. Cénit, M.C. No evidence of association between common autoimmunity STAT4 and IL23R risk polymorphisms and non-anterior uveitis / M.C. Cénit, A. Márquez, M.

- Cordero-Coma et al. // PLoS One. -2013. - Vol.8(11). doi: 10.1371/journal.pone.0072892.
81. Ceribelli, A. MicroRNAs and autoimmunity / A. Ceribelli, M. Satoh, E.K.L. Chan // *Curr Opin Immunol.* – 2012. - Vol.24(6).– P. 686-691. doi:10.1016/j.coi.2012.07.011.
 82. Chalan, P. Rheumatoid Arthritis, Immunosenescence and the Hallmarks of Aging / P. Chalan, A. van den Berg, B.J. Kroesen et al. // *Curr Aging Sci.* – 2015. - Vol.8(2).– P. 131-146.
 83. Chang, J.T. Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation / J.T. Chang, E.J. Wherry, A.W. Goldrath // *Nat. Immunol.* – 2014. - Vol.15.– P. 1104-1115.
 84. Chao, W.C. Association between a history of mycobacterial infection and the risk of newly diagnosed Sjögren's syndrome: A nationwide, population-based case-control study / W.C. Chao, C.H. Lin, T.L. Liao et al. // *PLoS One.* – 2017. - Vol.12(5).– P. -. doi: 10.1371/journal.pone.0176549.
 85. Chemin, K. Is rheumatoid arthritis an autoimmune disease? / K. Chemin, L. Klareskog, V. Malmström // *Curr Opin Rheumatol.* – 2016. - Vol.28(2).– P. 181-188. doi: 10.1097/BOR.0000000000000253.
 86. Chen, J. Comprehensive evaluation of different T helper cell subsets differentiation and function in rheumatoid arthritis / J. Chen, J. Li, H. Gao et al. // *J Biomed Biotechnol.* – 2012. - P. 5353-5361.
 87. Chen, J. Understanding the Regulatory Roles of Natural Killer T Cells in Rheumatoid Arthritis: T Helper Cell Differentiation Dependent or Independent? / J. Chen, J. Yang, Y. Qiao, X. Li // *Scand J Immunol.* – 2016. - Vol.84(4).– P. 197-203. doi: 10.1111/sji.12460.
 88. 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.
 89. Chimenti, M.S. The interplay between inflammation and metabolism in rheumatoid arthritis / M.S. Chimenti, P. Triggianese, P. Conigliaro et al. // *Cell Death and Disease.* – 2015. - Vol.6. – P. 1887. doi:10.1038/cddis.2015.246.
 90. Cho, B.A. Characterization of effector memory CD8⁺ T cells in the synovial fluid of rheumatoid arthritis / B.A. Cho, J.H. Sim, J.A. Park // *J Clin Immunol.* – 2012. - Vol.32(4). – P. 709-720. doi: 10.1007/s10875-012-9674-3.

91. Cho, H. Glucocorticoid receptor interacts with PNR2 in a ligand-dependent manner to recruit UPF1 for rapid mRNA degradation / H. Cho, O.H. Park, J. Park et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2015. - Vol. . – P.
92. Chu, C.Q. Interferon-gamma regulates susceptibility to collagen-induced arthritis through suppression of interleukin-17 / C.Q. Chu , D. Swart , D. Alcorn et al. // *Arthritis Rheum.* – 2007. - Vol.56(4). – P. 1145-1151. doi: 10.1002/art.22453.
93. Chu, Y. A preliminary study on the characterization of follicular helper T (Tfh) cells in rheumatoid arthritis synovium / Y. Chu, F. Wang, M. Zhou et al. // *Acta Histochem.* – 2014. - Vol.116(3). – P. 539-543. doi: 10.1016/j.acthis.2013.10.009.
94. Clark, R.A. Resident memory T cells in human health and disease / R.A. Clark // *Sci Transl Med.* – 2015. - Vol.7(269). – P. - . doi: 10.1126/scitranslmed.3010641.
95. Colella, M.P. Telomere length correlates with disease severity and inflammation in sickle cell disease / M.P. Colella, B.A. Santana, N. Conran et al. // *Rev Bras Hematol Hemoter.* – 2017. - Vol.39(42). – P. 140-145. doi: 10.1016/j.bjhh.2017.02.007.
96. Colmegna, I. Defective proliferative capacity and accelerated telomeric loss of hematopoietic progenitor cells in rheumatoid arthritis / I. Colmegna, A. Diaz-Borjon, H. Fujii et al. // *Arthritis Rheum.* – 2008. - Vol.58(4). – P. 990-1000. doi: 10.1002/art.23287.
97. Cosmi, L. Evidence of the transient nature of the Th17 phenotype of CD4⁺CD161⁺ T cells in the synovial fluid of patients with juvenile idiopathic arthritis / L. Cosmi, R. Cimaz, L. Maggi et al. // *Arthritis and Rheumatism.* – 2011. - Vol.63(8). – P. 2504-2515.
98. Cosmi, L. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161⁺CD4⁺ T cell precursor / L. Cosmi, R. De Palma, V. Santarlasci et al. // *Journal of Experimental Medicine.* – 2008. - Vol.205(8). – P. 1903-1916.
99. Crockard, A.D. CD4 subsets (CD45RA/RO) exhibit differences in proliferative responses, iL-2 and y-interferon production during intravenous methylprednisolone treatment of multiple sclerosis // A.D. Crockard, M.T. Treacy, A.G. Droogan et al. // *J Neurol.* – 1996. - Vol.243. – P. 475-481.
100. Cross, M. The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study / M. Cross, E. Smith, D. Hoy et al. // *Ann Rheum Dis.* – 2014. - Vol.73. – P. 1316-1322.
101. Danke, N.A. Autoreactive T cells in healthy individuals / N.A. Danke, D.M. Koelle, C. Yee et al. // *J Immunol.* – 2004. - Vol.172(10). – P. 5967-5972.

102. Dasgupta, S. Nuclear receptor coactivators: master regulators of human health and disease / S. Dasgupta, D.M. Lonard, B.W. O'Malley // *Annu Rev Med.* – 2014. - Vol.65. – P. 279-292. doi: 10.1146/annurev-med-051812-145316.
103. De Bosscher, K. Selective glucocorticoid receptor modulators / K. De Bosscher // *J Steroid Biochem Mol Biol.* – 2010. - Vol.120. – P. 96-104.
104. de Salvi Guimarães, F. Dexamethasone-induced cardiac deterioration is associated with both calcium handling abnormalities and calcineurin signaling pathway activation / F. de Salvi Guimarães, W.M. de Moraes, L.H. Bozi et al. // *Mol Cell Biochem.* – 2017. - Vol.424(1-2). – P. 87-98. doi: 10.1007/s11010-016-2846-3.
105. Dejaco, C. Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases / C. Dejaco, C. Duftner, B. Grubeck-Loebenstern et al. // *Immunology.* – 2006. - Vol.117. – P. 289-300.
106. Di Sante, G. Collagen Specific T-Cell Repertoire and HLA-DR Alleles: Biomarkers of Active Refractory Rheumatoid Arthritis / G. Di Sante, B. Tulusso, A. L. Fedele et al. // *EBioMedicine.* – 2015. - Vol.2. – P. 2037-2045. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.11.019.
107. Dong, H. CD70 and IFN-1 selectively induce eomesodermin or T-bet and synergize to promote CD8⁺ T-cell responses / H. Dong, N.A. Franklin, S.B. Ritchie et al. // *Eur J Immunol.* – 2015. - Vol.45(12). – P. 3289-3301. doi: 10.1002/eji.201445291.
108. Draborg, A.H. Epstein-Barr Virus in Systemic Autoimmune Diseases / A.H. Draborg, K. Duus, G. Houen // *Clinical and Developmental Immunology.* – 2013. - <http://dx.doi.org/10.1155/2013/535738>.
109. Duma, D. Generating diversity in glucocorticoid receptor signaling: mechanisms, receptor isoforms, and post-translational modifications / D. Duma, J.A.Cidlowski // *Horm Mol Biol Clin Investig.* – 2010. - Vol.3(1). – P. 319-328. doi: 10.1515/HMBCI.2010.039.
110. Dumitriu, I.E. High levels of costimulatory receptors OX40 and 4-1BB characterize CD4⁺CD28null T cells in patients with acute coronary syndrome / I.E. Dumitriu, P. Baruah, C.J. Finlayson et al. // *Circ Res.* – 2012. - Vol.110. – P. 857-869.
111. Dumitriu, I.E. The life (and death) of CD4⁺CD28null T cells in inflammatory diseases / I.E. Dumitriu // *Immunology.* – 2015. - Vol.146(2). – P. 185-193. doi: 10.1111/imm.12506.

112. Duraisingam, S.S. TLR-stimulated CD34 stem cell-derived human skin-like and monocyte-derived dendritic cells fail to induce Th17 polarization of naive T cells but do stimulate Th1 and Th17 memory responses / S.S. Duraisingam, J. Hornig, F. Gotch et al. // *J Immunol.* – 2009. - Vol.183(4). – P. 2242-2251. doi: 10.4049/jimmunol.0900474.
113. Durán-Avelar, M.J. STAT4 rs7574865 G/T polymorphism is associated with rheumatoid arthritis and disease activity, but not with anti-CCP antibody levels in a Mexican population / M.J. Durán-Avelar, N. Vibanco-Pérez, R.R. Hernández-Pacheco et al. // *Clin Rheumatol.* – 2016. - Vol.35(12). – P. 2909-2914.
114. Du-Thanh, A. High Expression of Fas/CD95 on CD4⁺ Circulating T Cells: An Exclusion Criterion in the Diagnosis of Mycosis Fungoides? / A. Du-Thanh, P. Portalès, A. Serre-Cousiné et al. // *Acta Derm Venereol.* – 2017. - Vol.97(7). – P. 834-837. doi: 10.2340/00015555-2632.
115. Earl, L.A. CD45 Glycosylation controls T-cell life and death / L.A. Earl, L.G. Baum // *Immunol Cell Biol.* – 2008. - Vol.86(7). – P. 608-615. doi: 10.1038/icb.2008.46.
116. Echeverría, A. CD4⁺CD28null T lymphocytes resemble CD8⁺CD28null T lymphocytes in their responses to IL-15 and IL-21 in HIV-infected patients / A. Echeverría, M.A. Moro-García, V. Asensi et al. // *J Leukoc Biol.* – 2015. - Vol.98(3). – P. 373-384. doi: 10.1189/jlb.1A0514-276RR.
117. Ehrenstein, M.R. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy / M.R. Ehrenstein, J.G. Evans, A. Singh et al. // *J Exp Med.* – 2004. - Vol.200. – P. 277-285. doi:10.1084/jem.20040165.
118. Elshabrawy, H.A. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis / H.A. Elshabrawy, Z. Chen, M.V. Volin et al. // *Angiogenesis.* – 2015. - Vol.18(4). – P. 433-448. doi: 10.1007/s10456-015-9477-2.
119. Elyaman, W. 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. doi: 10.2353/ajpath.2008.080142.
120. Érsek, B. CD3ζ-chain expression of human T lymphocytes is regulated by TNF via Src-like adaptor protein-dependent proteasomal degradation / B. Érsek, V. Molnár, A. Balogh et al. // *J Immunol.* – 2012. - Vol.189(4). – P. 1602-1610. doi: 10.4049/jimmunol.1102365.

121. Fagin, U. Increased frequency of CCR4⁺ and CCR6⁺ memory T-cells including CCR7⁺CD45RA med very early memory cells in granulomatosis with polyangiitis (Wegener's) / U. Fagin // *Arthritis Res Ther.* – 2012. - Vol.14(2). – P. 73. doi: 10.1186/ar3794.
122. Farber, D.L. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis / D.L. Farber, N.A. Yudanin, N.P. Restifo // *Nat Rev Immunol.* – 2014. - Vol.14(1). – P. 24-35. doi: 10.1038/nri3567.
123. Fasth, A.E. Skewed distribution of proinflammatory CD4⁺CD28null T cells in rheumatoid arthritis / A.E. Fasth, O. Snir, A.A. Johansson et al. // *Arthritis Res Ther.* – 2007. - Vol.9. – P. 87.
124. Favalli, E.G. Structural integrity versus radiographic progression in rheumatoid arthritis / E.G. Favalli , A. Becciolini , M. Biggioggero // *RMD Open.* – 2015. - Vol.1. – P. . doi: 10.1136/rmdopen-2015-000064.
125. Ferreira, J.F. Glucocorticoids and Rheumatoid Arthritis / J.F. Ferreira, A.A. Ahmed Mohamed, P. Emery // *Rheum Dis Clin North Am.* – 2016. - Vol.42(1). – P. 33-46. doi: 10.1016/j.rdc.2015.08.006.
126. Fessler, J. Novel Senescent Regulatory T-Cell Subset with Impaired Suppressive Function in Rheumatoid Arthritis / J. Fessler, A. Raicht, R. Husic et al. // *Front Immunol.* – 2017. - Vol.8. – P. 300. doi: 10.3389/fimmu.2017.00300.
127. Fessler, J. Premature senescence of T-cell subsets in axial spondyloarthritis / J. Fessler, A. Raicht, R. Husic et al. // *Ann Rheum Dis.* – 2016. - Vol.75(4). – P. 748-754. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-206119.
128. Fessler, J. Therapeutic potential of regulatory T cells in autoimmune disorders / J. Fessler, A. Felber, C. Duftner // *BioDrugs.* – 2013. - Vol.27. – P. 281-291. doi:10.1007/s40259-013-0026-5.
129. Firestein, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis / G.S. Firestein // *Nature.* – 2003. - Vol.423. – P. 356-361.
130. Firestein, G.S. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis / G.S. Firestein, I.B. McInnes // *Immunity.* – 2017. - Vol.46(2). – P. 183-196. doi: 10.1016/j.immuni.2017.02.006.

131. Fisher, A. Heterogeneity in Comparisons of Discontinuation of Tumor Necrosis Factor Antagonists in Rheumatoid Arthritis - A Meta-Analysis / A. Fisher, K. Bassett, G. Goel et al. // *PLoS One*. – 2016. - Vol.11(12). doi: 10.1371/journal.pone.0168005.
132. Fletcher, J.M. Cytomegalovirus-specific CD4⁺ T cells in healthy carriers are continuously driven to replicative exhaustion / J.M. Fletcher, M. Vukmanovic-Stejic, P.J. Dunne et al. // *J Immunol*. – 2005. - Vol.175(12). – P. 8218-8225.
133. Flytlie, H.A. Expression of MDC/CCL22 and its receptor CCR4 in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis / H.A. Flytlie, M. Hvid, E. Lindgreen et al. // *Cytokine*. – 2010. - Vol.49. – P. 24-29.
134. Fournier, C. Where do T cells stand in rheumatoid arthritis? / C. Fournier // *Joint Bone Spine*. – 2005. - Vol.72(6). – P. 527-532.
135. Franchimont, D. Inhibition of Th1 immune response by glucocorticoids: dexamethasone selectively inhibits IL-12-induced Stat4 phosphorylation in T lymphocytes / D. Franchimont, J. Galon, M. Gadina et al. // *J Immunol*. – 2000. - Vol.119(1). – P. 64-68.
136. Fritsch, R.D. Stepwise differentiation of CD4 memory T cells defined by expression of CCR7 and CD27 / R.D. Fritsch, X. Shen, G.P. Sims et al. // *J Immunol*. – 2005. - Vol.175(10). – P. 6489-6497.
137. Fujii, H. Telomerase insufficiency in rheumatoid arthritis / H. Fujii, L. Shao, I. Colmegna et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2009. - Vol.106. – P. 4360-4365.
138. Furlan, G. Phosphatase CD45 both positively and negatively regulates T cell receptor phosphorylation in reconstituted membrane protein clusters / G. Furlan, T. Minowa, N. Hanagata et al. // *J Biol Chem*. – 2014. - Vol.289(41). – P. 28514-28525. doi: 10.1074/jbc.M114.574319.
139. Furst, D.E. Rheumatoid arthritis pathophysiology: update on emerging cytokine and cytokine-associated cell targets / D.E. Furst, P. Emery // *Rheumatology (Oxford)*. – 2014. - Vol.53(9). – P. 1560-1569. doi: 10.1093/rheumatology/ket414.
140. Gabryel, M. The impact of genetic factors on response to glucocorticoids therapy in IBD / M. Gabryel, M. Skrzypczak-Zielinska, M.A. Kucharski et al. // *Scand J Gastroenterol*. – 2016. - Vol.51(6). – P. 654-665. doi: 10.3109/00365521.2015.1132336.
141. Gaffen, S.L. The role of interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis / S.L. Gaffen // *Curr Rheumatol Rep*. – 2009. - Vol.11(5). – P. 365-370.

142. Gagliani, N. Basic Aspects of T Helper Cell Differentiation / N. Gagliani, S. Huber // *Methods Mol Biol.* – 2017. - Vol.1514. – P. 19-30.
143. Gajate, C. Lipid raft-mediated Fas/CD95 apoptotic signaling in leukemic cells and normal leukocytes and therapeutic implications / C. Gajate, F. Mollinedo // *J Leukoc Biol.* – 2015. - Vol.98(5). – P. 739-759.
144. Galligan, C.L. Fibrocyte and T cell interactions promote disease pathogenesis in rheumatoid arthritis / C.L. Galligan, E.C. Keystone, E.N. Fish // *J Autoimmun.* – 2016. - Vol.69. – P. 38-50. doi: 10.1016/j.jaut.2016.02.008.
145. Gao, L. Expression of human glucocorticoid receptor in T lymphocytes in acute-on-chronic hepatitis B liver failure / L. Gao , J.F. Wang , M. Xiang // *Dig Dis Sci.* – 2011. - Vol.56(9). – P. 2605-2612. doi: 10.1007/s10620-011-1656-4.
146. García-Hernández, M.H. Specific therapy to regulate inflammation in rheumatoid arthritis: molecular aspects / M.H. García-Hernández, R. González-Amaro, D.P. Portales-Pérez // *Immunotherapy.* – 2014. - Vol.6(5). – P. 623-636. doi: 10.2217/imt.14.26.
147. García-Magallón, B. Update on the Use of Steroids in Rheumatoid Arthritis / B. García-Magallón, L. Silva-Fernández, J.L. Andreu-Sánchez // *Reumatol Clin.* – 2013. - Vol.9(5). – P. 297-302. doi: 10.1016/j.reuma.2013.01.010.
148. Gasper, D.J. CD4 T-cell memory generation and maintenance / D.J. Gasper , M.M. Tejera , M. Suresh // *Crit Rev Immunol.* – 2014. - Vol.34(2). – P. 121-146.
149. Geginat, J. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naïve, central memory and effector memory CD4⁺ T cells / J. Geginat, F. Sallusto, A. Lanzavecchia // *Pathol Biol (Paris).* – 2003. - Vol.51(2). – P. 64-66.
150. Gerli, R. In vivo activated T cells in rheumatoid synovitis: analysis of Th1- and Th2-type cytokine production at clonal level in different stages of disease / R. Gerli, O. Bistoni, A. Russano et al. // *Clin. Exp. Immunol.* - Vol.129. – P. 549-555.
151. Gharibi, T. Biological effects of IL-21 on different immune cells and its role in autoimmune diseases / T. Gharibi, J. Majidi, T. Kazemi et al. // *Immunobiology.* – 2016. - Vol.221(2). – P. 357-367. doi: 10.1016/j.imbio.2015.09.021.
152. Gizinski, A.M. T cell subsets and their role in the pathogenesis of rheumatic disease / A.M. Gizinski, D.A. Fox // *Curr Opin Rheumatol.* – 2014. - Vol.26(2). – P. 204-210. doi: 10.1097/BOR.0000000000000036.

153. Glass, C.K. Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells / C.K. Glass, K. Saijo // *Nat Rev Immunol.* – 2010. - Vol.10(5). – P. 365-376. doi: 10.1038/nri2748.
154. Golubovskaya, V. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy / V. Golubovskaya, L. Wu // *Cancers (Basel).* – 2016. - Vol.8(3). – P. - . doi: 10.3390/cancers8030036.
155. Goronzy, J.J. Immune aging and rheumatoid arthritis / J.J. Goronzy, L. Shao, C.M. Weyand // *Rheum Dis Clin North Am.* – 2010. - Vol.36(2). – P. 297-310. doi: 10.1016/j.rdc.2010.03.001.
156. Goronzy, J.J. Telomeres, immune aging and autoimmunity / J.J. Goronzy , H. Fujii, C.M. Weyand // *Exp Gerontol.* – 2006. - Vol.41(3). – P. 246-251.
157. Gruver-Yates, A.L. Tissue-specific actions of glucocorticoids on apoptosis: a double-edged sword / Gruver-Yates A.L., Cidlowski J.A. // *Cells.* – 2013. – Vol.2(2). – P. 202-223.
158. Grontved, L. C/EBP maintains chromatin accessibility in liver and facilitates glucocorticoid receptor recruitment to steroid response elements / L. Grontved, S. John, S. Baek et al. // *EMBO J.* – 2013. - Vol.32. – P. 1568-1583.
159. Gutsol, A.A. Dexamethasone effects on activation and proliferation of immune memory T cells / A.A. Gutsol, N.A. Sokhnevich, V.I. Seledtsov et al. // *Bull Exp Biol Med.* – 2013. - Vol.155(4). – P. 474-476.
160. Gutsol, A.A. Dose-dependent effects of dexamethasone on functional activity of T-lymphocytes different grade of differentiation / A.A. Gutsol, N.A. Sokhnevich, K.A. Iurova et al. // *Mol Biol (Mosk).* – 2015. - Vol.49(1). – P. 149-157.
161. Han, G.M. CD4⁺CD25^{high} T cell numbers are enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis / G.M. Han, N.J. O’Neil-Andersen, R.B. Zurier et al. // *Cell Immunol.* – 2008. - Vol.253. – P. 92-101. doi:10.1016/j.cellimm.2008.05.007.
162. Haque, M. Utilizing regulatory T cells against rheumatoid arthritis / M. Haque, K. Fino, F. Lei et al. // *Front Oncol.* – 2014. - Vol.4. – P. 209. doi: 10.3389/fonc.2014.00209.
163. Hartmann, K. Molecular Actions of Glucocorticoids in Cartilage and Bone During Health, Disease, and SteroidTherapy / K. Hartmann, M. Koenen, S. Schauer et al. // *Physiol Rev.* – 2016. - Vol.96(2). – P. 409-447. doi: 10.1152/physrev.00011.2015.

164. Hayashi, M. Increased population of central memory T cells in circulating peripheral blood of psoriasis patients / M. Hayashi, T. Furuhashi, E. Nishida et al. // *J. Dermatol. Sci.* – 2013. - Vol.70(1). – P. 61-64.
165. Heidari, N. Glucocorticoid-mediated BIM induction and apoptosis are regulated by Runx2 and c-Jun in leukemia cells / N. Heidari, A.V. Miller, M.A. Hicks et al. // *Cell Death Dis.* – 2012. doi: 10.1038/cddis.2012.89.
166. Henson, S.M. Properties of end-stage human T cells defined by CD45RA re-expression / S.M. Henson, N.E. Riddell, A.N. Akbar // *Curr Opin Immunol.* – 2012. - Vol.24(4). – P. 476-481. doi: 10.1016/j.coi.2012.04.001.
167. Hidaka, T. Changes in CD4⁺ T lymphocyte subsets in circulating blood and synovial fluid following filtration leukocytapheresis therapy in patients with rheumatoid arthritis / T. Hidaka, K. Suzuki, Y. Matsuki et al. // *Ther Apher.* – 1999. - Vol.3(2). – P. 178-185.
168. Hirahara, K. Mechanisms underlying helper T-cell plasticity: implications for immune-mediated disease / K. Hirahara, A. Poholek, G. Vahedi et al. // *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* – 2013. - Vol.131(5). – P. 1276-1287.
169. Hermann-Kleiter, N. NFAT pulls the strings during CD4⁺ T helper cell effector functions / N. Hermann-Kleiter, G. Baier // *Blood.* – 2010. - Vol.115(15). – P. 2989-2987. doi: 10.1182/blood-2009-10-233585.
170. Hua, G. SUMOylation and formation of an SUMO-SMRT/NCOR1-HDAC3 repressing complex is mandatory for GC-induced IR nGRE-mediated transrepression / G. Hua, L. Paulen, P. Chambon // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2016. - Vol.113. – P. 626-634.
171. Hudson, W.H. The structural basis of direct glucocorticoid-mediated transrepression / W.H. Hudson, C. Youn, E.A. Ortlund // *Nat Struct Mol Biol.* – 2013. - Vol.20. – P. 53-69.
172. Hunt, L. T cell subsets: an immunological biomarker to predict progression to clinical arthritis in ACPA-positive individuals / L. Hunt, E.M. Hensor, J. Nam et al. // *Ann Rheum Dis.* – 2016. - Vol.75(10). – P. 1884-1889. doi: 10.1136/annrheumdis-2015-207991.

173. Huseby, S. Cyclic AMP induces IPC leukemia cell apoptosis via CRE-and CDK-dependent Bim transcription / S. Huseby, G. Gausdal, T.J. Keen et al. // *Cell Death Dis.* – 2011. - Vol.2. – P. 237. doi: 10.1038/cddis.2011.124.
174. Imamichi, H. The CD8⁺ HLA-DR⁺ T cells expanded in HIV-1 infection are qualitatively identical to those from healthy controls / H. Imamichi, R.A. Lempicki, J.W. Adelsberger et al. // *Eur J Immunol.* – 2012. - Vol.42(10). – P. 2608-2620. doi: 10.1002/eji.201142046.
175. Ishigame, H. Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoc epithelial bacterial infection and allergic responses / H. Ishigame, S. Kakuta, T. Nagai et al. // *Immunity.* – 2009. - Vol.30(1). – P. 108-119. doi: 10.1016/j.immuni.2008.11.009.
176. Iwakura, Y. Functional specialization of interleukin-17 family members / Y. Iwakura, H. Ishigame, S. Saijo et al. // *Immunity.* – 2011. - Vol.34(2). – P. 149-162. doi: 10.1016/j.immuni.2011.02.012.
177. James, E.A. Citrulline-specific Th1 cells are increased in rheumatoid arthritis and their frequency is influenced by disease duration and therapy / E.A. James, M. Rieck, J. Pieper et al. // *Arthritis Rheumatol.* – 2014. - Vol.66(7). – P. 1712-1722. doi: 10.1002/art.38637.
178. Jia, Q. Tumor-infiltrating memory T-lymphocytes for prognostic prediction in cancer patients: a meta-analysis / Q. Jia, Y. Yang, Y. Wan // *Int J Clin Exp Med.* – 2015. - Vol.8. – P.1803-1813.
179. Jiang, N. BIM is a prognostic biomarker for early prednisolone response in pediatric acute lymphoblastic leukemia / N. Jiang, G.S. Koh, J.Y. Lim et al. // *Exp Hematol.* – 2011. - Vol.39(3). – P. 321-329. doi: 10.1016/j.exphem.2010.11.009.
180. Jimeno, R. Th17 polarization of memory Th cells in early arthritis: the vasoactive intestinal peptide effect / R. Jimeno, J. Leceta, M. Garín et al. // *J Leukoc Biol.* – 2015. - Vol.98(2). – P. 257-269. doi: 10.1189/jlb.3A0714-327R.
181. Jing, D. Opposing regulation of BIM and BCL2 controls glucocorticoid-induced apoptosis of pediatric acute lymphoblastic leukemia cells / D. Jing, V.A. Bhadri, D. Beck et al. // *Blood.* – 2015. - Vol.125(2). – P. 273-283. doi: 10.1182/blood-2014-05-576470.

182. John, S. Chromatin accessibility pre-determines glucocorticoid receptor binding patterns / S. John, P.J. Sabo, R.E. Thurman et al. // *Nat Genet.* – 2011. - Vol.43. – P. 264-268.
183. Jordan, K. Measuring disease prevalence: a comparison of musculoskeletal disease using four general practice consultation databases / K. Jordan, A. M. Clarke, D. P. Symmons et al. // *Br. J. Gen. Pract.* – 2007. - Vol.57. – P. 7-14.
184. Kadmiel, M. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease / M. Kadmiel, J.A. Cidlowski // *Trends Pharmacol Sci.* – 2013. - Vol.34. – P. 518-530.
185. Kalliolias, G.D. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies / G.D. Kalliolias, L.B.Ivashkiv // *Nat Rev Rheumatol.* – 2016. - Vol.12(1). – P. 49-62. doi: 10.1038/nrrheum.2015.169.
186. Kaplan, M.H. Th9 cells: differentiation and disease / M.H. Kaplan // *Immunol Rev.* – 2013. - Vol.252(1). – P. 104-115.
187. Karri, S.K. Potential route of Th17/T_{reg} cell dynamics in targeting type 1 diabetes and rheumatoid arthritis: an autoimmune disorder perspective / S.K. Karri, A. Sheela // *Br J Biomed Sci.* – 2017. - Vol.74(1). – P. 8-15. doi: 10.1080/09674845.2016.1264704.
188. Kawashima, M. Effect of treatment of rheumatoid arthritis with infliximab on IFN gamma, IL4, T-bet, and GATA-3 expression: link with improvement of systemic inflammation and disease activity / M. Kawashima, P. Miossec // *Ann Rheum Dis.* – 2005. - Vol.64(3). – P. 415-415.
189. Kerr, J.R. The role of parvovirus B19 in the pathogenesis of autoimmunity and autoimmune disease / J.R. Kerr // *J Clin Pathol.* – 2016. - P. 1-13. doi:10.1136/jclinpath-2015-203455.
190. Kiadaliri, A.A. Rheumatoid arthritis as underlying cause of death in 31 countries, 1987-2011: Trend analysis of WHO mortality database / A.A. Kiadaliri, D.T. Felson, T. Neogi et al. // *Arthritis Rheumatol.* – 2017. doi: 10.1002/art.40091.
191. Kim, E.Y. Immunomodulation of autoimmune arthritis by pro-inflammatory cytokines / E.Y. Kim, K.D. Moudgil // *Cytokine.* – 2017. doi: 10.1016/j.cyto.2017.04.012.

192. Kim, S.H. Repression of TNF- α -induced IL-8 expression by the glucocorticoid receptor involves inhibition of histone H4 acetylation / S.H. Kim, D.H. Kim, P. Lavender et al. // *Exp. Mol. Med.* – 2009. - Vol.41(5). – P. 297-306.
193. Klehmet, J. Effective treatment with intravenous immunoglobulins reduces autoreactive T-cell response in patients with CIDP / J. Klehmet, J. Goehler, L. Ulm et al. // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* – 2015. - Vol.85(6). – P. 686-691. doi: 10.1136/jnnp-2014-307708.
194. Klimiuk, P.A. Circulating tumour necrosis factor alpha and soluble tumour necrosis factor receptors in patients with different patterns of rheumatoid synovitis / P.A. Klimiuk, S. Sierakowski, R. Latosiewicz et al. // *Ann Rheum Dis.* – 2003. - Vol.62(5). – P. 472-475.
195. Kloster-Jensen, K. Treatment with Tacrolimus and Sirolimus Reveals No Additional Adverse Effects on Human Islets In Vitro Compared to Each Drug Alone but They Are Reduced by Adding Glucocorticoids / K. Kloster-Jensen, A. Sahraoui, N.T. Vethe et al. // *J Diabetes Res.* – 2016. doi: 10.1155/2016/4196460.
196. Kochi, Y. A regulatory variant in CCR6 is associated with rheumatoid arthritis susceptibility / Y. Kochi, Y. Okada, A. Suzuki et al. // *Nature Genetics.* – 2010. - Vol.42(6). – P. 515-519.
197. Koetz, K. T cell homeostasis in patients with rheumatoid arthritis / K. Koetz, E. Bryl, K. Spickschen et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2000. - Vol.97(16). – P. 9203-9208.
198. Kokkonen, H. Up-regulation of cytokines and chemokines predates the onset of rheumatoid arthritis / H. Kokkonen, I. Söderström, J. Rocklöv et al. // *Arthritis and Rheumatism.* – 2010. - Vol.62(2). – P. 383-391.
199. Komatsu, N. Arthritogenic T cells in autoimmune arthritis / N. Komatsu, H. Takayanagi // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2015. - Vol.58. – P. 92-96.
200. Komatsu, N. Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity / N. Komatsu, M.E. Mariotti-Ferrandiz, Y. Wang et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2009. - Vol.106(6). – P. 1903-1908.

201. Konya, C. Update on the role of Interleukin 17 in rheumatologic autoimmune diseases / C. Konya, Z. Paz, S.A. Apostolidis et al. // *Cytokine*. – 2015. - Vol.75(2). – P. 207-215. doi: 10.1016/j.cyto.2015.01.003.
202. Kotake, S. Elevated Ratio of Th17 Cell-Derived Th1 Cells (CD161(+)/Th1 Cells) to CD161(+)/Th17 Cells in Peripheral Blood of Early-Onset Rheumatoid Arthritis Patients / S. Kotake, Y. Nanke, T. Yago et al. // *Biomed Res Int*. – 2016. doi: 10.1155/2016/4186027. (A)
203. Kotake, S. Ratio of Circulating IFN γ (+) "Th17 Cells" in Memory Th Cells Is Inversely Correlated with the Titer of Anti-CCP Antibodies in Early-Onset Rheumatoid Arthritis Patients Based on Flow Cytometry Methods of the Human Immunology Project / S. Kotake, Y. Nanke, T. Yago et al. // *Biomed Res Int*. – 2016. doi: 10.1155/2016/9694289. (B)
204. Krueger, A. 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.
205. Krzywinska, E. CD45 Isoform Profile Identifies Natural Killer (NK) Subsets with Differential Activity / E. Krzywinska, A. Cornillon, N. Allende-Vega et al. // *PLoS One*. – 2016. - Vol.11(4). doi: 10.1371/journal.pone.0150434.
206. Kuwabara, T. The Role of IL-17 and Related Cytokines in Inflammatory Autoimmune Diseases / T. Kuwabara, F. Ishikawa, M. Kondo et al. // *Mediators Inflamm*. – 2017. doi: 10.1155/2017/3908061.
207. Landskron, J. C77G in PTPRC (CD45) is no risk allele for ovarian cancer, but associated with less aggressive disease / J. Landskron, S.M. Kraggerud, E. Wik et al. // *PLoS One*. – 2017. - Vol.12(7). doi: 10.1371/journal.pone.0182030.
208. Lawson, C.A. Early rheumatoid arthritis is associated with a deficit in the CD4⁺CD25^{high} regulatory T cell population in peripheral blood / C.A. Lawson, A.K. Brown, V. Bejarano et al. // *Rheumatology (Oxford)*. – 2006. - Vol.45. – P. 1210-1217. doi:10.1093/rheumatology/kel089.
209. Lanzavecchia, A. Human B cell memory / A. Lanzavecchia, F. Sallusto // *Curr Opin Immunol*.- -2009. - Vol.21(3). – P. 298-304. doi: 10.1016/j.coi.2009.05.019.
210. Lee, G.H. Unusual CD4⁺CD28⁻ T Cells and Their Pathogenic Role in Chronic Inflammatory Disorders / G.H. Lee, W.W. Lee // *Immune Netw*. – 2016. - Vol.16(6). – P. 322-329. doi: 10.4110/in.2016.16.6.322.

211. Lee, S.R. Glucocorticoids and their receptors: insights into specific roles in mitochondria / S.R. Lee , H.K. Kim , I.S. Song et al. // *Prog Biophys Mol Biol.* – 2013. - Vol.112(1-2). – P. 44-54. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2013.04.001.
212. Lees, J.R. Interferon gamma in autoimmunity: A complicated player on a complex stage / J.R. Lees // *Cytokine.* – 2015. - Vol.74(1). – P. 18-26. . doi: 10.1016/j.cyto.2014.10.014.
213. Li, H. Levels of metalloproteinase (MMP-3, MMP-9), NF-kappaB ligand (RANKL), and nitric oxide (NO) in peripheral blood of osteoarthritis (OA) patients / H. Li, L. Li, J. Min et al. // *Clin Lab.* – 2012. - Vol.58(7-8). – P. 755-762.
214. Li, L. Effect of recombinant human tumor necrosis factor receptor type II-Fc fusion protein antibody on cytokines and bone metabolism in patients with juvenile idiopathic arthritis / L. Li, X. Zhang, Y. Cui et al. // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* – 2010. - Vol.90 (31). – P. 2205-2208.
215. Li, Y. Regulation of Memory T Cells by Interleukin-23 / Y. Li, H. Wang, H. Lu et al. // *Int Arch Allergy Immunol.* – 2016. - Vol.169(3). – P. 157-162. doi: 10.1159/000445834.
216. Liberman, A.C. Glucocorticoids in the regulation of transcription factors that control cytokine synthesis / A.C. Liberman, J. Druker, M.J. Perone et al. // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2007. - Vol.18(1-2). – P. 45-56.
217. Liberman, A.C. Compound A, a dissociated glucocorticoid receptor modulator, inhibits T-bet (Th1) and induces GATA-3 (Th2) activity in immune cells / A.C. Liberman, M. Antunica-Noguerol, V. Ferraz-de-Paula et al. // *PLoS One.* – 2012. - Vol.7(4). doi: 10.1371/journal.pone.0035155.
218. Lin ,K.T. New dimension of glucocorticoids in cancer treatment / K.T. Lin, L.H. Wang // *Steroids.* – 2016. - Vol.111. – P. 84-88. doi: 10.1016/j.steroids.2016.02.019.
219. Lindstrom, T.M. Rheumatoid arthritis: a role for immunosenescence? / T.M. Lindstrom, W.H. Robinson // *J Am Geriatr Soc.* – 2010. - Vol.58(8). – P. 1565-1575. doi: 10.1111/j.1532-5415.2010.02965.x.
220. Linton, P.J. Age-related changes in lymphocyte development and function / P.J. Linton, K. Dorshkind // *Nat. Immunol.* – 2004. - Vol.5. – P. 133-139.
221. Liu, J. Artesunate influences Th17/Treg lymphocyte balance by modulating Treg apoptosis and Th17 proliferation in a murine model of rheumatoid arthritis / J. Liu, X.

- Hong, D. Lin et al. // *Exp Ther Med.* – 2017. - Vol.13(5). – P. 2267-2273. doi: 10.3892/etm.2017.4232.
222. Liuzzo, G. Unusual CD4⁺CD28null T lymphocytes and recurrence of acute coronary events / G. Liuzzo, L.M. Biasucci, G. Trotta et al. // *J Am Coll Cardiol.* – 2007. - Vol.50. – P. 1450-1458.
223. Lochner, M. The Special Relationship in the Development and Function of T Helper 17 and Regulatory T Cells / M. Lochner, Z. Wang, T. Sparwasser // *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* – 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.07.013>.
224. Lorenz, H.M. Biological agents: a novel approach to the therapy of rheumatoid arthritis / H.M. Lorenz // *Expert Opin Investig Drugs.* – 2000. - Vol.9(7). – P. 1479-1490.
225. Löwenberg, M. Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through Lck and Fyn / M. Löwenberg, J. Tuynman, J. Bilderbeek et al. // *Blood.* – 2005. - Vol.106(5). – P. 1703-1710.
226. Lu, N.Z. International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors / N.Z. Lu, S.E. Wardell, K.L. Burnstein et al. // *Pharmacol Rev.* – 2006. - Vol.58. – P. 782-797.
227. Lu, N.Z. The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. *Annals of the New York Academy of Sciences* / N.Z. Lu, J.A.Cidlowski // *Annals of the New York Academy of Sciences.* – 2004. - Vol.1024. – P. 102-123.
228. Luckey, D. DRB1*0402 may influence arthritis by promoting naive CD4 T cell differentiation in to T regulatory cells / D. Luckey, M. Behrens, M. Smart et al. // *Eur J Immunol.* – 2014. - Vol.44(11). – P. 3429-3438. doi:10.1002/eji.201344424.
229. Luterek-Puszyńska, K. CD28, CTLA-4 and CCL5 gene polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis / Luterek-Puszyńska K., Malinowski D., Paradowska-Gorycka A. et al.// *Clin Rheumatol.*- 2017. – Vol. 36(5). – P. 1129—1135.
230. Maggi, L. Distinctive features of classic and nonclassic (Th17 derived) human Th1 cells / L. Maggi, V. Santarlasci, M. Capone et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2012. - c 3180-3188.

231. Makrygiannakis, D. Apoptosis as a mechanism of action of tumor necrosis factor antagonists in rheumatoid arthritis / D. Makrygiannakis, A.I. Catrina // *J Rheumatol.* – 2012. - Vol.39(4). – P. 679-685. doi: 10.3899/jrheum.110974.
232. 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.
233. Mamoune, A. Abnormal distribution of CD45 isoforms expressed by CD4⁺ and CD8⁺ T cells in rheumatoid arthritis / A. Mamoune , V. Durand , P. Le Goff et al. // *Histol Histopathol.* – 2000. - Vol.15(2). – P. 587-591.
234. Mangalam, A.K. HLA Class II Molecules Influence Susceptibility vs Protection in Inflammatory Diseases by Determining the Cytokine Profile / A.K. Mangalam, V. Taneja, C.S. David // *J Immunol.* – 2013. - Vol.190(2). – P. 513-519. doi:10.4049/jimmunol.1201891.
235. Mardahl, M. Core 2 β 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase-I, crucial for P-selectin ligand expression is controlled by a distal enhancer regulated by STAT4 and T-bet in CD4⁺ T helper cells 1 / M. Mardahl, M.F. Schröter, D. Engelbert et al. // *Mol Immunol.* – 2016. - Vol.77. – P. 132-140. doi: 10.1016/j.molimm.2016.08.001.
236. Markovic-Plese, S. CD4⁺CD28⁻ costimulation-independent T cells in multiple sclerosis / S. Markovic-Plese, I. Cortese, K.P. Wandinger et al. // *J Clin Invest.* – 2001. - Vol.108(8). – P. 1185-1194.
237. Marsee, D.K. CD71 (transferrin receptor): an effective marker for erythroid precursors in bone marrow biopsy specimens / D.K. Marsee, G.S. Pinkus, H. Yu // *Am J Clin Pathol.* – 2010. - Vol.134(3). – P. 429-435. doi: 10.1309/AJCPCRK3MOAOJ6AT.
238. Martini ,V. Loss of CD45 cell surface expression in canine T-zone lymphoma results from reduced gene expression / V. Martini, M. Cozzi, A. Aricò et al. // *Vet Immunol Immunopathol.* – 2017. - Vol.187. – P. 14-19. doi: 10.1016/j.vetimm.2017.03.006.
239. Marusina, A.I. CD4⁺ virtual memory: Antigen-inexperienced T cells reside in the naïve, regulatory, and memory T cell compartments at similar frequencies, implications for autoimmunity / A.I. Marusina , Y. Ono , A.A. Merleev et al. // *J Autoimmun.* – 2017. - Vol.77. – P. 76-88. doi: 10.1016/j.jaut.2016.11.001.
240. Maślanka, T. Prostaglandin E₂ down-regulates the expression of CD25 on bovine T cells, and this effect is mediated through the EP4 receptor / T. Maślanka, A.

- Spodniewska, D. Barski et al. // *Vet Immunol Immunopathol.* – 2014. - Vol.160(3-4). – P. 192-200. doi: 10.1016/j.vetimm.2014.05.003.
241. Mateen, S. Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis / S. Mateen, A. Zafar, S. Moin et al. // *Clin Chim Acta.* – 2016. - Vol.455. – P. 161-171. doi: 10.1016/j.cca.2016.02.010.
242. Mathew, A.J. Infections and arthritis / A.J. Mathew, V. Ravindran // *Clin Rheumatol.* – 2014. - Vol.28(6). – P. 935-959. doi: 10.1016/j.berh.2015.04.009.
243. Matsuki, F. CD45RA⁻Foxp3 high activated/effector regulatory T cells in the CCR7⁺CD45RA⁻CD27⁺CD28⁺ central memory subset are decreased in peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis / F. Matsuki, J. Saegusa, Y. Miyamoto et al. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2013. - Vol.438(4). – P. 778-783. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.05.120.
244. Matsuki, F. CD45RA⁻Foxp3(low) non-regulatory T cells in the CCR7⁻CD45RA⁻CD27⁺CD28⁺ effector memory subset are increased in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis / F. Matsuki, J. Saegusa, K. Nishimura et al. // *Cell Immunol.* – 2014. - Vol.290(1). – P. 96-101. doi: 10.1016/j.cellimm.2014.05.011.
245. Matsumura-Arioka, Y. 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.
246. Matteucci, E. Altered proportions of naive, central memory and terminally differentiated central memory subsets among CD4⁺ and CD8⁺ T cells expressing CD26 in patients with type 1 diabetes / E. Matteucci, M. Ghimenti, S. Di Beo et al. // *J. Clin. Immunol.* – 2011. - Vol.31(6). – P. 977-984. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21887518>.
247. McInnes, I.B. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis / I.B. McInnes, G. Schett // *Lancet.* – 2017. - Vol.389(10086). – P. 2328-2337. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31472-1.
248. McWilliams, I.L. STAT4 controls GM-CSF production by both Th1 and Th17 cells during EAE / I.L. McWilliams, R. Rajbhandari, S. Nozell et al. // *J Neuroinflammation.* – 2015. - Vol.12. – P. 128. doi: 10.1186/s12974-015-0351-3.

249. Meijnsing, S.H. DNA Binding Site Sequence Directs Glucocorticoid Receptor Structure and Activity / S.H. Meijnsing, M.A. Pufall, A.Y. So et al. // *Science*. – 2009. – Vol.324. – P. 407-410.
250. Mellado, M. T Cell Migration in Rheumatoid Arthritis / M. Mellado, L. Martínez-Muñoz, G. Cascio et al. // *Front Immunol*. – 2015. – Vol.6. – P. 384. doi:10.3389/fimmu.2015.00384.
251. Michelutti, A. B-Cell Subsets in the Joint Compartments of Seropositive and Seronegative Rheumatoid Arthritis (RA) and No-RA Arthritides Express Memory Markers and ZAP70 and Characterize the Aggregate Pattern Irrespectively of the Autoantibody Status / A. Michelutti, E. Gremese, F. Morassi et al. // *Mol Med*. – 2011. – Vol.17(9-10). – P. 901-909. doi: 10.2119/molmed.2011.00034.
252. Mitre-Aguilar, I.B. Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids: implications for breast cancer / I.B. Mitre-Aguilar, A.J. Cabrera-Quintero, A. Zentella-Dehesa // *Int J Clin Exp Pathol*. – 2015. – Vol.8(1). – P. 1-10.
253. Moleriu, R.D. Insights into the mechanisms of thymus involution and regeneration by modeling the glucocorticoid-induced perturbation of thymocyte populations dynamics / R.D. Moleriu, D. Zaharie, L.C. Moatar-Moleriu et al. // *J Theor Biol*. – 2014. – Vol.348. – P. 80-99. doi: 10.1016/j.jtbi.2014.01.020.
254. Molgora, B. 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. doi: 10.3390/cells2010057.
255. Moon, Y.M. IL-32 and IL-17 interact and have the potential to aggravate osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis / Y.M. Moon, B.Y. Yoon, Y.M. Her et al. // *Arthritis Res Ther*. – 2012. – Vol.14. – P. 246.
256. Moore, T.L. Immune Complexes in Juvenile Idiopathic Arthritis / T.L. Moore // *Front Immunol*. – 2016. – Vol.7. – P. 177. doi: 10.3389/fimmu.2016.00177.
257. Moradi, B. CD4⁺CD25⁺/highCD127^{low}/⁻ regulatory T cells are enriched in rheumatoid arthritis and osteoarthritis joints--analysis of frequency and phenotype in synovial membrane, synovial fluid and peripheral blood / B. Moradi, P. Schnatzer, S. Hagmann et al. // *Arthritis Res Ther*. – 2014. – Vol.16(2). – P. 97. doi: 10.1186/ar4545.

258. Moss, R.B. Th1/Th2 cells in inflammatory disease states: therapeutic implications / R.B. Moss, T. Moll, M. El-Kalay et al. // *Expert Opin Biol Ther.* – 2004. - Vol.4(12). – P. 1887-1896.
259. Muehling, L.M. Circulating Memory CD4⁺ T Cells Target Conserved Epitopes of Rhinovirus Capsid Proteins and Respond Rapidly to Experimental Infection in Humans / L.M. Muehling, D.T. Mai, W.W. Kwok et al. // *J Immunol.* – 2016. - Vol.197(8). – P. 3214-3224.
260. Mutsaers, H.A. Dexamethasone enhances oxidative stress-induced cell death in murine neural stem cells / H.A. Mutsaers, R. Tofighi // *Neurotox Res.* – 2012. - Vol.22(2). – P. 127-137. doi: 10.1007/s12640-012-9308-9.
261. Nakayamada, S. Helper T cell diversity and plasticity / S. Nakayamada, H. Takahashi, Y. Kanno et al. // *Current Opinion in Immunology.* – 2012. - Vol.24(3). – P. 297-302.
262. Nanki, T. Cytokine, activation marker, and chemokine receptor expression by individual CD4⁽⁺⁾ memory T cells in rheumatoid arthritis synovium / T. Nanki, P.E. Lipsky // *Arthritis Res.* – 2000. - Vol.2(5). – P. 415-423. (A)
263. Nanki, T. Stromal Cell-Derived Factor-1-CXC Chemokine Receptor 4 Interactions Play a Central Role in CD4⁺ T Cell Accumulation in Rheumatoid Arthritis Synovium / T. Nanki, K. Hayashida, H.S. El-Gabalawy et al. // *The Journal of Immunology.* – 2000. - Vol.165. – P. 6590-6598. doi: 10.4049/jimmunol.165.11.6590. (B)
264. Newcomb, D.C. A functional IL-13 receptor is expressed on polarized murine CD4⁺ Th17 cells and IL-13 signaling attenuates Th17 cytokine production / D.C. Newcomb, W. Zhou, M. L. Moore et al. // *J. Immunol.* – 2009. - Vol.182. – P. 5317-5321.
265. Nie, H. Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF-alpha in rheumatoid arthritis / H. Nie, Y. Zheng, R. Li et al. // *Nature Medicine.* – 2013. - Vol.19(3). – P. 322-328.
266. Niu, Q. Disturbed Th17/Treg balance in patients with rheumatoid arthritis / Q. Niu, B. Cai, Z.C. Huang et al. // *Rheumatol Int.* – 2012. - Vol.32. – P. 2731-2736.
267. Niu, X. Therapeutic effect of ergotope peptides on CIA by down-regulation of inflammatory and Th1/Th17 responses and induction of regulatory T cells / X. Niu, S. Deng, S. Li et al. // *Mol Med.* – 2016. - Vol.22. doi: 10.2119/molmed.2015.00182.

268. Noack, M. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases / M. Noack, P. Miossec // *Autoimmun Rev.* – 2014. - Vol.13(6). – P. 668-677. doi: 10.1016/j.autrev.2013.12.004.
269. Noack, M. Evaluation of Anti-inflammatory Effects of Steroids and Arthritis-Related Biotherapies in an *In Vitro* Coculture Model with Immune Cells and Synoviocytes / M. Noack, N. Ndong-Thiam, P. Miossec et al. // *Front Immunol.* – 2016. - Vol.7. – P. 509.
270. Oakley, R.H. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease / R.H. Oakley , J.A. Cidlowski // *J Allergy Clin Immunol.* – 2013. - Vol.132(5). – P. 1033-1044. doi: 10.1016/j.jaci.2013.09.007.
271. Olnes, M.J. Effects of Systemically Administered Hydrocortisone on the Human Immunome / M.J. Olnes, Y. Kotliarov, A. Biancotto et al. // *CHI Consortium. Sci Rep.* – 2016. - Vol.6. – P.23002. doi: 10.1038/srep23002.
272. Onuora, S. Osteoimmunology: IgG immune complexes directly regulate bone homeostasis / S. Onuora // *Nat Rev Rheumatol.* – 2015. - Vol.11(5). – P.257. doi: 10.1038/nrrheum.2015.51.
273. Orent, W. Rheumatoid arthritis-associated RBPJ polymorphism alters memory CD4⁺ T cells / W. Orent, A.R. Mchenry, D.A. Rao et al. // *Hum Mol Genet.* – 2016. - Vol.25(2). – P. 404-417. doi: 10.1093/hmg/ddv474.
274. Ospelt, C. Epigenetics in the pathogenesis of RA / C. Ospelt, S. Gay, K. Klein // *Semin Immunopathol.* – 2017. doi: 10.1007/s00281-017-0621-5.
275. Paakinaho, V. SUMOylation regulates the chromatin occupancy and anti-proliferative gene programs of glucocorticoid receptor / V. Paakinaho, S. Kaikkonen, H. Makkonen et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2014. - Vol.42(3). – P. 1575-1592. doi: 10.1093/nar/gkt1033.
276. Page, C. E. Interferon-gamma inhibits interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase production by synovial fibroblasts and protects articular cartilage in early arthritis / C.E Page, S. Smale, S.M. Carty et al. // *Arthritis Res. Ther.* – 2010. - Vol.12. – P. 49.
277. 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. doi: 10.1016/B978-0-12-397898-1.00006-2.

278. Pandey, A. Modulation of Th1/Th2 cytokines and inflammatory mediators by hydroxychavicol in adjuvant induced arthritic tissues / A. Pandey, S. Bani, P. Dutt et al. // *Cytokine*. – 2010. - Vol.49(1). – P. 114-121. doi: 10.1016/j.cyto.2009.08.015.
279. Pandya, J.M. Circulating T helper and T regulatory subsets in untreated early rheumatoid arthritis and healthy control subjects / J.M. Pandya, A.C. Lundell, M. Hallström et al. // *J Leukoc Biol*. – 2016. - Vol.100(4). – P. 823-833.
280. Patel, D.D. Th17 Cell Pathway in Human Immunity: Lessons from Genetics and Therapeutic Interventions / D.D. Patel, V.K. Kuchroo // *Immunity*. – 2015. - Vol.43(6). – P. 1040-1051. doi: 10.1016/j.immuni.2015.12.003.
281. Pauleya, K.M. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases / K.M. Pauleya, S. Chaa, E.K.L. Chanb // *J Autoimmun*. – 2009. - Vol.32(3-4). – P. 189-194. doi:10.1016/j.jaut.2009.02.012.
282. Paulissen, S. M. The role and modulation of CCR6⁺ Th17 cell populations in rheumatoid arthritis / S. M. Paulissen, J. P. van Hamburg, W. Dankers et al. // *Cytokine*. – 2015. - Vol.74. – P. 43-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.02.002>
283. Paulsen, E.E. CD45RO⁽⁺⁾ Memory T Lymphocytes-a Candidate Marker for TNM-Immunoscore in Squamous Non-Small Cell Lung Cancer / E.E. Paulsen, T. Kilvaer, M.R. Khanekhenari et al. // *Neoplasia*. – 2015. - Vol.17(11). – P. 839-848. doi: 10.1016/j.neo.2015.11.004.
284. Pawlik, A. The expansion of CD4⁺CD28⁻ T cells in patients with rheumatoid arthritis / A. Pawlik, L. Ostanek, I. Brzosko et al. // *Arthritis Res Ther*. – 2003. - Vol.5. – P. 210-2113.
285. Pedersen, J.K. Incidence of rheumatoid arthritis in the southern part of Denmark from 1995 to 2001 / J.K. Pedersen, A.J. Svendsen, K. Horslev-Petersen // *Open Rheumatol J*. – 2007. - Vol.1. – P. 18-23.
286. Pepper, M. Origins of CD4⁺ effector and central memory T cells / M. Pepper, M.K. Jenkins // *Nat Immunol*. – 2011. - Vol.12(6). – P. 467-471.
287. Petersen, L.E. Premature immunosenescence is associated with memory dysfunction in rheumatoid arthritis / L.E. Petersen, R. Grassi-Oliveira, T. Siara et al. // *Neuroimmunomodulation*. – 2015. - Vol.22(3). – P. 130-137. doi: 10.1159/000358437.

288. Pfaffl, M.W. Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR / M.W. Pfaffl, M. Hageleit // *Biotechnol. Lett.* – 2001. – Vol.23. – P. 275–282.
289. Pfeifle R. Regulation of autoantibody activity by the IL-23-TH17 axis determines the onset of autoimmune disease / R Pfeifle, T. Rothe, N. Ipseiz et al. // *Nat Immunol.* – 2017. – Vol.18(1). – P. 104-113. doi: 10.1038/ni.3579.
290. Pieper, J. Peripheral and site-specific CD4⁺CD28null T cells from Rheumatoid Arthritis patients show distinct characteristics / J. Pieper, S. Johansson, O. Snir et al. // *Scand J Immunol.* – 2014. – Vol.79(2). – P. 149-155. doi: 10.1111/sji.12139.
291. Princz, A. The role of SUMOylation in ageing and senescent decline / A. Princz, N. Tavernarakis // *Mech Ageing Dev.* – 2017. – Vol.162. – P. 85-90. doi: 10.1016/j.mad.2017.01.002.
292. Rao, D.A. Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis / D.A. Rao, M.F. Gurish, J.L. Marshall et al. // *Nature.* – 2017. – Vol.542(7639). – P. 110-114. doi: 10.1038/nature20810.
293. Raphael, I. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases / I. Raphael, S. Nalawade, T.N. Eagar et al. // *Cytokine.* – 2015. – Vol.74(1). – P. 5-17. doi: 10.1016/j.cyto.2014.09.011.
294. Ratman, D. How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: A scope beyond tethering / D. Ratman, W. Vanden Berghe, L. Dejager et al. // *Mol Cell Endocrinol.* – 2013. – Vol.380(1-2). – P. 41-54. doi: 10.1016/j.mce.2012.12.014.
295. Raychaudhuri, S.P. IL-17 receptor and its functional significance in psoriatic arthritis / S.P. Raychaudhuri, S.K. Raychaudhuri, M.C. Genovese // *Mol Cell Biochem.* – 2012. – Vol.359(1-2). – P. 419-429. doi: 10.1007/s11010-011-1036-6.
296. Raza, K. Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin / K. Raza, F. Falciani, S.J. Curnow et al. // *Arthritis Research & Therapy.* – 2005. – Vol.7(4). – P. 784-795.
297. Ria, F. Collagen-specific T-cell repertoire in blood and synovial fluid varies with disease activity in early rheumatoid arthritis / F. Ria, R. Penitente, M. De Santis et al. // *Arthritis Research & Therapy.* – 2008. – Vol.10(6).

298. Roeleveld, D.M. The role of the Th17 cytokines IL-17 and IL-22 in Rheumatoid Arthritis pathogenesis and developments in cytokine immunotherapy / D.M. Roeleveld, M.I. Koenders // *Cytokine*. – 2015. - Vol.74. – P. 101-107.
299. Rojas-Zuleta, W.G. Th9 lymphocytes: A recent history from IL-9 to its potential role in rheumatic diseases / W.G. Rojas-Zuleta, G. Vásquez // *Autoimmun Rev*. – 2016. - Vol.15(7). – P. 649-655. doi: 10.1016/j.autrev.2016.02.020.
300. Rossini, M. Focal bone involvement in inflammatory arthritis: the role of IL17 / M. Rossini, O. Viapiana, S. Adami et al. // *Rheumatol Int*. – 2016. - Vol.36(4). – P. 469-482. doi: 10.1007/s00296-015-3387-x.
301. Saidakova, E.V. CD8⁺ T cell expansion in HIV/HCV coinfection is associated with systemic inflammation / E.V. Saidakova, K.V. Shmagel, L.B. Korolevskaya et al. // *Dokl Biol Sci*. – 2017. - Vol.474(1).– P. 126-128. doi: 10.1134/S0012496617030024.
302. Saleh, K.J. Perioperative Treatment of Patients with Rheumatoid Arthritis / K.J. Saleh, A.J. Kurdi, M.M. El-Othmani et al. // *J Am Acad Orthop Surg*. – 2015. - Vol.23.– P. 38-48.
303. Saleh, K.J. Perioperative Treatment of Patients with Rheumatoid Arthritis / K.J. Saleh, A.J. Kurdi, M.M. El-Othmani et al. // *Instr Course Lect*. – 2016. - Vol.65.– P. 497-508.
304. 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.
305. Samson, M. Brief report: inhibition of interleukin-6 function corrects Th17/Treg cell imbalance in patients with rheumatoid arthritis / M. Samson, S. Audia, N. Janikashvili et al. // *Arthritis Rheum*. – 2012. - Vol.64.– P. 2499-2503.
306. Sande van de, M.G. Immunopathology of synovitis: from histology to molecular pathways / M.G. Sande van de, D.L. Baeten // *Rheumatology (Oxford)*. – 2016. - Vol.55(4).– P. 599-606. doi: 10.1093/rheumatology/kev330.
307. Sarkar, S. Interleukin (IL)-17A, F and AF in inflammation: a study in collagen-induced arthritis and rheumatoid arthritis / S. Sarkar, S. Justa, M. Brucks et al. // *Clinical and Experimental Immunology*. – 2014. - Vol.177.– P. 652-661.
308. Satpute, S.R. Tolerization with Hsp65 induces protection against adjuvant-induced arthritis by modulating the antigen-directed interferon-gamma, interleukin-17, and

- antibody responses / S.R. Satpute, R. Rajaiah, S.K. Polumuri et al. // *Arthritis Rheum.* – 2009. - Vol.60(1).– P. 103-113. doi: 10.1002/art.24139.
309. Saunders, A.E. Innate immune cell CD45 regulates lymphopenia-induced T cell proliferation / A.E. Saunders, Y.A. Shim, P. Johnson // *J Immunol.* – 2014. - Vol.193(6).– P. 283102842. doi: 10.4049/jimmunol.1302681.
310. Savino, W. Hormonal control of T-cell development in health and disease / W. Savino, D.A. Mendes-da-Cruz, A. Lepletier et al. // *Nat Rev Endocrinol.* – 2016. - Vol.12(2).– P. 77-89. doi: 10.1038/nrendo.2015.168.
311. Sawai, H. T cell costimulation by fractalkine-expressing synoviocytes in rheumatoid arthritis / H. Sawai, Y.W. Park, J. Roberson et al. // *Arthritis Rheum.* – 2005. - Vol.52.– P. 1392-1401.
312. Schindler, H. NO as a signaling molecule: effects on kinases / H. Schindler, C. Bogdan // *Int Immunopharmacol.* – 2001. - Vol.1 (18).– P. 1443-1455.
313. Schurigt, U. Interactions of T helper cells with fibroblast-like synoviocytes: up-regulation of matrixmetalloproteinases by macrophage migration inhibitory factor from both Th1 and Th2 cells / U. Schurigt, C. Pfirschke, I.M. Irmeler et al. // *Arthritis Rheum.* – 2008. - Vol.58(10).– P. 3030-3040. doi: 10.1002/art.23904.
314. Schwartz, D.M. Type I/II cytokines, JAKs, and new strategies for treating autoimmune diseases / D.M. Schwartz, M. Bonelli, M. Gadina et al. // *Nat Rev Rheumatol.* – 2016. - Vol.12(1).– P. 25-36. doi: 10.1038/nrrheum.2015.167.
315. Schweingruber, N. Chemokine-mediated redirection of T cells constitutes a critical mechanism of glucocorticoid therapy in autoimmune CNS responses / N. Schweingruber, H.J. Fischer, L. Fischer et al. // *Acta Neuropathol.* – 2014. - Vol.127.– P. 713-729.
316. Sebastien, V. Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis / V. Sebastien, P. Darren, R. Soumya // *Nat Rev Rheumatol.* – 2013. - Vol.9.– P. 141-153.
317. Seddiki, N. Persistence of naive CD45RA⁺ regulatory T cells in adult life / N. Seddiki, B. Santner-Nanan, S.G. Tangye et al. // *Blood.* – 2006. - Vol.107.– P. 2830-2838. doi:10.1182/blood-2005-06-2403.
318. Seder, R.A. Similarities and differences in CD4⁺ and CD8⁺ effector and memory T cell generation / R.A. Seder, R. Ahmed // *Nat Immunol.* – 2003. - Vol.4(9).– P. 835-842.
319. Sethi, G. TNF: a master switch for inflammation to cancer / G. Sethi, B. Sung, B.B. Aggarwal // *Front Biosci.* – 2008. - Vol.13.– P. 5094-5107.

320. Shah, S. Negative Feed-forward Control of Tumor Necrosis Factor (TNF) by Tristetraprolin (ZFP36) Is Limited by the Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase, Dual-specificity Phosphatase 1 (DUSP1): IMPLICATIONS FOR REGULATION BY GLUCOCORTICOIDS / S. Shah, M.M. Mostafa, A. McWhae et al. // *J Biol Chem.* – 2016. - Vol.291(1).– P. 110-125. doi: 10.1074/jbc.M115.697599.
321. Shipp, L.E. Transcriptional regulation of human dual specificity protein phosphatase 1 (DUSP1) gene by glucocorticoids / L.E. Shipp, J.V. Lee, C.Y. Yu et al. // *PLoS One.* – 2010. - Vol.5(10).– P. 13754. doi: 10.1371/journal.pone.0013754.
322. 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. doi: 10.1016/j.cca.2011.11.006.
323. Sloka, J.S. The mechanism of action of methylprednisolone in the treatment of multiple sclerosis / J.S. Sloka, M. Stefanelli // *Mult Scler.* – 2005. - Vol.11(4).– P. 425-43
324. Smolen, J.S. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis / J.S. Smolen, D. Aletaha, M. Koeller et al. // *Lancet.* – 2007. - Vol.370.– P. 1861-1874.
325. Spreafico, R. A circulating reservoir of pathogenic-like CD4⁺ T cells shares a genetic and phenotypic signature with the inflamed synovial micro-environment / R. Spreafico, M. Rossetti, J. van Loosdregt et al. // *Ann Rheum Dis.* – 2016. - Vol.75(2).– P. 459-465. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-206226. (B)
326. Spreafico, R. Epipolymorphisms associated with the clinical outcome of autoimmune arthritis affect CD4⁺ T cell activation pathways // R. Spreafico, M. Rossetti, J.W. Whitaker et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2016. - Vol.113(48).– P. 13845-13850 (A)
327. Stanczyk, J. Altered Expression of MicroRNA-203 in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts and Its Role in Fibroblast Activation / J. Stanczyk, C. Ospelt, E. Karouzakis et al. // *ARTHRITIS & RHEUMATISM.* – 2011. - Vol.63(2).– P. 373-381. doi: 10.1002/art.30115.
328. Sun, B. DNA methylation perspectives in the pathogenesis of autoimmune diseases / B. Sun, L. Hu, Zh.-Y. Luo et al. // *Clinical Immunology.* – 2016. - Vol.164.– P. 21-27.

329. Surjit, M. Widespread Negative Response Elements Mediate Direct Repression by Agonist-Liganded Glucocorticoid Receptor / M. Surjit, K.P. Ganti, A. Mukherji et al. // *Cell*. – 2011. - Vol.145.– P. 224-241.
330. Tabarkiewicz, J. The Role of IL-17 and Th17 Lymphocytes in Autoimmune Diseases / J. Tabarkiewicz, K. Pogoda, A. Karczmarczyk et al. // *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. – 2015. - Vol.63(6).– P. 435-449. doi: 10.1007/s00005-015-0344-z.
331. Talaber, G. ACTH controls thymocyte homeostasis independent of glucocorticoids / G. Talaber, J.P. Tuckermann, S. Okret // *FASEB J*. – 2015. - Vol.29(6).– P. 2526-2534. doi: 10.1096/fj.14-268508.
332. Tao, J.H. Foxp3, Regulatory T Cell, and Autoimmune Diseases / J.H. Tao, M. Cheng, J.P. Tang et al. // *Inflammation*. – 2017. - Vol.40(1).– P. 328-339. doi: 10.1007/s10753-016-0470-8.
333. Taves, M.D. Local glucocorticoid production in lymphoid organs of mice and birds: Functions in lymphocyte development / M.D. Taves, J.E. Hamden, K.K.Soma // *Horm Behav*. – 2017. - Vol.88.– P. 4-14. doi: 10.1016/j.yhbeh.2016.10.022.
334. Theander, L. Severe Extraarticular Manifestations in a Community-based Cohort of Patients with Rheumatoid Arthritis: Risk Factors and Incidence in Relation to Treatment with Tumor Necrosis Factor Inhibitors / L. Theander, B.M. Nyhäll-Wählin , J.Å. Nilsson et al. // *J Rheumatol*. – 2017. doi: 10.3899/jrheum.161103.
335. Thewissen, M. Analyses of immunosenescent markers in patients with autoimmune disease / M. Thewissen, V. Somers, K. Venken et al. // *Clin Immunol*. – 2007. - Vol.123.– P. 209-218. (A)
336. Thewissen, M. CD4⁺CD28null T cells in autoimmune disease: pathogenic features and decreased susceptibility to immunoregulation / M. Thewissen, V. Somers, N. Hellings et al. // *J Immunol*. – 2007. - Vol.179(10).– P. 6514-6523. (B)
337. Thewissen, M. Premature immunosenescence in rheumatoid arthritis and multiple sclerosis patients / M. Thewissen, L. Linsen, V. Somers et al. // *Ann N Y Acad Sci*. – 2005. - Vol.1051.– P. 255-262.
338. Tischner, D. Acid sphingomyelinase is required for protection of effector memory T cells against glucocorticoid-induced cell death / D. Tischner, J. Theiss, A. Karabinskaya et al. // *J Immunol*. – 2011. - Vol.187(9).– P. 4509-4516. doi: 10.4049/jimmunol.1100911.

339. Toussiro, E. Epstein–Barr virus in autoimmune diseases / E. Toussiro // *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. – 2008. - Vol.22(5).– P. 883-896.
340. Trifari, S. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells / S. Trifari, C.D. Kaplan, E.H. Tran et al. // *Nat. Immunol.* – 2009. - Vol.10.– P. 864-871.
341. Tsai, S. MHC class II polymorphisms, autoreactive T-cells, and autoimmunity / S. Tsai, P. Santamaria // *Frontiers in Immunology. Antigen Presenting Cell Biology*. – 2013. - Vol.4(321).– P. 1-6.
342. Tsompana, M. Chromatin accessibility: a window into the genome / M. Tsompana, M.J. Buck // *Epigenetics Chromatin*. – 2014. - Vol.7.– P. 33.
343. Tsubaki, M. Mangiferin suppresses CIA by suppressing the expression of TNF- α , IL-6, IL-1 β , and RANKL through inhibiting the activation of NF- κ B and ERK1/2 / M. Tsubaki, T. Takeda, T. Kino et al. // *Am J Transl Res*. – 2015. - Vol.7(8).– P. 1371-1381.
344. Tu, W. Mechanisms Underlying T Cell Immunosenescence: Aging and Cytomegalovirus Infection / W. Tu, S. Rao // *Front Microbiol*. – 2016. - Vol.7.– P. 2111. doi: 10.3389/fmicb.2016.02111.
345. Tuncel, J. MHC class II alleles associated with Th1 rather than Th17 type immunity drive the onset of early arthritis in a rat model of rheumatoid arthritis / J. Tuncel, S. Haag, R. Holmdahl // *Eur J Immunol*. – 2017. - Vol.47(3).– P. 563-574. doi: 10.1002/eji.201646760.
346. Uhlenhaut, N.H. Insights into negative regulation by the glucocorticoid receptor from genome-wide profiling of inflammatory cistromes / N.H. Uhlenhaut, G.D. Barish, R.T. Yu et al. // *Mol Cell*. – 2013. - Vol.49(1).– P. 158-171. doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.013..
347. Vacca, A. Transcriptional regulation of the interleukin 2 gene by glucocorticoid hormones. Role of steroid receptor and antigen-responsive 5'-flanking sequences / A. Vacca, S. Martinotti, I. Screpanti et al. // *J Biol Chem*. – 1990. - Vol.265(14).– P. 8075-8080.
348. Vallejo, A.N. Clonality and longevity of CD4⁺CD28null T cells are associated with defects in apoptotic pathways / A.N. Vallejo, M. Schirmer, C.M. Weyand et al. // *J Immunol*. – 2000. - Vol.165.– P. 6301-6307.

349. Van de Sande, M.G. Immunopathology of synovitis: from histology to molecular pathways / M.G. van de Sande, D.L.Baeten // *Rheumatology (Oxford)*. – 2016. - Vol.55(4).– P. 599-606. doi: 10.1093/rheumatology/kev330.
350. Van Hamburg, J.P. IL-17/Th17 mediated synovial inflammation is IL-22 independent / J. P. van Hamburg, O.B.Corneth, S.M. Paulissen et al. // *Ann. Rheum. Dis.* – 2013. - Vol.72. – P. 1700-1707.
351. Van Heemst, J. HLA and rheumatoid arthritis: How do they connect? / J. van Heemst, D. van der Woude, T.W. Huizinga et al. // *Annals of Medicine*. – 2014. - P. 1-7.
352. Van Heemst, J. HLA and rheumatoid arthritis: how do they connect? / J. van Heemst, D. van der Woude, T.W. Huizinga et al. // *Ann Med*. – 2014. - Vol.46(5).– P. 304-310. doi: 10.3109/07853890.2014.907097.
353. Vandevyver, S. On the trail of the glucocorticoid receptor: into the nucleus and back / S. Vandevyver, L. Dejager, C. Libert // *Traffic*. – 2012. - Vol.13.– P. 364-374.
354. Veale, D.J. Cellular and molecular perspectives in rheumatoid arthritis / D.J. Veale, C. Orr, U. Fearon // *Semin Immunopathol*. – 2017. doi: 10.1007/s00281-017-0633-1.
355. Verma, K. Human CD8⁺ CD57⁻ TEMRA cells: Too young to be called "old" / K. Verma, J. Ogonek, P.R. Varanasi et al. // *PLoS One*. – 2017. - Vol.12(5). doi: 10.1371/journal.pone.0177405.
356. Villanueva, M.T. Rheumatoid arthritis: IL-23 assists the transition from autoimmunity to inflammatory disease / M.T. Villanueva // *Nat Rev Rheumatol*. – 2017. - Vol.13(1).– P. 1. doi: 10.1038/nrrheum.2016.197.
357. Vockley, C.M. Direct GR Binding Sites Potentiate Clusters of TF Binding across the Human Genome / C.M. Vockley, A.M. D'Ippolito, I.C. McDowell et al. // *Cell*. – 2016. - Vol.166(5).– P. 1269-1281. doi: 10.1016/j.cell.2016.07.049.
358. Wagner, U.G. Perturbation of the T cell repertoire in rheumatoid arthritis / U.G. Wagner, K. Koetz, C.M. Weyand et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1998. - Vol.95(24).– P. 14447-14452.
359. Wakim, L.M. From the thymus to longevity in the periphery / L.M. Wakim, M.J. Bevan // *Curr Opin Immunol*. – 2010. - Vol.22(3).– P. 274-278. doi: 10.1016/j.coi.2010.03.003.

360. Walter, G.J. Phenotypic, functional, and gene expression profiling of peripheral CD45RA⁺ and CD45RO⁺ CD4⁺CD25⁺CD127(low) treg cells in patients with chronic rheumatoid arthritis / G.J. Walter, V. Fleskens, K.S. Frederiksen et al. // *Arthritis Rheumatol.* – 2016. - Vol.68.– P. 103-116. doi:10.1002/art.39408.
361. Wang, D. G α q Regulates the Development of Rheumatoid Arthritis by Modulating Th1 Differentiation / D. Wang, Y. Liu, Y. Li et al. // *Mediators Inflamm.* – 2017. doi: 10.1155/2017/4639081.
362. Wang, D. The role of autoreactive T cell in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and implications for T cell targeted vaccine therapy / D. Wang, Y. Liu, Y. Li et al. // *Minerva Med.* – 2015. - Vol.106(3).– P. 157-167.
363. Wang, J. Epigallocatechin-3-gallate ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by altering balance among CD4⁺ T-cell subsets / J. Wang, Z. Ren, Y. Xu et al. // *Am J Pathol.* – 2012. - Vol.180.– P. 221-234.
364. Wendt, E. Glucocorticoids Suppress CCR9-Mediated Chemotaxis, Calcium Flux, and Adhesion to MAdCAM-1 in Human T Cells / E. Wendt, G.E. White, H. Ferry et al. // *J Immunol.* – 2016. - Vol.196(9).– P. 3910-3919. doi: 10.4049/jimmunol.1500619.
365. Weng, C.H. Cigarette smoke inhibits ROCK2 activation in T cells and modulates IL-22 production / C.H. Weng, S. Gupta, P. Geraghty et al. // *Mol Immunol.* – 2016. - Vol.71.– P. 115-122. doi: 10.1016/j.molimm.2016.01.013.
366. Weng, N.P. CD28⁻ T cells: their role in the age-associated decline of immune function / N.P. Weng, A.N. Akbar, J. Goronzy // *Trends Immunol.* – 2009. - Vol.30.– P. 306-312.
367. Weng, N.P. Telomere and adaptive immunity / N.P. Weng // *Mech Ageing Dev.* – 2008. - Vol.129(1-2).– P. 60-66. doi: 10.1016/j.mad.2007.11.005.
368. Wenga, Ch.-H. Cigarette smoke inhibits ROCK2 activation in T cells and modulates IL-22 production / Ch.-H. Wenga, S. Gupta, P. Geraghty et al. // *Molecular Immunology.* – 2016. - Vol.71.– P. 115-122.
369. Weyand, C.M. T-cell aging in rheumatoid arthritis / C.M. Weyand, Z. Yang, J.J. Goronzy // *Curr Opin Rheumatol.* – 2014. - Vol.26(1).– P. 93-100. doi: 10.1097/BOR.000000000000011.
370. Wieckowski, E.U. Tumor-derived microvesicles promote regulatory T cell expansion and induce apoptosis in tumor-reactive activated CD8⁺ T lymphocytes / E.U.

- Wieckowski, C. Visus, M. Szajnik et al. // *J Immunol.* -2009. - Vol.183(6).– P. 3720-3730. doi: 10.4049/jimmunol.0900970.
371. Wieland, E. Lymphocyte surface molecules as immune activation biomarkers / E. Wieland, M. Shipkova // *Clin Biochem.* – 2016. - Vol.49(4-5).– P. 347-354.
372. Wright, H.L. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis / H.L. Wright, R.J. Moots, S.W. Edwards // *Nat. Rev. Rheumatol.* – 2014. doi:10.1038/nrrheum.2014.80.
373. Wu, D.Y. Distinct, genome-wide, gene-specific selectivity patterns of four glucocorticoid receptor coregulators / D.Y. Wu, C.Y. Ou, R. Chodankar et al. // *Nucl Recept Signal.* – 2014. doi: 10.1621/nrs.12002.
374. Wu, Q. The bispecific antibody aimed at the vicious circle of IL-1 β and IL-17A, is beneficial for the collagen-induced rheumatoid arthritis of mice through NF- κ B signaling pathway / Q. Wu, Y. Wang, Q. Wang et al. // *Immunol Lett.* – 2016. - Vol.179.– P.68-79. doi: 10.1016/j.imlet.2016.09.001.
375. Yakimchuk, K. The selective impact of transgenically expressed glucocorticoid receptor on T cells / K. Yakimchuk, L. Chen , M.S. Hasni et al. // *Autoimmunity.* – 2015. - Vol.48(2).– P. 117-124. doi: 10.3109/08916934.2014.959164.
376. Yamada, H. Th1 but not Th17 cells predominate in the joints of patients with rheumatoid arthritis / H. Yamada, Y. Nakashima, K. Okazaki et al. // *Annals of the Rheumatic Diseases.* – 2008. - Vol. 67(9).– P. 1299-1304.
377. Yamaki, K. Effects of the phosphodiesterase IV inhibitor rolipram on Th1 and Th2 immune responses in mice / K. Yamaki, X. Li, H. Uchida et al. // *J Pharm Pharmacol.* – 2004. - Vol.56(7). – P. 877-882.
378. Yamamoto, K. Genetic studies of rheumatoid arthritis / K. Yamamoto, Yu. Okada, A. Suzuki et al. // *Proc. Jpn. Acad.* – 2015. - Vol.91.
379. Yang, X.O. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs / X.O. Yang, R. Nurieva, G.J. Martinez et al. // *Immunity.* – 2009. - Vol.29(1).– P. 44-56.
380. Yang, Y.H. Annexin A1: potential for glucocorticoid sparing in RA / Y.H. Yang, E. Morand, M. Leech // *Nat Rev Rheumatol.* – 2013. - Vol.9(10).– P. 595-603. doi: 10.1038/nrrheum.2013.126.

381. Ye, L. TCR usage, gene expression and function of two distinct FOXP3⁺Treg subsets within CD4⁺CD25^{hi} T cells identified by expression of CD39 and CD45RO / L. Ye, J.C. Goodall, L. Zhang et al. // *Immunol Cell Biol.* – 2016. - Vol.94(3).– P. 293-305. doi: 10.1038/icb.2015.90.
382. Younes, S.A. IL-15 promotes activation and expansion of CD8⁺ T cells in HIV-1 infection / S.A. Younes, M.L. Freeman, J.C. Mudd et al. // *J Clin Invest.* – 2016. - Vol.126(7).– P. 2745-2756. doi: 10.1172/JCI85996.
383. Yu, H.T. T cell senescence and cardiovascular diseases / H.T. Yu, S. Park, E.C. Shin et al. // *Clin Exp Med.* – 2016. - Vol.16.– P. 257-263.
384. Yu, M. Follicular helper T cells in rheumatoid arthritis / M. Yu, V. Cavero, Q. Lu et al. // *Clin Rheumatol.* – 2015. - Vol.34(9).– P. 1489-1493. doi: 10.1007/s10067-015-3028-5.
385. Zambon, A.C. Increased expression of the pro-apoptotic protein BIM, a mechanism for cAMP/protein kinase A (PKA)-induced apoptosis of immature T cells / A.C. Zambon, A. Wilderman, A. Ho et al. // *J Biol Chem.* – 2011. - Vol.286(38).– P. 33260-33267. doi: 10.1074/jbc.M111.268979.
386. Zampeli, E. Treatment of rheumatoid arthritis: Unraveling the conundrum / E. Zampeli, P.G. Vlachoyiannopoulos, A.G. Tzioufas // *J Autoimmun.* – 2015. - Vol.65.– P. 1-18. doi: 10.1016/j.jaut.2015.10.003.
387. Zha, Q. Dexamethasone-induced up-regulation of the human norepinephrine transporter involves the glucocorticoid receptor and increased binding of C/EBP- β to the proximal promoter of norepinephrine transporter / Q. Zha, Y. Wang, Y. Fan et al. // *J Neurochem.* – 2011. - Vol.119(3).– P. 654-663. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07448.x.
388. Zhang, J. Expression of bone morphogenetic protein (BMP)-2, 4 in mouse embryonic tooth during the bud stage / J. Zhang, W. Tian, L. Liu et al. // *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* – 2001. - Vol.19(6).– P. 392-393.
389. Zhang, Y. Protecting Bone Health in Pediatric Rheumatic Diseases: Pharmacological Considerations / Y. Zhang, D. Milojevic // *Paediatr Drugs.* – 2017. - Vol.19(3).– P. 193-211. doi: 10.1007/s40272-017-0219-3.
390. Zhao, Y.N. Pro-apoptotic protein BIM in apoptosis of glucocorticoid-sensitive and -resistant acute lymphoblastic leukemia CEM cells / Y.N. Zhao, X. Guo, Z.G. Ma et al. // *Med Oncol.* – 2011. - Vol.28(4).– P. 1609-1617. doi: 10.1007/s12032-010-9641-x.

391. Zheng, J. Generation of human Th1-like regulatory CD4⁺ T cells by an intrinsic IFN- γ - and T-bet-dependent pathway / J. Zheng, Y. Liu, G. Qin et al. // *Eur J Immunol.* – 2011. - Vol.41(1).– P. 128-139. doi: 10.1002/eji.201040724.
392. Zhu, J. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*) / J. Zhu, H. Yamane, W.E. Paul // *Annu Rev Immunol.* – 2010. - Vol.28.– P. 445-489. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101212.