

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ «СИБИРСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Якушина Валентина Дмитриевна

**РОЛЬ ГАЛЕКТИНА-1 В МЕХАНИЗМАХ ДИСРЕГУЛЯЦИИ АПОПТОЗА И
ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ CD4⁺-ЛИМФОЦИТОВ**

14.03.03 – патологическая физиология
03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:
доктор медицинских наук, профессор
Н.В. Рязанцева
академик РАН, доктор медицинских
наук, профессор В.В. Новицкий

Томск - 2014

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. Обзор литературы	13
1.1 Современные представления о функциях CD4 ⁺ -лимфоцитов	13
1.1.1 Функциональная активность CD4 ⁺ -лимфоцитов	14
1.1.2 Роль CD4 ⁺ -лимфоцитов в патогенезе аутоиммунных заболеваний	20
1.2 Молекулярные механизмы активации и дифференцировки CD4 ⁺ - лимфоцитов	23
1.2.1 Молекулярные механизмы регуляции апоптотической гибели лимфоцитов	28
1.3 Галектин-1: структура, функции, механизмы влияния на клетки- мишени	33
1.3.1 Структура и функции галектина-1	33
1.3.2 Роль галектина-1 в регуляции иммунного ответа	36
1.3.3 Роль галектина-1 в патогенезе и терапии иммуноопосредованных заболеваний	41
Глава 2. Материал и методы исследования	49
2.1 Материал исследования	49
2.1.1 Характеристика экспериментального блока исследования	50
2.1.2 Характеристика клинического материала	51
2.2 Методы исследования	52
2.2.1 Выделение мононуклеарных лейкоцитов крови	52
2.2.2 Культивирование мононуклеарных клеток	53
2.2.3 Оценка количества апоптотически измененных CD4 ⁺ - лимфоцитов	56
2.2.4 Исследование деполяризации митохондриальной мембраны в лимфоцитах крови	57

2.2.5	Определение содержания белков Bcl-2, Вах, FoxP3, перфорина в мононуклеарных лейкоцитах	59
2.2.6	Оценка уровня экспрессии транскрипционных факторов дифференцировки CD4 ⁺ -лимфоцитов	61
2.2.7	Оценка содержания цитокинов в культуральных средах мононуклеарных лейкоцитов	64
2.2.8	Оценка содержания лимфоцитов с фенотипом Т-регуляторных клеток	65
2.2.9	Оценка уровня экспрессии мРНК галектина-1 в мононуклеарных лейкоцитах	67
2.2.10	Статистический анализ результатов исследования	69
Глава 3.	Результаты собственных исследований	70
3.1	Результаты исследования влияния галектина-1 на апоптоз CD4 ⁺ -лимфоцитов	71
3.1.1	Содержание апоптотически измененных CD4 ⁺ -лимфоцитов при действии рекомбинантного галектина-1 in vitro	71
3.1.2	Изменение трансмембранного потенциала митохондрий лимфоцитов при действии рекомбинантного галектина-1	74
3.1.3	Содержание белков семейства Bcl-2 в мононуклеарных клетках при действии рекомбинантного галектина-1	76
3.2	Результаты исследования влияния галектина-1 на дифференцировку CD4 ⁺ -лимфоцитов	77
3.2.1	Экспрессия мРНК транскрипционных факторов CD4 ⁺ -лимфоцитов при действии рекомбинантного галектина-1	78
3.2.2	Продукция цитокинов CD4 ⁺ -лимфоцитов при действии рекомбинантного галектина-1	80
3.3	Результаты исследования влияния галектина-1 на дифференцированные регуляторные Т-лимфоциты	83

3.3.1 Результаты экспериментального подбора доз рекомбинантных цитокинов для осуществления дифференцировки CD4 ⁺ -лимфоцитов в Т-регуляторные клетки	83
3.3.2. Содержание клеток с фенотипом регуляторных Т- лимфоцитов при действии рекомбинантного галектина-1	86
3.3.3 Содержание транскрипционного фактора FoxP3 в лизатах моноклеарных лейкоцитов при действии рекомбинантного галектина-1	91
3.3.4 Содержание цитолитического белка перфорина в лизатах моноклеарных лейкоцитов при действии рекомбинантного галектина-1	92
3.4 Экспрессия мРНК галектина-1 в моноклеарных клетках здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом	93
Глава 4. Обсуждение результатов	97
4.1 Влияние галектина-1 на апоптоз CD4 ⁺ -лимфоцитов	99
4.2 Влияние галектина-1 на дифференцировку CD4 ⁺ -лимфоцитов	105
4.3 Влияние галектина-1 на дифференцированные <i>in vitro</i> регуляторные CD4 ⁺ -лимфоциты	115
ВЫВОДЫ	123
Список использованных сокращений	124
Список литературы	125

Введение

Актуальность исследования. Дисрегуляция процессов дифференцировки и апоптоза CD4⁺-лимфоцитов является патогенетическим фактором многих социально-значимых заболеваний. Известно, что ряд аутоиммунных и аллергических заболеваний ассоциированы с избыточной активностью Th1-, Th2-, Th17-лимфоцитов, а также недостаточностью Т-регуляторного звена [Dardalhon V. et al., 2008; Piccirillo C.A., 2010; Korn T. et al., 2010; Lin C.H. et al., 2013]. Вместе с тем предполагается, что иммуносупрессорная активность регуляторных Т-лимфоцитов способствует опухолевой прогрессии [von Boehmer H., 2005; Yamaguchi T. et al., 2006; Yaqub S. et al., 2008; Nishikawa H. et al., 2010]. В связи с этим изучение механизмов регуляции субпопуляционного баланса CD4⁺-лимфоцитов необходимо для понимания молекулярных основ заболеваний, связанных с дисрегуляцией иммунитета, и разработки новых патогенетически обоснованных методов диагностики и таргетной терапии.

В последнее время среди прочих молекул кооперации клеток иммунной системы внимание исследователей обращено на белок галектин-1, секретируемый стромальными клетками тимуса, лимфоузлов, самими лимфоцитами, а также клетками некоторых типов опухолей [Dhirapong A. et al., 2009]. Предполагается, что, связываясь с гликопротеинами поверхности клеток врожденного и приобретенного иммунитета, галектин-1 выполняет противовоспалительные функции [Yang R.Y. et al., 2008]. Терапевтическое значение галектина-1 показано на экспериментальных моделях аутоиммунной патологии: аутоиммунной миастении Гравис, аутоиммунного энцефаломиелита, артрита, гепатита, болезни «трансплантат против хозяина», аутоиммунного увеита и диабета [Salatino M. et al., 2008]. С другой стороны, секреция галектина-1 опухолевыми клетками рассматривается в качестве возможного механизма опухолевой прогрессии [Rubinstein N. et al., 2004; He J., Baum L.G., 2006; Compagno D. et al., 2013].

Важной особенностью галектина-1 является его разнонаправленное действие на клетки в зависимости от их субпопуляционной принадлежности, стадии активации и наличия других костимулирующих сигналов. При этом представления о механизмах иммунорегуляторного действия галектина-1 находятся на стадии формирования. К настоящему времени проведены исследования влияния галектина-1 на миграционную активность и апоптоз нейтрофилов, активацию макрофагов и продукцию ими медиаторов воспаления, а также на активацию, пролиферацию, дифференцировку и гибель В-лимфоцитов в зависимости от функционального состояния [Paclik D. et al., 2011; Anginot A. et al., 2013; Auvynet C. et al., 2013; Tsai C.M. et al., 2014]. Кроме того, представлены данные, характеризующие особенности клональной селекции, пролиферации и апоптоза CD8⁺-лимфоцитов под действием галектина-1 [Liu S.D. et al., 2008; Moreau A. et al., 2012]. CD4⁺-лимфоциты также рассматриваются в качестве мишени иммунорегуляторного действия галектина-1.

Степень разработанности. Роль галектина-1 в регуляции гомеостаза CD4⁺-лимфоцитов на различных этапах иммунного ответа остается недостаточно изученной. Так, к настоящему времени не установлен факт влияния галектина-1 на апоптоз, дифференцировку и функциональную активность CD4⁺-лимфоцитов. Идентификация патогенетического значения нарушения галектин-1-опосредованной регуляции баланса CD4⁺-лимфоцитов при различных аутоиммунных заболеваниях позволит рассматривать данный белок в качестве возможного маркера диагностики и/или терапевтического агента.

Цель исследования: установить роль галектина-1 в механизмах дисрегуляции апоптоза и дифференцировки CD4⁺-лимфоцитов.

Задачи исследования:

1. Установить закономерности влияния рекомбинантного галектина-1 на реализацию апоптоза CD3/CD28-активированных CD4⁺-лимфоцитов *in vitro*.
2. Оценить вовлеченность митохондриального пути в реализацию апоптоза активированных лимфоцитов при действии рекомбинантного галектина-1 *in vitro*.

3. Оценить влияние галектина-1 на уровень экспрессии мРНК транскрипционных факторов дифференцировки CD4⁺-лимфоцитов (Tbet, Gata-3, RORc, FoxP3) и продукцию профильных цитокинов (IFN γ , IL-13, IL-17, IL-10) при CD3/CD28-активации клеток *in vitro*.

4. Оценить экспрессию галектина-1 при патологии, сопровождающейся дисрегуляцией дифференцировки CD4⁺-лимфоцитов (на примере ревматоидного артрита).

5. Выявить особенности влияния рекомбинантного галектина-1 на субпопуляционный состав и иммуносупрессорную функцию регуляторных CD4⁺-лимфоцитов *in vitro*.

Научная новизна. Получены новые данные о влиянии галектина-1 на апоптоз и дифференцировку CD4⁺-лимфоцитов при действии на клетки в условиях активации через CD3 и CD28, а также на фенотип и функциональную активность регуляторных Т-лимфоцитов при действии на дифференцированные клетки.

Впервые в условиях *in vitro* показано, что действие галектина-1 в концентрациях от 2,5 до 4,0 мкг/мл на активированные CD4⁺-лимфоциты дозозависимо индуцирует митохондриальный путь апоптоза, что характеризуется деполяризацией митохондриальной мембраны, снижением количества антиапоптотического белка Bcl-2 и увеличением содержания проапоптотического белка Bax.

Впервые установлено, что действие галектина-1 *in vitro* на CD3/CD28-активированные CD4⁺-лимфоциты приводит к увеличению экспрессии мРНК транскрипционных факторов дифференцировки Th2-лимфоцитов (Gata-3) и регуляторных Т-лимфоцитов (FoxP3) на фоне снижения экспрессии мРНК транскрипционных факторов дифференцировки Th1-лимфоцитов (Tbet) и Th17-лимфоцитов (RORc). Новые данные, полученные в результате оценки экспрессии транскрипционных факторов, позволяют сделать заключение, что галектин-1 регулирует направление дифференцировки активированных CD4⁺-лимфоцитов.

Впервые проведена оценка экспрессии гена галектина-1 у пациентов с ревматоидным артритом. Полученные данные позволяют сделать заключение о том, что сниженная экспрессия галектина-1 является одним из патогенетических факторов, обуславливающих дисрегуляцию апоптоза и дифференцировки CD4⁺-лимфоцитов.

Впервые было проведено комплексное исследование иммунофенотипа и функциональной активности регуляторных Т-лимфоцитов при действии галектина-1 на предварительно дифференцированные клетки. Полученные в результате новые данные позволяют объяснить иммуносупрессорную функцию галектина-1 посредством поддержания фенотипа регуляторных Т-лимфоцитов и повышения их функциональной активности.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты проведенного исследования *in vitro* раскрывают механизмы нарушения регуляции апоптоза и дифференцировки CD4⁺-лимфоцитов, опосредованной галектином-1. Полученные данные о способности галектина-1 в процессе активации через CD3 и CD28 индуцировать апоптоз CD4⁺-лимфоцитов и направлять дифференцировку по пути Th2 и регуляторных Т-лимфоцитов, а также способствовать экспансии регуляторных Т-лимфоцитов при действии на дифференцированные клетки вносят вклад в понимание механизмов дисрегуляции апоптоза и дифференцировки CD4⁺-лимфоцитов.

Идентификация патогенетического значения нарушения регуляции апоптоза и дифференцировки CD4⁺-лимфоцитов, опосредованной галектином-1, позволяет рассматривать данный процесс в качестве основы для разработки новых методов селективной коррекции иммунного ответа. При этом галектин-1 может выступать в качестве компонента терапии или диагностического маркера при аутоиммунных заболеваниях.

Методология и методы исследования. Экспериментальный блок исследований выполнен на мононуклеарных лейкоцитах относительно здоровых доноров, культивированных в условиях активации CD4⁺-лимфоцитов (модель 1) и

направленной дифференцировки в регуляторные Т-лимфоциты (модель 2). Объектом исследования экспрессии мРНК галектина-1 явились мононуклеарные лейкоциты относительно здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом.

В работе использованы высокоинформативные методы, выполненные на базе Научно-образовательного центра молекулярной медицины ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России и лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий инновационного парка Балтийского федерального университета им. И. Канта. Основные методы исследования:

1. Выделение и культивирование мононуклеарных лейкоцитов;
2. Оценка количества апоптотически измененных $CD4^+$ -лимфоцитов по связыванию аннексина-V и 7AAD, количества лимфоцитов со сниженным трансмембранным потенциалом митохондрий, а также содержания лимфоцитов с фенотипом $CD4^+CD25^+FoxP3^-/CD4^+CD25^+FoxP3^+$ – методом проточной цитофлуориметрии;
3. Определение внутриклеточного содержания белков Bcl-2, Вах, FoxP3 и перфорины методом вестерн-блоттинга;
4. Оценка экспрессии мРНК транскрипционных факторов дифференцировки $CD4^+$ -лимфоцитов (Tbet, RORc, GATA-3, FoxP3) и мРНК галектина-1 методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени;
5. Оценка содержания цитокинов IFN γ , IL-13, IL-17, IL-10 в культуральных средах мононуклеарных лейкоцитов методом иммуноферментного анализа;
6. Статистический анализ результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Галектин-1 дозозависимо индуцирует митохондриальный путь апоптоза активированных $CD4^+$ -лимфоцитов.
2. Галектин-1 регулирует направленность дифференцировки $CD4^+$ -лимфоцитов, повышая количество Th2 и регуляторных Т-клеток на фоне снижения количества Th1- и Th17-лимфоцитов.

3. Действие галектина-1 на дифференцированные регуляторные Т-лимфоциты приводит к экспансии иммуносупрессорных клеток, характеризующихся $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ -фенотипом и повышенным содержанием фактора FoxP3 и белка перфорины.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов обеспечена достаточным объемом материала и использованием современных, высокоинформативных методов. Статистическая обработка результатов выполнена с помощью надлежащих методик доказательной медицины.

Результаты проведенных исследований докладывались и обсуждались на XIV Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей (с международным участием) «Фундаментальная наука и клиническая медицина - человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2011), 14-й межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Дни иммунологии в Сибири» (Абакан, 2011), международной конференции «Программируемая гибель клеток в биологии и медицине» (Москва, 2012), международной конференции студентов и молодых ученых «Дни биохимии в СПбГМУ 2012» (Россия, Санкт-Петербург, 2012), Всероссийской Итоговой студенческой научной конференции им. Н.И. Пирогова (Томск, 2012, 2013), международной конференции "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация" (Пушино, 2013). Кроме того, результаты исследования положены в основу проекта «Технология генерации регуляторных Т-лимфоцитов *in vitro* с помощью рекомбинантного галектина-1», занявшего II место на конкурсе аспирантов «От инновационной идеи – к медицинской разработке» (Томск, 2012). Научное исследование на тему «Влияние галектина-1 на дифференцировку $CD4^+$ -лимфоцитов при аутоиммунных заболеваниях», выполненное в рамках диссертационной работы было поддержано по итогам конкурса на получение стипендии Президента России (СП-208.2012.4 от 21.11.2012).

Исследования реализованы в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 годы» («Разработка технологических основ управления дифференцировкой, межклеточной кооперацией и программированной гибелью Th-лимфоцитов с использованием рекомбинантных галектинов» (ГК №16.740.11.0636); «Разработка технологической платформы молекулярной диагностики и лечения социально-значимых заболеваний и подготовка на ее основе научно-исследовательских кадров для молекулярной медицины» (ГК № 02.740.11.0311); «Разработка технологических основ действия мишень-направленных биологически активных молекул для коррекции нарушений пролиферации и программированной гибели опухолевых клеток» (ГК № 8302)). Кроме того исследования были поддержаны Российским фондом фундаментальных исследований «Молекулярные механизмы регуляторного влияния галектинов на дифференцировку и функциональную активность Th-лимфоцитов» (договор №12-04-31224 мол_a) и Советом по грантам Президента РФ «Идентификация молекулярных мишеней регуляции апоптоза и дифференцировки клеток крови при патологии инфекционного и неинфекционного генеза» (№ 16.120.11.614-НШ).

Основные положения и выводы диссертационной работы используются в учебном процессе кафедр патофизиологии (раздел «Роль иммунной системы в патологии. Аллергия»), молекулярной медицины и клинической лабораторной диагностики (раздел «Молекулярные основы патологии»), морфологии и общей патологии (раздел «Типовые патологические процессы») ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

Автор принимал непосредственное участие в планировании исследования и разработке его методических основ, анализе литературы. Автором проведены исследования, статистическая обработка полученных данных и интерпретация результатов.

По теме диссертации опубликовано 14 работ, из которых – 4 в центральных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 157 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка литературы, включающего 288 источников, из них – 19 отечественных и 269 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 7 таблицами и 14 рисунками.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Современные представления о функциях CD4⁺-лимфоцитов

CD4⁺-лимфоциты являются основными регуляторами иммунного ответа. В зависимости от субпопуляционной принадлежности CD4⁺-лимфоциты определяют тип иммунных реакций. Первыми описанными субпопуляциями CD4⁺-лимфоцитов были Т-хелперы 1-го типа (Th1) и Т-хелперы 2-го типа (Th2), отличающиеся набором секретируемых цитокинов. На основании реципрокных функций Th1- и Th2-лимфоцитов T.R. Mossmann и R.L. Coffman предложили Th1/Th2 парадигму иммунного ответа, которая была ведущей на протяжении длительного времени [Кологривова И.В. и соавт., 2011; Mosmann T.R., Coffman R.L. 1987]. В 2005 г. L.E. Harrington и H. Park независимо друг от друга опубликовали данные о том, что наивные CD4⁺-лимфоциты могут дифференцироваться в IL-17-продуцирующие клетки *in vivo* и *in vitro*, образуя субпопуляцию, отличную от Th1 и Th2 [Harrington L.E. et al., 2005; Park H. et al., 2005]. Это событие служит своеобразной отправной точкой, после которой Т-хелперы 17-го типа были выделены в отдельную популяцию лимфоцитов, что потребовало пересмотра существовавшей ранее парадигмы и позволило дополнить представление о патогенезе многих заболеваний [Кологривова И.В. и соавт., 2011; Torchinsky M.B., Blander J.M., 2010]. Особое внимание исследователей привлекают CD4⁺-лимфоциты с иммуносупрессорными функциями – Treg, Tr1 и Th3, объединенные в группу регуляторных субпопуляций [Peterson R.A., 2012].

В настоящее время выделяют следующие основные субпопуляции CD4⁺-лимфоцитов: Th1, Th2, Th17, Th9, Tfh, Treg, Tr1 и Th3. Однако вопрос классификации CD4⁺-лимфоцитов остается незакрытым; предполагается, что дальнейшие исследования позволят выделить новые типы дифференцировки и решить, действительно ли некоторые субпопуляции CD4⁺-лимфоцитов являются обособленным направлением дифференцировки или же представляют собой переходную стадию дифференцировки других субпопуляций клеток.

1.1.1 Функциональная активность CD4⁺-лимфоцитов

Основная функция Т-лимфоцитов-хелперов 1-го типа – запуск клеточного иммунного ответа и защита от внутриклеточных патогенов. Th1-опосредованный иммунный ответ имеет критическое значение в элиминации микобактериальной инфекции [Tang C. et al., 2008; Yahagi A. et al., 2010; Pitt J.M. et al., 2012].

Механизм иммунорегуляторного действия Th1 лимфоцитов связан с продукцией ряда цитокинов: интерлейкина-2 (IL-2), интерферона-гамма (IFN γ) и фактора некроза опухоли альфа (TNF α) [Jäger A., Kuchroo V.K., 2010].

IL-2 является важным провоспалительным цитокином, рецепторы к которому (IL-2R) обнаружены на Т-клетках, В-клетках, НК-клетках и макрофагах [Waldmann T.A. et al., 1984; Greene W.C. et al., 1986; Smith K.A. 2006]. Секретируя IL-2, Th1-лимфоциты индуцируют пролиферацию, активацию и дифференцировку клеток-мишеней, в том числе эффекторных Th-лимфоцитов и цитотоксических Т-клеток. Способность IL-2 индуцировать пролиферацию определяет его в качестве типичного ростового фактора клеток лимфо-миелоидного комплекса [Hoffenbach A. et al., 1983]. При действии IL-2 усиливается продукция иммуноглобулинов В-лимфоцитами, а также продукция оксида азота и интерферона НК-клетками и Т-лимфоцитами [Jyothi M.D., Khar A., 2000; Teodorczyk-Injeyan J.A. et al., 2010].

Th1-клетки участвуют в реализации механизмов противоопухолевой защиты, повышая посредством IL-2 литическую активность НК-клеток, а также индуцируя клетки системы ЛАК (лимфокинактивированные киллеры). Кроме того, секретируя TNF α , Th1-лимфоциты обеспечивают элиминацию клеток опухоли либо клеток, пораженных вирусами. TNF α также вызывает активацию макрофагов, нейтрофилов, эозинофилов и эндотелиальных клеток. Помимо иммунорегуляторного действия, TNF опосредует участие Th1-лимфоцитов в повышении проницаемости капилляров, повреждении эндотелия сосудов, возникновении внутрисосудистой тромба [Kuchroo V.K., 1993; Симбирцев А.С., 2004].

Важным механизмом эффекторного действия Th1-клеток, опосредованного IL-2 и IFN γ , является миграция и активация макрофагов для выполнения деструктивных функций в отношении тканей, поврежденных патогеном в очаге воспаления. Индуцируя экспрессию на клетках молекул главного комплекса гистосовместимости МНС-I и МНС-II, IL-2 способствует представлению антигенов для Т-лимфоцитов, а значит прогрессивному развитию противовирусного иммунитета. Под действием IL-2 в ходе Th1-пути иммунного ответа в иммунокомпетентных клетках запускается синтез и секреция целого ряда других лимфокинов: IL-4, IL-6, колоний-стимулирующих факторов (CSFs), факторов некроза опухолей (TNFs) [Бережная Н.М. и др., 1989; Smith K.A., 2006].

Th2-лимфоциты запускают реакции гуморального иммунного ответа и обеспечивают элиминацию внеклеточных патогенов, в том числе паразитов, гельминтов, бактерий [Ho I.C., Glimcher L.H., 2002; Murphy K.M., Reiner S.L., 2002]. Эффекторные механизмы Th2-клеток связаны с продукцией IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-25 и амфирегулина.

Посредством продукции IL-4, IL-5 и IL-13 Th2-лимфоциты активируют пролиферацию В-лимфоцитов, а также экспрессию на них рецептора для IL-2 и синтез иммуноглобулинов. Иммуноглобулины классов Е и G синтезируются под действием IL-4 и IL-13, а IgM, IgG и IgA – под действием IL-5 [Kopf M. et al., 1993]. Влияние Th2 лимфоцитов на макрофаги заключается в ограничении синтеза провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF α) и высокоактивных метаболитов кислорода и азота при действии IL-4, а также в ингибировании функции антигенной презентации при действии IL-10 [Moore K.W. et al., 2001; Martinez-Nunez R.T., Louafi F. et al., 2011; Van Dyken S.J., Locksley R.M., 2013]. С другой стороны, известна способность IL-4 генерировать активность ЛАК и усиливать противоопухолевую активность макрофагов [Чердынцева Н.В., 2005].

IL-13 обладает функциями, аналогичными IL-4: он является мощным модулятором активности моноцитов и В-клеток, оказывает ингибирующий

эффект на продукцию других цитокинов, стимулирующих начало воспалительного процесса [Martinez-Nunez R.T., Louafi F. et al., 2011; Cardilo-Reis L. et al., 2012; Van Dyken S.J., Locksley R.M., 2013]. Физиологическая роль IL-13 заключается в элиминации гельминтов [Wynn T.A., 2003].

Важным механизмом Th2-опосредованного иммунного ответа является активация, дифференцировка и повышение жизнеспособности эозинофилов, а также их хемотаксис и дегрануляция при действии IL-5, что имеет защитное значение при паразитарных инвазиях и играет роль в патогенезе аллергического воспаления [Coffman R.L. et al., 1989; Hall L.R. et al., 1998; Takatsu K., 2011].

Посредством IL-10 Th2-лимфоциты ингибируют продукцию цитокинов T-лимфоцитами-эффекторами; повышение уровня продукции IL-10 считается плохим прогностическим признаком выраженной прогрессии опухолевого роста [Itakura E., Huang R.R., 2011]. Считается, что секреция Th2-лимфоцитами амфирегулина – представителя семейства эпидермального фактора роста (EGF), индуцирующего пролиферацию эпителиальных клеток, - является защитным механизмом при нематодозах [Zaiss D.M. et al., 2006; Zhou Y. et al., 2012].

Защиту от внеклеточных бактериальных и грибковых патогенов, не подвергшихся элиминации Th1- и Th2-лимфоцитами, осуществляют Th17-лимфоциты. Основным эффекторным механизмом Th17-лимфоцитов является продукция цитокинов семейства IL-17. Данное семейство включает IL-17A (также называемый IL-17), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (или IL-25) и IL-17F [Aggarwal S., Gurney A.L., 2002; Kawaguchi M. et al., 2004].

IL-17A и IL-17F обладают провоспалительными свойствами, индуцируя продукцию цитокинов (TNF, IL-1 β , IL-6, GM-CSF, G-CSF), хемокинов (CXCL1, CXCL8, CXCL10) и металлопротеиназ другими клетками [Jovanovic D.V. et al., 1998; Kolls J.K., Linden A., 2004; Park H. et al., 2005]. Кроме того, IL-17A и IL-17F активируют нейтрофилы и стимулируют их миграцию [Aggarwal S., Gurney A.L., 2002; Moseley T.A. et al., 2003].

Специфичными рецепторами для IL-17A и IL-17F являются IL-17RA и IL-17RC. IL-17RA экспрессируется с высокой плотностью на гемопоэтических клетках, а также на остеобластах, фибробластах, эндотелиальных и эпителиальных клетках, но с более низкой плотностью. В отличие от IL-17RA, IL-17RC слабо экспрессируется на гемопоэтических клетках и с высокой плотностью - на негемопоэтических клетках.

IL-17 и IL-17F могут продуцироваться не только Th17-клетками, но и $\gamma\delta$ T-лимфоцитами, NKT- и NK-клетками, нейтрофилами и эозинофилами [Zhou Q. et al., 2005; Lockhart E. et al., 2006; Liu S.J. et al., 2007; Yao Z. et al., 2011]. IL-17E (IL-25) через IL-17RB (также называемый IL-17RH1 и EVI27) способствует развитию иммунного ответа по Th2-пути, индуцируя секрецию IL-5 и IL-13 [Gratchev A. et al., 2004; Rickel E.A. et al., 2008]. Продуцируясь Th2, а не Th17-клетками, IL-17E индуцирует экспрессию цитокинов Th2 типа и хемокинов, таких, как CCL5 (RANTES) и CCL11 (Eotaxin), и может быть вовлечен в аллергические реакции [Fort M.M. et al., 2001]. С использованием экспериментальной модели на мышах было показано, что дефект рецепторного аппарата к IL-17 нарушает способность иммунной системы выполнять защитные функции. Так, мыши с дефектом IL-17RA характеризовались недостаточностью защитных реакций при инфекционных процессах, вызванных клебсиеллой, *Porphyromonas gingivalis*, *Toxoplasma gondii*, и кандидозах [Huang W. et al., 2004; Kelly M.N. et al., 2005; Yu J.J. et al., 2007].

Помимо представителей семейства IL-17 эффекторной молекулой Th17-клеток является CCL20, которая представляет собой лиганд для CCR6 и обладает свойствами хемоаттрактанта и антимикробной активностью [Hoover D.M. et al., 2002; Wilson N.J. et al., 2007]. При этом CCR6 экспрессируется и на Th17-клетках [Acosta-Rodriguez E.V. et al., 2007].

Другая субпопуляция Т-лимфоцитов – Th9 – характеризуется секрецией IL-9 и IL-10 (с преобладанием IL-9) при низкой продукции IL-4, IL-5 и IL-13 [Bettelli E. et al., 2007; Veldhoen M. et al., 2008]. Изначально IL-9 рассматривался как Т-

клеточный фактор роста и его эффекты оценивались в контексте иммунного ответа по Th2 типу. Так, показано, что IL-9 участвует в защите от гельминтной инфекции, а также в патогенезе бронхиальной астмы и аллергических реакций [Soroosh P., Doherty T.A., 2009]. Рецепторы к IL-9 обнаружены на различных клетках иммунной системы, в том числе на Т- и В-лимфоцитах, макрофагах, дендритных и тучных клетках, а также на эндотелиальных клетках дыхательных путей и незрелых нейронах. Предполагается, что Th9-лимфоциты обладают скорее эффекторными функциями, чем регуляторными. Так, клетки данной субпопуляции в условиях *in vitro* не могут подавлять пролиферацию Т-клеток [Longphre M. et al., 1999; Fontaine R.H. et al., 2008].

В отличие от перечисленных выше субпопуляций CD4⁺-лимфоцитов, обеспечивающих эффекторные реакции иммунитета, направленные на элиминацию патогенов, регуляторные Т-лимфоциты обеспечивают поддержание аутоотолерантности. В настоящее время выделяют следующие субпопуляции регуляторных CD4⁺-лимфоцитов, различающиеся механизмами иммуносупрессорного действия и фенотипом: Treg-клетки, натуральные (nTreg) и индуцибельные (iTreg), Tr1 и Th3-лимфоциты. Стоит отметить, что в некоторых случаях иммунологи относят Th3-лимфоциты к субпопуляции iTreg [Zhu J., Paul W.E., 2008]. В научной литературе представлены также свидетельства, что Th3-лимфоциты не обладают самостоятельным супрессорным значением, их функциональная активность связана с индукцией на периферии FoxP3-экспрессирующих клеток [Carrier Y. et al., 2007].

Основными клетками-мишенями регуляторных Т-лимфоцитов являются эффекторные CD4⁺-, CD8⁺- и В-лимфоциты [Nishikawa H. et al., 2005]. Рассматривается несколько механизмов иммуносупрессорного действия регуляторных Т-лимфоцитов. Во-первых, супрессия, опосредованная цитокинами IL-10, IFN- γ и TGF- β , является основным иммунорегуляторным механизмом для Tr1 и Th3-клеток [Vieira P.L. et al., 2004; Fitzgerald D.C. et al., 2007; Stumhofer J.S.

et al., 2007]. Кроме того, регуляторные CD4⁺-лимфоциты способны секретировать IL-2 и IL-6 [Sakaguchi S. et al., 2010].

Для Treg-клеток характерны контактные механизмы иммуносупрессии, включающие апоптоз клеток-мишеней, аденозин-зависимый и цАМФ-опосредованный пути иммуносупрессии. Апоптоз клеток-мишеней происходит под действием перфорина, гранзима А и гранзима В, секретируемых Treg-клетками. Например, показано, что Treg-клетки подавляют способность NK-клеток элиминировать опухолевые клетки путем лизиса самих NK-клеток посредством гранзима В и перфорина [Сао Х. et al., 2007]. Т-регуляторные клетки способны также подавлять активность эффекторных Т-лимфоцитов по аденозин-зависимому пути. Аденозин, секретируемый Treg-клетками, вызывает супрессорный эффект, связываясь с A2A-рецептором, подавляя в результате продукцию IL-6 и стимулируя продукцию TGF- β клетками-мишенями [Deaglio S. et al., 2007; Zarek P.E. et al., 2008].

Другим возможным вариантом иммуносупрессорного действия Treg-клеток является перенос вторичного мессенджера цАМФ, обладающего ингибирующим действием, в эффекторные Т-лимфоциты посредством щелевых мембранных контактов gap junction [Worr T. et al., 2009; Vodor J. et al., 2012]. Эффекты Treg-клеток на субпопуляции Т-лимфоцитов различны. Реакция CD8⁺-лимфоцитов заключается в замедлении процессов дифференцировки, уменьшении размеров клетки и ингибировании экспрессии α -цепи рецептора для IL-2. CD4⁺-лимфоциты сами приобретают супрессорный фенотип, то есть способность секретировать TGF- β и IL-10, а также подавлять пролиферативную и секреторную активность «вторичных» клеток-мишеней [Dieckmann D. et al., 2005].

Помимо прямого супрессорного влияния на эффекторные клетки, Treg-лимфоциты могут опосредовать свое действие через дендритные клетки. Передавая сигнал через CTLA-4-CD80/86, Treg стимулируют продукцию дендритными клетками индол-2,3-диоксигеназы (IDO), которая, в свою очередь, индуцирует катаболизм триптофана с образованием проапоптотических

метаболитов [Mellor A.L. et al., 2004; Feunou P. et al., 2007]. Treg-клетки также способны блокировать развитие дендритных клеток и их способность стимулировать Т-эффекторные клетки посредством белка Lag3, связывающегося с МНС класса II [Huang C.T., et al., 2004; Liang B. et al., 2008].

Таким образом, в зависимости от направления дифференцировки CD4⁺-лимфоциты обеспечивают формирование иммунного ответа в соответствии со свойствами патогена. Однако в условиях чрезмерной активации и нарушения баланса субпопуляций, роль CD4⁺-лимфоцитов в патогенезе иммунозависимых заболеваний становится очевидной.

1.1.2 Роль CD4⁺-лимфоцитов в патогенезе аутоиммунных заболеваний

Нарушение баланса CD4⁺-лимфоцитов, проявляющееся как неконтролируемой экспансией, так и недостаточной активностью эффекторных или регуляторных субпопуляций, является патогенетическим фактором иммуноопосредованных заболеваний. Согласно современным представлениям, иммунопатогенез ряда аутоиммунных заболеваний обусловлен избыточной функцией Th1-, Th17- и Th9-лимфоцитов и, напротив, недостаточностью регуляторного звена иммунитета, хотя вопрос о ведущей субпопуляции остается спорным. С другой стороны, избыточная активность регуляторных Т-лимфоцитов и, соответственно, супрессия эффекторных субпопуляций рассматриваются в качестве возможной причины сниженного противоопухолевого иммунитета.

Так как эффекторные механизмы Th1-лимфоцитов объясняли многие гистопатологические и клинические особенности экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита, диабета I типа и ревматоидного артрита, данные клетки длительное время считались основными индукторами орган-специфических аутоиммунных заболеваний [Jäger A., 2010].

В результате исследований, проведенных в последние два десятилетия XX века, было установлено, что энцефалитогенные Т-клетки характеризуются

профилем цитокинов Th1 типа. Основанием для такого вывода послужил тот факт, что IFN- γ был определен при повреждении центральной нервной системы у мышей с экспериментальным энцефаломиелитом и у пациентов с рассеянным склерозом, при этом IFN- γ усиливал симптомы болезни [Panitch H.S., 1987; Traugott U., 1988; Ando D.G., 1989]. Действительно, клоны Th1-лимфоцитов, специфичные к антигенам миелина, вовлекали в процесс демиелинизации макрофаги и индуцировали экспериментальный энцефаломиелит в результате адаптивного переноса [Kuchroo V.K., 1993].

Позднее было показано, что экспериментальные животные с отсутствием IFN- γ проявляли большую чувствительность к экспериментальному аутоиммунному энцефаломиелиту, а также к экспериментальному увеиту и коллаген-индуцированному артриту [Jones L.S. et al., 1997; Matthys P. et al., 1998]. Дефект ряда других молекул, вовлеченных в дифференцировку по Th1-типу, включая IFN- γ R, STAT-1 и IL-12p35 субъединицу, приводил к увеличению риска развития аутоиммунного процесса. При этом недостаточность субъединицы p40 IL-12, образующей с субъединицей p19 IL-23, также, как и нарушение синтеза IL-23, приводило к существенному увеличению устойчивости мышей к экспериментальному аутоиммунному энцефаломиелиту [Oppmann B. et al., 2000; Sua D.J. et al., 2003; Langrish C.L. et al., 2005]. Данные факты требовали пересмотра гипотезы о ведущей роли Th1-клеток в развитии аутоиммунной патологии.

В настоящее время накопилось множество данных, свидетельствующих, что ведущим фактором патогенеза аутоиммунного энцефаломиелита и других аутоиммунных заболеваний являются Th17-клетки. Повышение уровня IL-17, продуцируемого Th17-лимфоцитами, было обнаружено при рассеянном склерозе, ревматоидном артрите и псориазе [Kagami S. et al., 2010; Chen Y.C. et al., 2012; Röllinger B., 2012; Roşu A. et al., 2012; Yilmaz S.B. et al., 2012; Mrabet D. et al., 2013]. Было показано также, что дефект IL-17 сопровождался более благоприятным течением коллаген-индуцированного артрита и

экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита [Nakae S. et al., 2003; Hofstetter H.H. et al., 2005; Ishigame H. et al., 2009]. Препреклинические исследования свидетельствуют об улучшении течения экспериментального псориаза и ревматоидного артрита в результате введения антител, нейтрализующих IL-17 [Chiricozzi A., Krueger J.G., 2013; Bai F. et al., 2014].

Роль Th2-лимфоцитов в патогенезе иммуноопосредованных заболеваний неоднозначна. При системной красной волчанке Th2-лимфоциты обуславливают продукцию аутореактивных антител, стимулируя В-лимфоциты [Singh R.R., 2003]. С другой стороны, результаты исследований с использованием экспериментальных моделей аутоиммунного энцефаломиелита показали, что Th2-клетки не являются триггерными. Так, перенос Th2-лимфоцитов, реактивных к компонентам миелина, не индуцировал заболевание у мышей-реципиентов [Das M.P. et al., 1997; Jäger A. et al., 2009]. Несмотря на то, что Th2-лимфоциты обладают противовоспалительными свойствами, эффекторные реакции Th2-опосредованного иммунного ответа вовлечены в патогенез аллергических заболеваний.

При исследовании *in vivo* роли Th9-лимфоцитов в патогенезе аутоиммунных заболеваний на экспериментальной модели колита было показано, что котрансфер Th9-лимфоцитов с эффекторными клетками усиливал выраженность заболевания [Dardalhon V. et al., 2008]. Было также продемонстрировано, что генерированные *in vitro* Th9-лимфоциты, специфичные к гликопротеину миелина, индуцируют экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит при адаптивной трансплантации. При этом демиелинизация и периферический неврит в дорсальных корешках нервных волокон были более выражены, чем при трансплантации Th1- и Th17-клеток [Jäger A. et al., 2009].

Регуляторные Т-лимфоциты, обеспечивая аутоотолерантность, препятствуют развитию аутоиммунной патологии. Функциональный дефект или недостаточность Treg-лимфоцитов может лежать в основе развития аутоиммунных заболеваний. Так, мыши с дефектом транскрипционного фактора

дифференцировки FoxP3 характеризовались гиперпролиферацией эффекторных Th-лимфоцитов и высоким уровнем эффекторных цитокинов, что сопровождалось аутоиммунным воспалением различных тканей [Brunkow M.E. et al., 2001]. У пациентов с X-сцепленным IPEX синдромом (immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome), проявляющимся полиорганным воспалением, в том числе инсулинозависимым сахарным диабетом, псориаз-подобным дерматитом, увеличением вторичных лимфоидных органов, была обнаружена мутация гена FoxP3 [Bennett C.L., Ochs H.D., 2001]. Нарушение функции Treg-клеток, при их нормальном количестве, отмечалось у пациентов с системной красной волчанкой [Alvarado-Sanchez B. et al., 2006].

Недостаточность IL-27, необходимого для дифференцировки по пути Tr1, приводила к усилению прогрессии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита, что сопровождалось увеличением количества Th17-клеток [Batten M. et al., 2006]. Адаптивный перенос антигенспецифических Tr1-клеток индуцировал толерантность в модели трансплантации клеток поджелудочной железы [Gagliani N. et al., 2010].

Патогенетическая роль эффекторных и регуляторных субпопуляций CD4⁺-лимфоцитов при патологических процессах разного генеза обуславливает фундаментальную и практическую значимость исследований механизмов регуляции их дифференцировки, функциональной активности и гибели – процессов, являющихся основой формирования баланса CD4⁺-лимфоцитов.

1.2 Молекулярные механизмы активации и дифференцировки CD4⁺-лимфоцитов

Активация CD4⁺-лимфоцитов происходит в процессе распознавания антигена, презентруемого на антиген-презентирующей клетке в ассоциации с молекулой главного комплекса гистосовместимости (МНС) I или II класса, через комплекс Т-клеточный рецептор-CD3 (TCR-CD3). TCR представляет собой

гетеродимер, содержащий α - и β -цепи. CD3 состоит из четырех субъединиц: ϵ , γ , δ и ζ – взаимодействующих с TCR в виде трех димеров $\epsilon\gamma$, $\epsilon\delta$ и $\zeta\zeta$ [Weiss A., 1993; Call M.E., Wucherpfennig K.W., 2007]. Молекулы МНС распознаются корцептором Т-лимфоцитов CD4, что обеспечивает дополнительную прочность взаимодействия лимфоцита с антигенным пептидом.

Необходимым условием адекватной Т-клеточной активации является наличие дополнительного стимула через CD28, лигандами для которого являются молекулы антигенпрезентирующих клеток CD80/B7.1 и CD80/B7.2. При этом, в случае отсутствия стимуляции через CD28, в клетках запускается программа клональной анергии или апоптоза [Linsley P.S., Ledbetter J.A., 1993; Rudd C.E. et al., 2009; Poirier N. et al., 2011].

Первым этапом в антиген-индуцированном сигнальном каскаде является активация тирозинкиназ Src-семейства - Lck и Fyn, и тирозинкиназы Syk-семейства ZAP-70 (ζ associated protein kinase, 70 кДа), а также адаптерных белков LAT, SLP-76, Grb2, обменного фактора Rho-семейства Vav и др. [Simeoni L., 2004; Zamoyska R., Lovatt M., 2004]. Тирозинкиназы Lck, Fyn и ZAP-70 напрямую или через адаптерные белки активируют фосфолипазу $C\gamma$ (PLC γ) и GTP-связывающие белки Ras, Rac-1, Cdc42 и Rho. PLC γ инициирует гидролиз фосфатидилинозитол-4,5-бифосфата (PIP2) и, как следствие, активацию протеинкиназы C (PKC) и повышение уровня Ca^{2+} , который стимулирует белок кальцинейрин, обладающий фосфатазной активностью и активирующий NF-AT. GTP-связывающие белки активируют θ -форму PKC (PKC θ), а также запускают сигнальный каскад, приводящий к стимуляции основных факторов семейства митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) – ERK, JNK и p38-киназы. PKC θ и JNK активируют NF- κ B, а ERK и JNK индуцируют синтез белков Fos и Jun, входящих в состав AP-1 [Куклина Е.М., 2013].

Действующие в момент активации костимуляторные сигналы от антиген-презентирующих клеток и факторов микроокружения определяют направление дифференцировки CD4⁺-лимфоцитов (рисунок 1).

Th1-клетки дифференцируются из наивных Th-лимфоцитов в присутствии IFN- γ . Активация IFN- γ R приводит к фосфорилированию STAT1 и экспрессии транскрипционного фактора T-bet, который трансаktivирует ген IFN- γ и специфическую субъединицу рецептора к IL-12 – IL-12R β 2. Таким образом, клетки становятся чувствительны к IL-12, продуцируемому активированными антигенпрезентирующими клетками, который через STAT4 стабилизирует Th1 фенотип [Yang J., 1999; Jäger A., 2010; Miller S.A., Weinmann A.S., 2010; Kanhere A. et al, 2012].

В случае преобладания в микроокружении CD4⁺-лимфоцитов IL-4 происходит дифференцировка клеток по направлению Th2 (рисунок 1). Данный процесс обусловлен трансдукцией сигнала через IL-4R и фосфорилированием STAT6, что приводит к индукции транскрипционного фактора GATA3, ответственного за формирование Th2-фенотипа. GATA3 трансаktivирует цитокины IL-4, IL-5 и IL-13, подавляя при этом STAT4 и IL-12R β 2. IL-4 по механизму положительной ауторегуляции потенцирует дифференцировку Th2-клеток [Swain S.L. et al., 1990; Zhou M., Ouyang W., 2003; Zhu J. et al., 2006; Kanhere A. et al, 2012].

Дифференцировка наивных CD4⁺-лимфоцитов в Th17-клетки требует присутствия в среде TGF- β и IL-6 [Bettelli E. et al., 2006; Mangan P.R. et al., 2006; Veldhoen M. et al., 2006] (рисунок 1). Трансдукция сигнала от IL-6 ведет к фосфорилированию STAT3 и последующей экспрессии транскрипционного фактора ROR γ c. Данный транскрипционный фактор трансаktivирует цитокины, ответственные за фенотип Th17-клеток: IL-17A, IL-17F, IL-23R [Yang X.O. et al., 2007; Zhou L., Littman D.R., 2009]. В дополнении к ROR γ t, транскрипционный фактор ROR α участвует в дифференцировке по пути Th17, что было подтверждено частичным нарушением дифференцировки данного направления в результате делеции одного из транскрипционных факторов. При делеции обоих факторов Th17-дифференцировка отсутствовала [Yang X.O. et al., 2008]. Помимо

IL-6 дифференцировка по пути Th17, хоть и менее выраженная, наблюдается в присутствии IL-21, регулируемого c-maf.

Для поддержания Th17-фенотипа уже дифференцированных клеток необходим IL-23, что было показано на мышах с дефектом как IL-23, так и рецепторов к нему [McGeachy M.J. et al., 2009; Awasthi A. et al., 2009]. Рецептор к IL-23 появляется в процессе дифференцировки и состоит из IL-12R β 1 цепи, входящей также в состав рецептора к IL-12, и специфической цепи IL-23R [Parham C. et al., 2002]. Связывание IL-23 со своим рецептором приводит к фосфорилированию STAT3, стабилизации фенотипа Th17 и повышению экспрессии IL-23R [Awasthi A. et al., 2009].

При действии TGF- β и IL-2 CD4⁺-лимфоциты дифференцируются в регуляторные T-клетки (рисунок 1) [Deaglio S., 2007]. При этом регуляторные клетки, дифференцированные в тимусе, являются натуральными T-регуляторными клетками (nTreg), а дифференцированные на периферии в процессе распознавания антигена – индуцибельными (iTreg).

Предполагается, что экспрессия транскрипционного фактора FoxP3 запускается под действием STAT5 и STAT3, активируемых в результате трансдукции сигнала от IL-2R через JAK1 и JAK3 [Mayack S.R., Berg L.J. 2006; Zorn E. et al., 2006]. Путь трансдукции сигнала от GFB- β 1, необходимый для экспрессии FoxP3, достоверно не описан. Возможно, происходит перекрест пути GFB- β 1R с сигнальным каскадом от CTLA-4, активированным лигандом B7, через убиквитин-лигазу Cbl-b. В результате происходит фосфорилирование Smad2/3, образование и транслокация в ядро комплекса Smad2/4 или Smad3/4, привлечение коактиваторов с гистон-ацетил трансферазной активностью, например CBP/p300, и активация экспрессии Foxp3 [Zhang L. et al., 2006; Zhang L., Zhao Y., 2007].

В присутствии TGF- β и IL-27 происходит генерация Tr1-клеток [Vieira P.L. et al., 2004; Fitzgerald D.C. et al., 2007; Stumhofer J.S. et al., 2007]. Дифференцировке Tr1-клеток способствует также транскрипционный фактор c-maf, который индуцирует IL-21, действующий как аутокринный ростовой фактор

[Pot C. et al., 2009]. Указанный тип клеток характеризуется отсутствием транскрипционного фактора FoxP3, однако данных о специфическом транскрипционном факторе для Tr1-клеток в доступной нам литературе обнаружено не было.

Комбинация TGF- β и IL-4 приводит к дифференцировке клеток в Th9-лимфоциты, характеризуемые отсутствием экспрессии транскрипционных факторов GATA-3, ROR γ t, FoxP3, хотя собственного транскрипционного фактора для Th9-лимфоцитов не описано [Dardalhon V. et al., 2008; Veldhoen M. et al., 2008]. Продукцию IL-9 увеличивает IL-25 [Angkasekwinai P. et al., 2010].

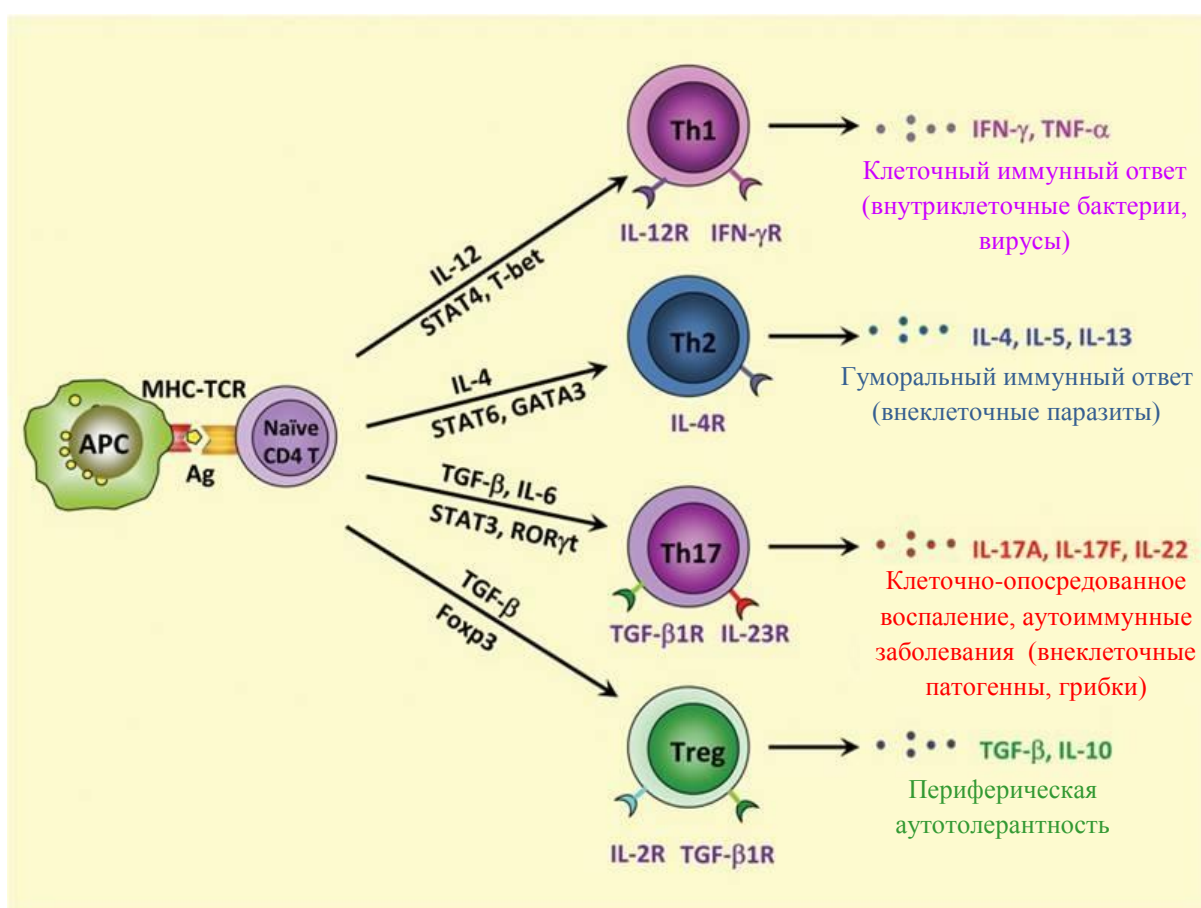


Рисунок 1. Основные направления дифференцировки CD4⁺-лимфоцитов и их функциональная активность [по данным S. Leung et al., 2010].

Примечание: Ag- антиген; APC – антигенпрезентирующая клетка; IFN- γ – интерферон-гамма; IL – интерлейкин; MHC - главный комплекс гистосовместимости; Naive CD4 T – наивный CD4⁺-лимфоцит; TCR - T-клеточный рецептор; TGF- β – трансформирующий ростовой фактор, бета; Th – Т-хелпер; TNF- α – фактор некроза опухоли альфа.

Стоит отметить, что CD4⁺-лимфоциты обладают некоторой пластичностью дифференцировки. Так, Th9-лимфоциты при определенных условиях микроокружения начинают продуцировать IFN- γ или IL-17, сохраняя при этом свой специфический набор цитокинов [Dardalhon V. et al., 2008]. Th17-клетки, в свою очередь, способны секретировать IL-9 под действием IL-2 [Jäger A. et al., 2009; Elyaman W. et al., 2009]. Регуляторные T-лимфоциты могут одновременно с FoxP3 экспрессировать и ROR γ t, а также начинают продуцировать IL-17 при действии IL-6, что было показано как *in vitro*, так и *in vivo* [Lochner M. et al., 2008; Yang X.O. et al., 2008; Zhou L. et al., 2008; Voo K.S. et al., 2009].

Таким образом, в зависимости от условий активации CD4⁺-лимфоцитов происходит их дифференцировка и формируется пул функционально активных клеток. Так происходит реализация одного из механизмов формирования баланса CD4⁺-лимфоцитов.

1.2.1 Молекулярные механизмы регуляции апоптотической гибели лимфоцитов

В совокупности с процессами активации, дифференцировки и анергии большое значение в формировании гомеостаза CD4⁺-лимфоцитов играет апоптоз. В настоящее время под апоптозом понимают энергозависимый, генетически детерминированный процесс упорядоченной гибели отдельных клеток, который происходит в интактных и патологически измененных тканях эукариот при действии внутри- и внеклеточных стимулов [Черешнев В.А. и соавт., 2011].

Программированная клеточная гибель обеспечивает контроль иммунного ответа на всех этапах лимфопоэза, начиная со стадии кроветворных клеток, когда апоптоз запускается в отсутствие колониестимулирующих факторов [Потапнев М. П., 2002; Лунев Д.А. и соавт., 2010]. В тимусе посредством апоптоза происходит негативная селекция аутореактивных T-лимфоцитов, в этом случае

апоптоз является ключевым механизмом поддержания аутоотолерантности [Sohn S.J. et al., 2007].

Особое значение имеет, так называемый, активационный апоптоз Т- и В-лимфоцитов, происходящий в случае активации рецепторов TCR или BCR при отсутствии костимуляции через CD28 или CD40, а также в случае повторного действия лиганда на активированную клетку при дефиците ростовых факторов, прежде всего IL-2.

При действии кортикостероидов апоптозу подвергаются Т-лимфоциты и кортикальные тимоциты [Starr T.K. et al., 2003]. Индукция апоптоза при действии Fas-L, экспрессируемого на клетках Сертоли и клетках передней камеры глаза, обеспечивает защиту от аутореактивных лимфоцитов [Giovannetti A. et al., 2008]. Кроме того, запрограммированная клеточная гибель является одним из механизмов реализации иммуносупрессорного действия регуляторных Т-лимфоцитов [Vignali D.A. et al., 2008; Акинфиева О.В., Бубнова Л.Н., 2010].

Выделяют несколько путей передачи апоптоз-индуцирующего сигнала. Рецепторный путь запускается в результате взаимодействия таких лигандов как TNF- α , FasL, Apo2L (известный также как TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand)) и Apo3L (TWEAK (TNF-related WEAK inducer of apoptosis)) со своими рецепторами, называемыми рецепторами смерти. Рецепторы смерти TNFR (TNFR1, FasR, DR4, DR5 и DR3) в цитоплазматической части содержат «домены смерти» (DD – death domain), связывающие адаптерный белок FADD, на котором происходит аутокатализ инициаторной каспазы-8 [Wajant H., 2002; Elmore S., 2007].

Запуск митохондриального пути связан с увеличением проницаемости митохондриальной мембраны, которая контролируется белками семейства Bcl-2, разделенными на три группы в соответствии с содержанием родственных структурно-функциональных доменов BH (Bcl-2 homology). Проапоптотические белки данного семейства, Bax и Bak, формируют поры во внешней мембране митохондрий [Elmore S., 2007; Martinou J.C., Youle R.J., 2011]. Активность белков

Вах и Вак – необходимое условие повышения проницаемости митохондриальной мембраны. Клетки, имеющие дефект данных белков, являются стойкими ко многим проапоптотическим стимулам. В исходном состоянии активность Вах и Вак компенсирована активностью группы антиапоптотических белков, основным представителем которых является белок Bcl-2. Белки Bid, Bad и другие, содержащие только один домен ВНЗ, выполняют регуляторную роль, участвуя во взаимодействии проапоптотических эффекторных и антиапоптотических белков [Martinou J.C., Youle R.J., 2011]. В результате повышения проницаемости митохондриальной мембраны в цитозоль выходит цитохром с, образующий с мономерной протеазой Apaf-1 (Apoptose protease activation factor) апоптосому, активирующую инициаторную каспазу-9 [Pop C. et al., 2006; Bratton S.B., Salvesen G.S., 2010]. Кроме того, в цитоплазму выходят эндонуклеаза G и AIF (Apoptosis inducing factor) – эндонуклеаза, вызывающая конденсацию хроматина и фрагментацию ядра, запускающие апоптоз по каспаз-независимому пути [Penninger J.M., Kroemer G., 2003].

Распространенным в реакциях иммунитета является перфорин/гранзимовый путь индукции апоптоза, запускаемый сериновыми протеазами – гранзимом А и гранзимом В, попадающими в клетку-мишень через поры, образованные перфорином. Гранзим В в результате протеолиза по остаткам аспарагиновой кислоты активирует каспазу-10 и расщепляет ингибитор каспаз-активируемых ДНКаз – ICAD (Inhibitor of Caspase Activated DNase). Показано, что гранзим В может индуцировать запуск митохондриального пути через белок Bid. В дополнение к этому гранзим В способен непосредственно активировать каспазу-3 [Metkar S.S. et al., 2003; Chowdhury D., Lieberman J., 2008]. Гранзим А, активируя каспазы, напрямую запускает апоптотическую гибель, кроме того гранзим А способствует фрагментации ДНК [Lieberman J., 2010].

При повреждении ДНК при действии ионизирующего или ультрафиолетового излучения и в результате некоторых других воздействий происходит активация гена p53. Продукт этого гена – белок с молекулярной

массой 53 кДа – является фактором транскрипции, вызывающим задержку клеточного цикла в фазах G1 и G2 для репарации повреждений ДНК. Если же активность репарационных систем недостаточна, то длительно сохраняющий свою активность белок p53 начинает индуцировать апоптоз через стимуляцию генов «рецепторов смерти» или проапоптотических белков семейства Bcl-2, преимущественно Noxa и Puma [Ozaki T., Nakagawara A., 2011].

Основными молекулами реализации необратимых изменений, характерных для апоптоза, являются каспазы (cysteinyll aspartate-specific proteinases) – цистеиновые протеазы, гидролизующие пептидную связь после аспарагиновой кислоты. Инициаторные каспазы – каспаза-8, -10, активируемые в случае передачи сигнала по рецепторному пути, и каспаза-9, вовлеченная в митохондриальный путь, путем протеолитического расщепления активируют эффекторные каспазы – каспаза-3, -6 и -7. Эффекторные каспазы осуществляют протеолиз белков ядра (ламины, гистон H1, топоизомеразы, белки, отвечающие за сплайсинг мРНК, репликативный фактор C и др.) и цитоскелета (гельзолин, фодрин, G-актин, спектрин и т.д.) [MacKenzie S.H., Clark A.C., 2012].

Процессы индукции апоптоза в клетке компенсированы противоапоптотическими механизмами. Белки семейства IAP (inhibitors of apoptosis proteins) представляют собой естественную систему защиты клеток от апоптоза. Основные представители семейства IAP – белки XIAP, c-IAP1, c-IAP2, Survivin, связываясь с каспазой-3, -6, -7 и -9, ингибируют их протеолитический процессинг. Механизм ингибирования каспаз белками c-IAPs остается недостаточно изученным [Graber T.E., Holcik M., 2011]. NF- κ B обеспечивает антиапоптотический механизм регуляции, активируя транскрипцию генов FLIP, Bcl-xL, TRAF и c-IAP. Транслокация NF- κ B в ядро связана с его высвобождением из комплекса с ингибитором I- κ B в результате трансдукции сигналов от рецепторов TNFR2, IL-1R и EGFR [Da Silva-Ferrada E. et al., 2011].

Вне зависимости от индуцирующего сигнала, эффекторные механизмы приводят к морфологическим и биохимическим изменениям, характерным и

универсальным для апоптоза. Морфологически апоптоз проявляется в уменьшении размера клетки, конденсации и фрагментации хроматина, уплотнении наружной и цитоплазматических мембран без выхода содержимого клетки в окружающую среду. Конденсация хроматина проявляется в течение одного часа. Клетка округляется, отделяясь от прилежащих клеток. В цитоплазме эндоплазматический ретикулум расширяется и образует везикулы, гранулы конденсируются и сморщиваются. Вокруг фрагментов ядра появляются вдавления ядерной мембраны. Позже эти фрагменты отшнуровываются и образуют апоптотические тельца, которые нередко содержат митохондрии и другие органеллы.

Клетки, находящиеся в состоянии апоптоза, трудно выявить в тканях *in situ* в связи с тем, что они быстро подвергаются фагоцитозу не только макрофагами и нейтрофилами, но и другими окружающими клетками, не являющимися «профессиональными» фагоцитами. Быстрота фагоцитирования связана с экспрессией (вследствие реорганизации мембраны) на поверхности апоптотических клеток молекул, распознаваемых фагоцитами. Такими молекулами являются фосфатидилсерин, тромбоспондин, десИАлированные мембранные гликопротеины и гликолипиды. Проницаемость цитоплазматической мембраны повышается лишь для небольших молекул, например для пропилий йодида, что рассматривается как признак необратимой стадии апоптоза [Кудрявцев И.В. и соавт., 2012; Wlodkowic D. et al., 2011].

Таким образом, регулируя процессы программированной клеточной гибели, активации, дифференцировки и функциональной активности, молекулы кооперации клеток иммунной системы участвуют в формировании баланса CD4⁺-лимфоцитов.

1.3 Галектин-1: структура, функции, механизмы влияния на клетки-мишени

1.3.1 Структура и функции галектина-1

Галектин-1 – первый описанный представитель семейства галектинов – β -галактозид-связывающих белков. Название данного семейства было введено в 1994 году и объединило лектины с консервативной гомологичной аминокислотной последовательностью углевод-распознающего домена (CRD, carbohydrate-recognition domain). Первоначально белки данного семейства были обозначены как S-лектины, так как первые изученные представители (галектин-1 и -2) сохраняли свою активность только в присутствии тиоловых групп. По мере открытия новых белков, семейство галектинов было расширено и включило в себя лектины с тиолнезависимой активностью. К настоящему времени в клетках млекопитающих идентифицировано 15 представителей данного семейства, которые разделяют на следующие основные группы:

- прототип (галектин-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 и -15) – белки имеют один CRD (углевод-распознающий домен) и существуют в виде мономеров или гомодимеров;

- тандем-тип (галектин-4, -6, -8, -9 и -12) – белки содержат два CRDs на одной полипептидной цепи;

- химерный тип (galectin-3; ~30 kDa) – белок состоит из CRD и нелектиновой части, богатой пролином и глицином; способен образовывать пентамеры при связывании с мультивалентными углеводами [Yang R.Y. et al., 2008].

Галектин-1 представляет собой белок с молекулярной массой 15 кДа. Углевод-распознающий домен галектина-1 содержит около 130 аминокислот и представляет собой две антипараллельные β -складчатые структуры, одна из которых образована шестью, а другая – пятью пептидными цепями (рисунок 2). Галектин-1 в растворе может образовывать гомодимеры и, в результате,

формировать упорядоченное множество лектин-углеводных комплексов, называемое решеткой [Yang R.Y. et al., 2008].

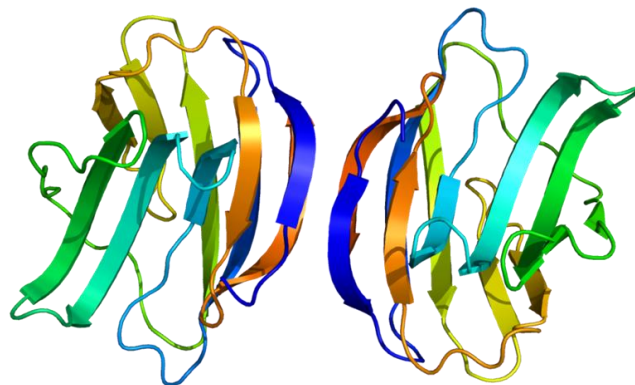


Рисунок 2. Кристаллическая структура галектина-1 в форме димера (рентгеноструктурный анализ) [по данным Worldwide Protein Data Bank (wwPDB) // URL : <http://www.wwpdb.org/>]

Экспрессия галектина-1 обнаружена в клетках лимфоузлов, тимуса, селезенки, а также в макрофагах, В-клетках и дендритных клетках. Помимо клеток иммунной системы галектин-1 экспрессируется в кардиомиоцитах, гепатоцитах, клетках простаты, сетчатке, плаценте и тестикулах [Yang R.Y. et al., 2008].

Хотя к настоящему времени установлено содержание галектинов во внеклеточном пространстве, путь их секреции остается невыясненным. Исходя из результатов ряда работ, было сделано заключение о неклассическом пути секреции, минуя эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи [Hughes R.C., 1999]. К. Denzer et al. [2000] предположили, что галектин-1 выходит во внеклеточное пространство, связываясь с экзосомами, образующимися в результате слияния мультивезикулярных телец с плазматической мембраной [Denzer K. et al., 2000]. Кроме того, С. Seelenmeyer et al. [2005] продемонстрировали участие в его секреции гликанов клеточной поверхности, аффинных к галектину-1 [Seelenmeyer C. et al., 2005].

Галектин-1 участвует в кооперации клеток, прежде всего клеток иммунной системы, путем связывания углевод-распознающего домена с поли-N-

ацетиллактозамин-богатыми гликолипидами и гликопротеинами клеточной поверхности. Основными гликанами, специфичными для галектина-1, являются CD45, CD43, CD7, CD2, CD3, ганглиозид GM1, а также ламинин и фибронектин [Amano M. et al., 2003; Stillman B.N. et al., 2006; Earl L.A, Baum L.G., 2008; Wang J. et al., 2009]. В связи с этим, экспрессия данных гликопротеинов и профиль их гликозилирования определяют чувствительность клеток к действию галектина-1.

Профиль гликозилирования клеток определяется активностью гликозилтрансфераз, создающих или маскирующих специфические поверхностные гликаны. Так, для галектин-1-индуцированной клеточной гибели необходимо присутствие в клетке активной формы β -1-6N-ацетилглюкозаминилтрансферазы (core-2 GCNT1). Этот фермент ответственен за образование core 2-ветвящихся O-гликанов и экспонирование поли-N-ацетиллактозаминных последовательностей, через которые галектин связывается и передает сигнал [Earl L.A. et al., 2010].

Кроме того, устойчивость T-лимфоцитов, в частности наивных клеток, к галектину-1 может быть обусловлена увеличенной экспрессией ST6Gal1 (α 2-6-сиалилтрансферазы) – фермента, осуществляющего добавление сиаловой кислоты в α 2-6-положение терминальной галактозы [Toscano M.A. et al., 2007; Valenzuela H.F., et al. 2007; Zhuo Y., Bellis S.L., 2011].

Помимо внеклеточного действия рассматривается возможность галектинов регулировать активность клетки изнутри. A. Vyakarnam et al. [1997] обнаружили участие галектина-1 в сплайсинге пре-мРНК [Vyakarnam A. et al., 1997]. Известно, что галектины могут перемещаться из цитоплазмы в ядро или связываться с внутриклеточными везикулами при определенных условиях [Liu F.T. et al., 2002]. Внутриклеточные функции галектинов мало изучены и механизмы их реализации еще в полной мере не идентифицированы.

1.3.2 Роль галектина-1 в регуляции иммунного ответа

В результате активно проводимых исследований в различных лабораториях мира на экспериментальных моделях *in vivo*, а также в культурах клеток *in vitro*, к настоящему моменту накоплены некоторые данные о влиянии галектина-1 на клетки врожденного и приобретенного иммунитета.

Во-первых, галектин-1 снижает активность захвата, перемещения и адгезии нейтрофилов к активированному эндотелиальному монослою *in vitro* [La M. et al., 2003; Cooper D. et al., 2008]. Кроме того, согласно результатам ряда исследований, галектин-1 вызывает переход фосфатидилсерина на внешнюю сторону клеточной мембраны в отсутствие фрагментации ДНК. На основании этого было сделано предположение о способности галектина-1 регулировать продолжительность жизни нейтрофилов, не вызывая полной реализации программы апоптоза [Stowell S.R., et al. 2009]. Названные эффекты галектина-1 говорят о его противовоспалительных свойствах, однако данный белок может оказывать и провоспалительное действие, активируя НАДФ-оксидазу в нейтрофилах, способствуя, тем самым, выходу супероксида из клеток [Almkvist J. et al., 2002].

Важным звеном противовоспалительного действия галектина-1 является его влияние на моноциты и макрофаги. Предполагается, что галектин-1 снижает продукцию медиаторов воспаления: описано нарушение мобилизации арахидоновой кислоты и ингибирование секреции простагландина E₂ в макрофагах при действии на них данного лектина [Rabinovich G.A. et al., 2000]. В дополнение к этому, галектин-1 способен определять путь активации клеток моноцитарного происхождения.

О роли галектина-1 в альтернативной активации макрофагов свидетельствуют снижение синтеза оксида азота, ингибирование индуцибельной NO-синтазы и увеличение активности аргиназы в перитонеальных крысиных макрофагах, а также блокирование секреции IL-12 макрофагами, инфицированными *Trypanosoma cruzi*, при действии данного лектина [Correa S.G.

et al., 2003]. Кроме того, галектин-1 подавляет IFN- γ -индуцированный Fc- γ RI-зависимый (type I IgG Fc receptor) фагоцитоз и снижает экспрессию главного комплекса гистосовместимости (МНС) II на человеческих моноцитах и макрофагах [Barrionuevo P. et al., 2007].

В проведенных к настоящему времени исследованиях апоптозиндуцирующей способности галектина-1 в отношении моноцитов и макрофагов выявлено не было. Стоит отметить, что в сравнительно недавних исследованиях S. Mercier et al. [2008] обнаружена потенцирующая роль галектина-1 в ВИЧ-инфицировании макрофагов путем стабилизации вирусной адсорбции.

J.A. Fulcher et al. [2006] обнаружили увеличение миграционной способности дендритных клеток, полученных из моноцитов человека, культивированных в присутствии рекомбинантного галектина-1. Кроме того, авторами было выявлено увеличение чувствительности дендритных клеток к липополисахаридам при добавлении галектина-1. M.J. Perone et al. [2006] продемонстрировали способность трансгенных дендритных клеток с повышенной экспрессией галектина-1 стимулировать наивные Т-клетки и инициировать апоптоз в активированных Т-клетках. В ряде работ показано, что галектин-1 индуцирует анергию дендритных клеток или созревание толерогенных дендритных клеток, сопровождающихся секрецией IL-10 [Parregui J.M. et al., 2009; Kuo P.L. et al., 2011]. Позднее было показано, что нокаут гена галектина-1 в дендритных клетках приводил к усилению аллогенного Т-клеточного ответа с преобладанием IFN- γ при низком уровне IL-10 [Mobergslien A., Sioud M., 2012].

Роль галектина-1 в регуляции функциональной активности тучных клеток изучена мало. Высказано предположение, что данный лектин препятствует дегрануляции тучных клеток. Оно основано на факте снижения интенсивности отека, индуцированного фосфолипазой A2 пчелиного яда, после инъекции галектина-1 [Rabinovich G.A. et al., 2000]. Установлено, что рекомбинантный

галектин-1, в отличие от галектина-3, не способен индуцировать апоптоз тучных клеток [Suzuki Y. et al., 2008].

В настоящее время считается, что галектин-1 регулирует процессы созревания и активации Т-клеток в первичных и вторичных лимфоидных органах, при этом, действие его на тимоциты и периферические лимфоциты во многом различается. Так, S.D. Liu et al. [2008], изучая особенности Т-лимфопоэза у мышей с дефектом галектина-1, установили, что в тимусе эндогенный галектин-1 препятствует позитивной и способствует негативной селекции CD8⁺Т-клеток, а также стимулирует созревание регуляторных CD8 $\alpha\alpha$ интестинальных интраэпителиальных лимфоцитов (IEL – intestinal intraepithelial lymphocytes) [Liu S.D. et al., 2008]. Рекомбинантный галектин-1 увеличивает связывание Т-клеточных рецепторов (TCR) CD4⁺CD8⁺timoцитов с комплексом АГ/МНС (антиген/главный комплекс гистосовместимости), а также способствует быстрой и транзитной активации ERK (extracellular signal-regulated kinase) в ходе негативной селекции и, напротив, ингибирует ERK в тимоцитах, проходящих позитивную селекцию [Liu S.D. et al., 2008].

S.D. Chung et al. [2000] на клеточных линиях CD4⁻CD8⁻ и CD4⁺-лимфоцитов показали, что галектин-1 является антагонистом сигналов положительной селекции, способствуя частичному фосфорилированию ζ -цепи TCR при распознавании антигена. В исследованиях на CD8⁺-спленоцитах gal1-1^{-/-} мышей установлена роль галектина-1 в отношении периферических CD8⁺-лимфоцитов после активации TCR: галектин-1 снижает пролиферацию (клональную экспансию), индуцирует апоптоз делящихся клеток, ингибирует продукцию IL-2 и препятствует увеличению размеров клеток. Наблюдаемые эффекты авторы связывают со способностью данного лектина препятствовать стойкому связыванию TCR с агонистом, а также с участием в SHP-1-опосредованной отрицательной обратной связи. Галектин-1 препятствует активации киназы ERK, которая фосфорилирует ответственную за активацию клеток протеинкиназу Lck. Снижение фосфорилирования Lck при действии

галектина-1 делает ее доступной для фосфотазы SHP-1, что ингибирует активацию клеток [Chung C.D. et al., 2000].

Галектин-1 также препятствует миграции Т-клеток, блокируя их адгезию к экстрацеллюлярному матриксу [Rabinovich G.A. et al., 1999] или подавляя трансэндотелиальную миграцию за счет механизма, связанного с CD43 кластеризацией [He J., Baum L.G., 2006]. С использованием siРНК было обнаружено, что галектин-1 ограничивает захват, перемещение и адгезию Т-клеток к активированным эндотелиальным клеткам [Norling L.V., 2008].

Особый интерес, на наш взгляд, представляет роль галектина-1 в поляризации иммунного ответа. На основании данных об изменении цитокинового профиля в различных экспериментальных моделях было сделано предположение, что данный лектин избирательно подавляет Th1- и Th17-опосредованные реакции и смещает иммунный ответ в Th2-направлении [Rabinovich G.A. et al., 1999; Santucci L. et al., 2003; Perone M.J. et al., 2009]. Предполагается, что галектин-1 является важным индуктором регуляторных Т-клеток и опосредует, по крайней мере, часть иммуносупрессорных функций Treg-лимфоцитов [Juszczynski P. et al., 2007; Garín M.I. et al., 2007; Wu G. et al., 2011]. На основании представленных в литературе данных было сделано предположение об участии галектина-1 в лектин-зависимом механизме кросс-регуляции между отдельными субпопуляциями Th-лимфоцитов.

Важной особенностью регуляторного действия галектина-1 является изменение чувствительности Т-лимфоцитов к данному лектину в зависимости от стадии созревания и активации: на ранних этапах связывания TCR галектин-1 не влияет на активацию клеток. Это, вероятно, связано с изменением профиля гликозилирования по мере активации лимфоцитов, а также с увеличением уровня экспрессии галектина-1 с течением времени (24-72 ч) после стимуляции [Grigorian A. et al., 2009; Clark M.C., Baum L.G., 2012].

Исследования последних пяти лет продемонстрировали ключевую роль галектина-1 в гомеостазе В-клеток, дифференцировке и регуляции их

жизнеспособности. Галектин-1 экспрессируется стромальными клетками костного мозга, окружающими пре-В-лимфоциты и участвует в формировании иммунных синапсов. Связываясь с $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ и $\alpha 4\beta 7$ интегринами В-лимфоцитов, данный лектин способствует активации пре-В-клеток и в то же время негативно регулирует В-клеточную пролиферацию и BCR-опосредованную сигнальную трансдукцию [Rossi B. et al., 2006; Yu X. et al., 2006; Elantak L. et al., 2012]. Этот эффект был подтвержден в исследовании на $Lgals1^{-/-}$ мышах, в котором наблюдалась задержка В-клеточного развития на стадии пре-ВII [Espeli M. et al., 2009].

Активационные сигналы, действующие на В-лимфоциты на периферии, вызывают увеличение продукции галектина-1 [Zúñiga E. et al., 2001]. Далее данный лектин способствует дифференцировке активированных В-клеток в антител-секретирующие плазматические клетки [Tsai C.M. et al., 2008]. Недавно было показано, что усиленная экспрессия галектина-1 может способствовать гибели В-клеток памяти [Tabrizi S.J. et al., 2009], таким образом, подтвердив роль галектина-1 в поддержании фенотипа плазматических клеток. Вероятно, существует и механизм обратной регуляции продукции галектина-1. X. Yu et al. [2006] обнаружили, что связывание данного лектина со специфическим В-клеточным транскрипционным коактиватором ОСА-В приводит к снижению его секреции [Yu X. et al., 2006].

На основании описанного выше влияния галектина-1 на гранулоциты, лимфоциты, клетки моноцитарного происхождения, было сделано предположение о противовоспалительном значении галектина-1 [Dhirapong A. et al., 2009].

1.3.3 Роль галектина-1 в патогенезе и терапии иммуноопосредованных заболеваний

Описанное выше влияние галектина-1 на клетки иммунной системы обуславливает его важную роль в патогенезе и терапии при иммуноопосредованных заболеваниях. Интересными являются данные, полученные *in vivo* в результате оценки действия галектинов на течение таких экспериментально моделируемых патологических процессов, как острое воспаление, аутоиммунные и аллергические заболевания.

Предполагается, что галектин-1 обладает в основном противовоспалительным действием. Так, G.A. Rabinovich et al. [2000] описали противовоспалительные свойства галектина-1, характеризующиеся уменьшением отека, индуцированного фосфолипазой A2 пчелиного яда, при предварительной или одновременной инъекции галектина-1. Интересно, что лактоза не блокировала данный эффект лектина, а добавление антител - снижало его противовоспалительную активность, на основании чего авторы сделали предположение о наличии у галектина-1 CRD-независимого механизма действия. Не выявив снижения гистамин-индуцированного отека при действии галектина-1, исследователи предположили, что галектин-1 оказывает свое действие на уровне арахидоновой кислоты. При оценке гистологических срезов были обнаружены уменьшение нейтрофильной инфильтрации в периваскулярном и интерстициальном пространстве, а также ослабление дегрануляции тучных клеток при действии галектина-1. Кроме того, галектин-1 предотвращал повреждение мышечных волокон воспалительным инфильтратом, возникающим при введении фосфолипазы A2 [Rabinovich G.A. et al., 2000].

Другие исследователи обнаружили угнетение $IL1\beta$ -индуцированного привлечения нейтрофилов в перитонеальную полость мышей после введения галектина-1 [Cooper D. et al., 2008]. P. Barrionuevo et al. [2007] показали, что перитонеальные макрофаги мышей с дефектом галектина-1 ($Lgals1^{-/-}$) обладают

повышенной активностью в ответ на воспалительный стимул, что проявляется более высокой экспрессией МНС II, способностью к стимуляции аллогенных спленоцитов и к фагоцитозу опсонизированных эритроцитов барана. При этом добавление рекомбинантного галектина-1 снижает уровень экспрессии МНС II и способность к аллостимуляции до нормы, не меняя фагоцитарной активности [Barrionuevo P. et al., 2007]. Эти работы подтверждают значимую роль галектина-1 в подавлении острого воспаления путем регуляции миграции и экстравазации нейтрофилов и макрофагов.

На различных экспериментальных моделях показана способность галектина-1 подавлять аутоиммунную реакцию. Так, генная или белковая доставка данного лектина снижает клинические и гистопатологические признаки воспаления при экспериментальной аутоиммунной миастении Гравис, экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите (ЕАЕ), коллаген-индуцированном артрите, конканавалин А-индуцированном гепатите, воспалительном заболевании кишечника, болезни «трансплантат против хозяина», экспериментальном аутоиммунном увеите, а также экспериментальном и спонтанном диабете [Levi G. et al., 1983; Offner H. et al., 1990; Santucci L. et al., 2000; Baum L.G. et al., 2003; Santucci L. et al., 2003; Perone M.J. et al., 2006; Toscano M.A. et al., 2006; Perone M.J. et al., 2009; Wang A.L. et al., 2010; Starossom S.C. et al., 2012]. В связи с этим галектин-1 рассматривается в качестве возможного агента для разработки новых методов терапии аутоиммунных заболеваний. При этом особый интерес, на наш взгляд, представляет вопрос о действии галектина-1 на CD4⁺-Т-лимфоциты в условиях *in vivo*.

М.А. Toscano et al. [2006] описали эффекты галектина-1 в отношении регуляторных Т-клеток при экспериментальном увеите. Ими было отмечено улучшение течения болезни на поздних сроках воспаления сетчатки при использовании рекомбинантного галектина-1, связанное с активацией Treg-опосредованного противовоспалительного ответа. Кроме того, у сингенных реципиентов прекращалось развитие увеита в результате переноса IL-10-

продуцирующих CD4⁺T-клеток, полученных у мышей после введения галектина-1. Так как перенесенные клетки не проявляли значительной экспрессии транскрипционного фактора FoxP3, авторы сделали вывод, что действие галектина-1 *in vivo* способствует экспансии регуляторных T-клеток 1 типа (Tr1 продуцируют IL-10, но не экспрессируют FoxP3) [Toscano M.A. et al., 2006]. Позднее авторы установили, что у *Lgals1*^{-/-} мышей развивался более интенсивный антиген-специфичный Th1-и Th17-иммунный ответ и более тяжелое аутоиммунное воспаление, чем у мышей дикого типа, что соответствует галектин-1-пермиссивному гликофенотипу Th1-и Th17-клеток [Toscano M.A. et al., 2007]. Другие исследователи в экспериментах на мышах NOD (non-obese diabetic) выявили, что инъекция растворимого галектина-1 может подавлять Th1- и Th17-опосредованные ответы, при этом у животных отмечалось замедление начала гипергликемии и снижение анти-β-клеточной аутоиммунной реакции [Perone M.J. et al., 2009]. Кроме того, L.V. Norling et al. [2008] установили у мышей с нокаутом гена галектина-1 значительное увеличение миграции T-клеток в лимфоидные органы брыжейки и воспаленную ткань по сравнению с мышами дикого типа [Norling L.V. et al., 2008].

В связи с этим галектин-1 может рассматриваться как перспективный иммуносупрессорный агент для восстановления гомеостаза иммунокомпетентных клеток при аутоиммунном и воспалительном процессе.

Взаимодействие иммунной системы матери и плода определяет течение фактически всех этапов беременности от зачатия до родов. В связи с этим большой интерес представляет изучение роли галектина-1 в формировании иммунологической привилегированности фетального пространства.

Так, у мышей при патологии беременности было описано значительное снижение экспрессии галектина-1, а для *Lgals1*^{-/-} мышей была характерна более высокая частота выкидышей после аллогенного оплодотворения. Введение рекомбинантного галектина-1 предотвращало прерывание беременности и восстанавливало толерантность через механизмы, включающие индукцию

толерогенных дендритных клеток, которые, в свою очередь, обеспечивают экспансию IL-10-секретирующих регуляторных Т-клеток, а также нормализацию Th1/Th2 цитокинового баланса. При этом протективные эффекты галектина-1 у мышей с дефектом Treg-клеток или IL-10 не реализовывались [Blois S.M. et al., 2007].

H.D. Korsow et al. [2008], изучая роль галектина-1 во взаимодействии иммунокомпетентных клеток децидуальной ткани, получили следующие результаты. Галектин-1, продуцируемый децидуальными NK клетками и макрофагами, вызывал апоптоз активированных Т-клеток и клеток линии MOLT-4; при этом гибель клеток блокировалась анти-галектин-1-специфическими антителами и лактозой. Интересным является тот факт, что именно децидуальные, а не периферические Т-лимфоциты связывали галектин-1 и имели соответствующий гликофенотип, в том числе O-гликозилированный CD43, а также отличались экспрессией фермента C2GnT, ответственного за ветвление O-гликанов [Korsow H.D. et al., 2008].

В связи с иммуносупрессорной функцией галектина-1 предполагается, что данный лектин является важным фактором ухода опухолевых клеток из-под иммунного надзора. Исследования N. Rubinstein [2004] выявили секрецию галектина-1 клетками меланомы, что способствовало их иммуносупрессорной активности посредством индукции апоптоза в опухолеспецифических цитотоксических Т-лимфоцитах и модуляции Th1/Th2 цитокинового баланса. Блокирование галектина-1 с помощью антисмысловых олигонуклеотидов в клетках меланомы стимулировало генерацию опухолеспецифического ответа Th1 типа в лимфоузлах, дренирующих опухоль, и приводило к появлению мышей, устойчивых к опухолевой трансформации [Rubinstein N. et al., 2004].

Повышенное содержание галектина-1 обнаружено также в клетках Штернберга, типичных для Ходжкинской лимфомы. В этом случае избыточная экспрессия, вероятно, связана с активацией AP-1-зависимого энхансера и приводит к секреции цитокинов Th2-типа, экспансии Treg-клеток и подавлению

Т-клеточного иммунитета, специфичного к вирусу Эпштейн-Барр [Gandhi M.K. et al., 2007; Juszczynski P. et al., 2007; Rodig S.J. et al., 2008].

В эксперименте с совместным культивированием клеток рака простаты, экспрессирующих галектин-1, и Т-лимфоцитов опухолевые клетки индуцировали апоптоз в эффекторных лимфоцитах, оставаясь при этом устойчивыми к цитотоксическому действию данного лектина за счет пониженного содержания core-2-О-гликанов [Valenzuela H.F. et al., 2007]. Кроме того действие галектина-1, экспрессируемого эндотелиальными клетками при опухоли простаты, ингибировало миграцию Т-лимфоцитов через эндотелий [He J., Baum L.G., 2006].

Недавно были проведены исследования роли галектина-1 в иммунологической резистентности рака легких. Было установлено повышение экспрессии галектина-1 в клеточной линии рака легкого, а также в сыворотке крови и в биоптатах, полученных у пациентов хирургическим путём. Данный лектин, продуцируемый раковыми клетками, способствовал развитию анергии дендритных клеток. CD11c⁺ дендритные клетки, инфильтрирующие опухоль, характеризовались значительным увеличением экспрессии IL-10, что ингибировалось добавлением лактозы. Повышение продукции IL-10 отмечалось также у мышей после трансплантации опухолевых клеток, но не регистрировалось после трансплантации аналогичных клеток с нокаутом галектина-1. Кроме того, у мышей было выявлено ослабление аллореактивного Т-клеточного ответа и увеличение количества CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ регуляторных клеток [Kuo P.L. et al., 2011].

Терапевтическое значение галектина-1, показанное на моделях аутоиммунного процесса *in vivo*, делает данный лектин перспективным агентом терапии аутоиммунных заболеваний. Кроме того ассоциация экспрессии галектина-1 с опухолевой прогрессией позволяет рассматривать галектин-1 в качестве мишени для разработки новых подходов в терапии онкологических заболеваний.

Заключение

Согласно данным литературы, галектин-1, секретируясь стромальными клетками тимуса, лимфоузлов, некоторыми иммунокомпетентными клетками, а также клетками ряда типов опухолей, обладает иммунорегуляторным действием. Предполагается, что влияние галектина-1 на клетки иммунной системы обуславливает угнетение клинических и гистопатологических признаков повреждения тканей при аутоиммунных процессах (в том числе экспериментальной аутоиммунной миастении Гравис, экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите, коллаген-индуцированном артрите, экспериментальном и спонтанном диабете и других). Иммуносупрессорные эффекты галектина-1 рассматриваются в качестве патогенетического фактора, способствующего уходу опухолевых клеток из-под иммунного надзора. В связи с этим с целью понимания роли галектина-1 в регуляции иммунного ответа и в патогенезе заболеваний, ассоциированных с дисрегуляцией иммунного ответа, интерес исследователей направлен на идентификацию клеток-мишеней и молекулярных механизмов иммунорегуляторного влияния галектина-1.

К настоящему времени описана способность галектина-1 угнетать миграционную активность и индуцировать апоптоз нейтрофилов, а также снижать продукцию медиаторов воспаления макрофагами и направлять их активацию по альтернативному пути. В отношении В-лимфоцитов представлены данные о том, что галектин-1 активирует пре-В-клетки, негативно регулирует В-клеточную пролиферацию и BCR-опосредованную сигнальную трансдукцию, а также способствует дифференцировке активированных В-клеток в плазматические клетки и гибели В-клеток памяти. Действие галектина-1 на Т-лимфоциты сопровождается негативной селекцией CD8⁺-лимфоцитов в тимусе, а также снижением пролиферации и апоптозом периферических CD8⁺-лимфоцитов на фоне угнетения продукции IL-2 (рисунок 3).

На основании фактических данных, представленных в научной литературе, в том числе установленные на экспериментальных моделях *in vivo* изменения продукции Th1 и Th2 цитокинов, а также экспрессии гликопротеинов клеточной поверхности, распознаваемых галектином-1, можно сделать предположение, что CD4⁺-лимфоциты являются мишенями иммунорегуляторного действия галектина-1. Актуальность вопроса о роли галектина-1 в регуляции баланса CD4⁺-лимфоцитов обусловлена значением данных клеток в патогенезе аутоиммунных заболеваний. Так, избыточная активность Th1-, Th2-, Th17-лимфоцитов, а также недостаточность T-регуляторного звена являются факторами патогенеза ряда аутоиммунных и аллергических заболеваний. Вместе с тем предполагается, что иммуносупрессорная активность регуляторных T-лимфоцитов способствует опухолевой прогрессии. Следует отметить, что механизмы влияния галектина-1 на CD4⁺-лимфоциты на различных этапах иммунного ответа изучены недостаточно. Открытым остается вопрос идентификации изменения апоптоза и направления дифференцировки CD4⁺-лимфоцитов при действии галектина-1 в условиях активации клеток. Целесообразно также оценить и характер изменений функциональной активности отдельных субпопуляций CD4⁺-лимфоцитов при действии галектина-1 на дифференцированные клетки, особый интерес среди которых представляют регуляторные T-лимфоциты, ответственные за поддержание аутоотолерантности (рисунок 3).

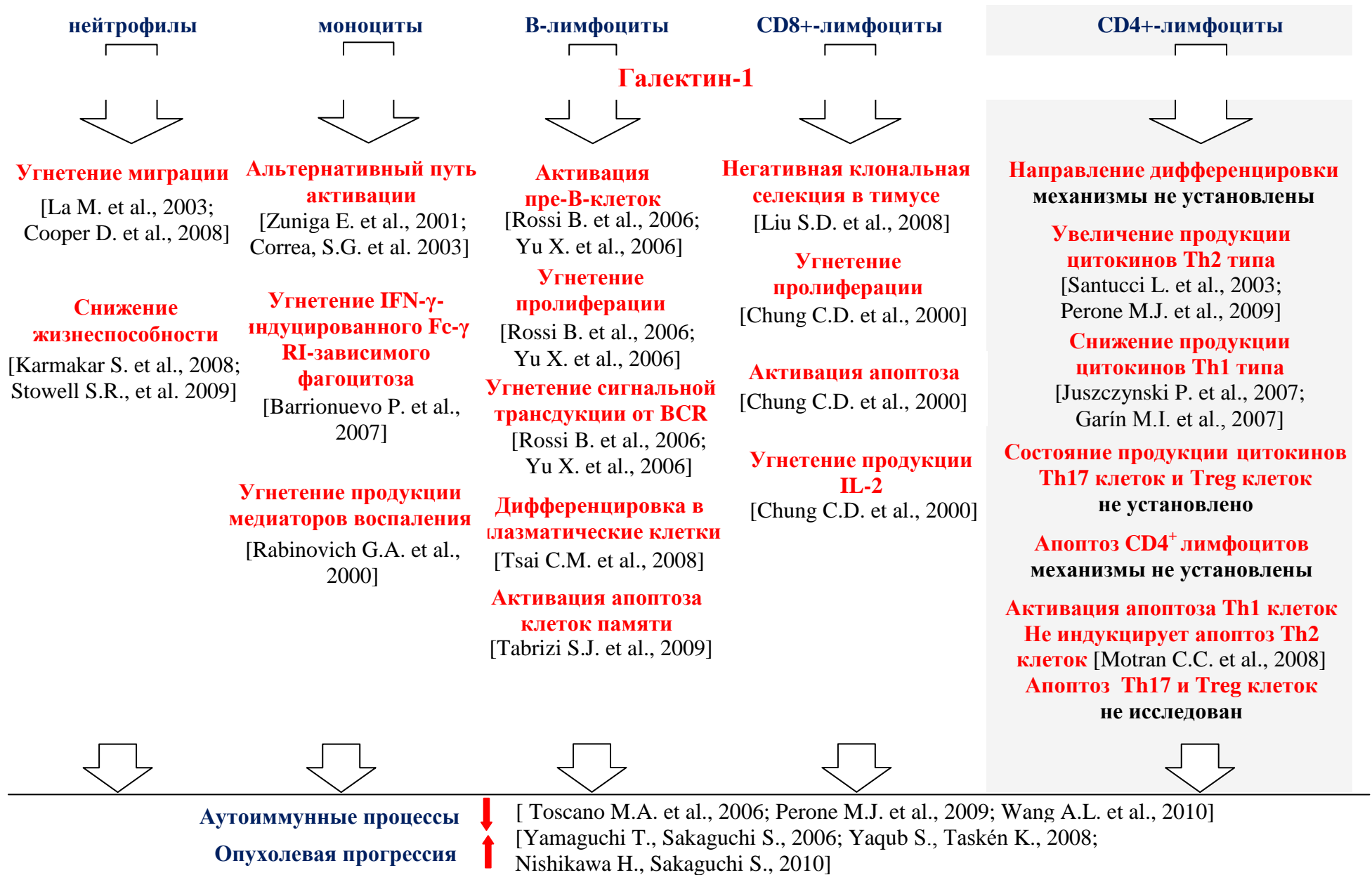


Рисунок 3. Механизмы иммунорегуляторной активности галектина-1, рассматриваемые в качестве основы терапевтических эффектов, выявленных на экспериментальных моделях аутоиммунных заболеваний, и опухолевой прогрессии

Глава 2. Материал и методы исследования

2.1 Материал исследования

В основу работы положены результаты комплексного обследования 65 человек (32 мужчин и 33 женщин, средний возраст 28 ± 5 лет). Из них – 55 относительно здоровых доноров и 10 пациентов с ревматоидным артритом (2 мужчины, 8 женщин). Критериями исключения из исследования явились: возраст – менее 18 или более 50 лет; наличие в анамнезе фактов злоупотребления алкоголем, наркотической зависимости, психических расстройств; обострение хронических соматических заболеваний, наличие инфекционных болезней, период проведения противовирусной, иммуномодулирующей, а также иной фармакотерапии. Группу здоровых доноров составили 55 практически здоровых добровольцев (30 мужчин и 25 женщин), не страдавших аутоиммунными, аллергическими и онкологическими заболеваниями и не предъявлявших на момент обследования жалоб соматического характера.

У всех обследованных лиц было получено добровольное информированное согласие на проведение необходимых манипуляций (протокол заседания этического комитета ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России от 20.12.2010 г., регистрационный № 1791).

Материалом исследования явились мононуклеарные лейкоциты, полученные из крови у здоровых доноров и у пациентов с ревматоидным артритом. Взятие крови производилось утром натощак путем пунктирования локтевой вены с последующей стабилизацией КЗ-ЭДТА.

Для достижения поставленной цели в настоящей работе были выполнены экспериментальный и клинический блоки исследования.

2.1.1 Характеристика экспериментального блока исследования

Экспериментальный блок исследования был выполнен на мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров, культивированных в условиях активации $CD4^+$ -лимфоцитов (модель 1) и дифференцировки в регуляторные Т-клетки (модель 2). Первая модель отражает процесс взаимодействия $CD4^+$ -лимфоцитов с антиген-презентирующими клетками (суть данной модели заключается в активации клеток через $CD3$ и $CD28$). Вторая модель представляет собой культивирование лимфоцитов в течение 6 сут в условиях активации и направленной дифференцировки клеток в регуляторные Т-лимфоциты.

На клетках модели активации $CD4^+$ -лимфоцитов было проведено исследование апоптоза и дифференцировки при действии галектина-1. Исследование апоптоза включало оценку количества апоптотически измененных $CD4^+$ -лимфоцитов, количества клеток с деполяризованной мембраной митохондрий, определение уровня антиапоптотического белка Bcl-2 и проапоптотического белка Bax. В качестве показателей направления дифференцировки $CD4^+$ -лимфоцитов были определены экспрессия мРНК транскрипционных факторов дифференцировки и продукция цитокинов $CD4^+$ -лимфоцитов.

Клетки, дифференцированные в регуляторные Т-лимфоциты, явились объектом исследования действия галектина-1 на фенотип регуляторных Т-лимфоцитов и их функциональную активность. Исследование фенотипа регуляторных Т-лимфоцитов включало оценку количества $CD4^+CD25^-$ FoxP3⁻/ $CD4^+CD25^+$ FoxP3⁻-лимфоцитов. Анализ функциональной активности дифференцированных регуляторных Т-лимфоцитов основывался на определении содержания транскрипционного фактора FoxP3 и эффекторной молекулы перфорины в цельноклеточных лизатах.

Экспериментальный блок исследований выполнен на базе Научно-образовательного центра молекулярной медицины ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (научный руководитель – д-р мед. наук, профессор Рязанцева Н.В.).

2.1.2 Характеристика клинического материала

В рамках выполнения клинического блока диссертационной работы была проведена оценка экспрессии мРНК галектина-1 в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров и у пациентов с ревматоидным артритом. В основу гипотезы о нарушении галектин-1-опосредованной регуляции баланса CD4⁺-лимфоцитов при ревматоидном артрите легли данные литературы о роли Th1- и Th17-лимфоцитов в патогенезе данного заболевания, а также сведения о терапевтическом эффекте галектина-1 в случае экспериментального коллаген-индуцированного артрита [Мазуров В.И., 2005; Nakae S. et al., 2003; Huang Y.J. et al., 2012; Cowden J.M. et al., 2013; Qu N. et al., 2013; Moon S.J. et al., 2013; Schlegel P.M. et al., 2013].

В связи с этим для решения сформулированных в диссертационной работе задач нами было проведено обследование 10 пациентов (2 мужчин и 8 женщин, средний возраст 32±4 года) с ревматоидным артритом. Обследованные пациенты находились на лечении в Областной клинической больнице Калининградской области (главный врач - К.И. Поляков). Постановка диагноза ревматоидного артрита была выполнена согласно приказу №21 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным ревматоидным артритом» от 13 января 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 уровня С-реактивного белка.

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

- активность болезни – ремиссия (DAS28 (визуальный калькулятор оценки активности заболевания при ревматоидном артрите) < 2,6);
- ревматоидный фактор – серопозитивный;
- антитела к циклическому цитрулин-содержащему пептиду – серопозитивный;
- продолжительность заболевания – не более года с момента постановки диагноза.

Критерием исключения пациентов из исследования явилось прохождение медикаментозной терапии на момент взятия крови.

Исследования, проведенные в рамках клинического блока диссертационной работы, были выполнены на базе лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий инновационного парка Балтийского федерального университета им. И. Канта (г. Калининград) (заведующая лабораторией – д-р мед. наук Л.С. Литвинова).

2.2 Методы исследования

2.2.1 Выделение мононуклеарных лейкоцитов крови

Кровь получали утром натощак из локтевой вены в вакуумные пробирки с КЗ-ЭДТА объемом 9 мл.

Мононуклеарные лейкоциты выделяли из цельной венозной крови методом градиентного центрифугирования [Натвиг Дж. и соавт., 1980]. Венозную кровь в соотношении 2:1 наслаивали на градиент плотности Ficoll-Paque ($\rho=1,077$ г/см³) («GE Healthcare», Швеция) и центрифугировали в течение 20 мин при 300g. Кольцо клеток, образованное на границе раздела

фаз, переносили в чистую центрифужную пробирку, трижды отмывали средой RPMI-1640, последовательно ресуспендируя и центрифугируя каждый раз в течение 10 мин при 300 g.

Жизнеспособность лимфоцитов определяли в счётной камере Горяева. Для этого 0,1 мл клеточной взвеси смешивали с равным объемом 0,5% раствора трипанового синего («Serva», США). Результаты оценивали по содержанию «мертвых» клеток, окрашенных в синий цвет, количество которых не превышало 5 – 7 % [Гольдберг Е.Д. и соавт., 1992]. Для подсчета количества клеток в 1 мл смешивали 7 мкл клеточной взвеси с 140 мкл 3% уксусной кислоты. Концентрацию клеток рассчитывали по формуле: $X = A \times K \times 10^4$ (клеток/мл), где А – количество клеток в 20-ти больших квадратах камеры; К – коэффициент разведения.

2.2.2 Культивирование моноклеарных клеток

Полученные методом градиентного центрифугирования моноклеарные лейкоциты стандартизировали до $2,0 \times 10^6$ /мл, культивировали в полной питательной среде RPMI-1640 (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск) при 5% CO₂, 37°C.

Время добавления рекомбинантного галектина-1 и его концентрация, а также продолжительность и дополнительные условия культивирования различались в зависимости от модели исследования (таблица 1).

2.2.2.1 Культивирование моноклеарных лейкоцитов для исследования влияния галектина-1 на CD4⁺-лимфоциты в процессе активации

С целью активации лимфоцитов в культуральную среду сразу после выделения клеток добавляли антитела к CD3 (1 мкг/мл) и CD28 (2 мкг/мл) (BD Pharmingen™, США).

Исследование апоптоза и дифференцировки CD4⁺-лимфоцитов было выполнено на клетках, культивируемых с добавлением рекомбинантной формы галектина-1 (RnDSystems, США) одновременно с активирующими антителами. Использованные концентрации галектина-1 представлены в таблице 1. Количество CD4⁺-лимфоцитов в состоянии апоптоза было исследовано при добавлении галектина-1 в диапазоне доз 0,1 – 4,0 мкг/мл. На основании результатов исследования содержания апоптотически измененных клеток для оценки влияния галектина-1 на дифференцировку были выбраны следующие дозы рекомбинантного галектина-1: 1,0 мкг/мл - максимальная, не вызывающая гибель клеток концентрация, и 2,0 мкг/мл - пограничная с минимальной проапоптотической дозой. Контрольную группу составили клетки, культивируемые в отсутствии рекомбинантного галектина-1.

Для исследования дифференцировки CD4⁺-лимфоцитов за 4 ч до окончания инкубации в культуры клеток добавляли стимуляторы синтеза цитокинов – ФМА (форболмиристилацетат) в дозе 50 нг/мл и кальция иономицин в дозе 1 мкг/мл.

Продолжительность культивирования клеток при исследовании апоптоза составила 18 ч, при исследовании дифференцировки клеток – 72 ч (таблица 1).

2.2.2.2 Культивирование мононуклеарных лейкоцитов для исследования влияния галектина-1 на CD4⁺-лимфоциты на модели дифференцированных клеток

С целью генерации субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов в культуральную среду одновременно с активирующими антителами добавляли рекомбинантные цитокины IL-2 и TGF-β1 (RnDSystems, США) (таблица 1). Подбор доз цитокинов был осуществлен в результате анализа

фенотипа регуляторных Т-лимфоцитов, клеточности и жизнеспособности культуры при добавлении используемых цитокинов в различных комбинациях концентраций. Для дальнейших исследований были выбраны дозы IL-2 – 10 нг/мл; TGF-β1 – 20 нг/мл.

Таблица 1

Условия культивирования мононуклеарных лейкоцитов

Условия культивирования				Оцениваемый показатель
Дополнительные компоненты среды	Время добавления галектина-1	Концентрация галектина-1, мкг/мл	Продолжительность культивирования	
Модель активации лимфоцитов				
Антитела к CD3 и CD28	Сразу после выделения	0,1-4,0	18 ч	Количество апоптотически измененных CD4 ⁺ -лимфоцитов
		2,5-4,0		Деполяризация митохондриальной мембраны
		3,5		Изменение содержания белков семейства Bcl-2
Антитела к CD3 и CD28, ФМА, иономицин	Сразу после выделения	0,1; 2,0	72 ч	Уровень экспрессии мРНК транскрипционных факторов
				Продукция цитокинов
Модель дифференцировки в регуляторные Т-лимфоциты				
Антитела к CD3 и CD28, IL-2, TGFβ1	Сразу после выделения	0,5; 1,0	6 сут	Фенотип регуляторных Т-лимфоцитов
	Через 72 часа			Фенотип регуляторных Т-лимфоцитов
		1,0		Внутриклеточное содержание FoxP3 и перфорина

Рекомбинантную форму галектина-1 (0,5 и 1,0 мкг/мл) добавляли одновременно с активирующими антителами и цитокинами – схема 1, или через 72 ч от начала культивирования – схема 2 (таблица 1). Содержание

FoxP3 и перфорина анализировали в клетках, культивированных с добавлением галектина-1 через 72 ч от начала культивирования (схема 2). Общая продолжительность культивирования клеток составила 6 сут. Контрольную группу составили клетки, культивированные в отсутствие рекомбинантных цитокинов и галектина-1.

2.2.3 Оценка количества апоптотически измененных CD4⁺-лимфоцитов

Через 18 ч экспозиции клеток с рекомбинантным галектином-1 оценивали количество CD4⁺-лимфоцитов в состоянии апоптоза. Признаки апоптоза идентифицировали методом проточной цитофлуориметрии по связыванию лимфоцитами, окрашенными FITC-мечеными антителами к CD4, аннексина-V, меченного фикоэритрином (PE), и витального красителя 7-аминоактиномицина D (7AAD).

Клетки дважды отмывали от культуральной среды фосфатно-солевым буфером, содержащим 2% эмбриональной телячьей сыворотки. 50 мкл клеток в количестве 1×10^5 /мл переносили в пробирки для проточного цитометра, добавляли 5 мкл антител к CD4 (ООО «Сорбент»), конъюгированных с FITC (флуоресцеин изотиоцианат), инкубировали 30 мин в темноте при +4 °С. Отмывали клетки в холодном фосфатно-солевом буфере и ресуспендировали в 100 мкл $1 \times \text{Ca}^{2+}$ -связывающего буфера (eBioscience, США). Затем добавляли 5 мкл аннексин-V-PE и 5 мкл 7-AAD (eBioscience, США) согласно протоколу производителя. Осторожно перемешивали и инкубировали в течение 15 мин при 25°C в темноте. Добавляли по 400 мкл $1 \times \text{Ca}^{2+}$ -связывающего буфера в каждую пробирку и проводили анализ на проточном цитофлуориметре FACSCanto™ II (BD, США) с использованием программного обеспечения FACSDiva Version 6.1.3.

Гейт лимфоцитов выделяли на основе малого углового светорассеяния (FSC), характеризующего размер клетки, и бокового светорассеяния (SSC), характеризующего гранулярность клеток [Хайдуков С. В., 2007] (рисунок 4А). В гейте лимфоцитов определяли популяцию $CD4^+$ -клеток по каналу флюоресценции FITC (рисунок 4Б). Затем оценивали распределение $CD4^+$ -лимфоцитов по каналам PE и PerCP-Cy5.5 (позволяет детектировать 7AAD) (рисунок 4В). При этом $CD4^+$ Анексин⁻7AAD⁻ лимфоциты (Q3) считали жизнеспособными, $CD4^+$ Анексин⁺7AAD⁻ (Q4) – в состоянии раннего апоптоза, $CD4^+$ Анексин⁺7AAD⁺ (Q2) – в состоянии позднего апоптоза, $CD4^+$ Анексин⁻7AAD⁺ (Q1) – в состоянии некроза.

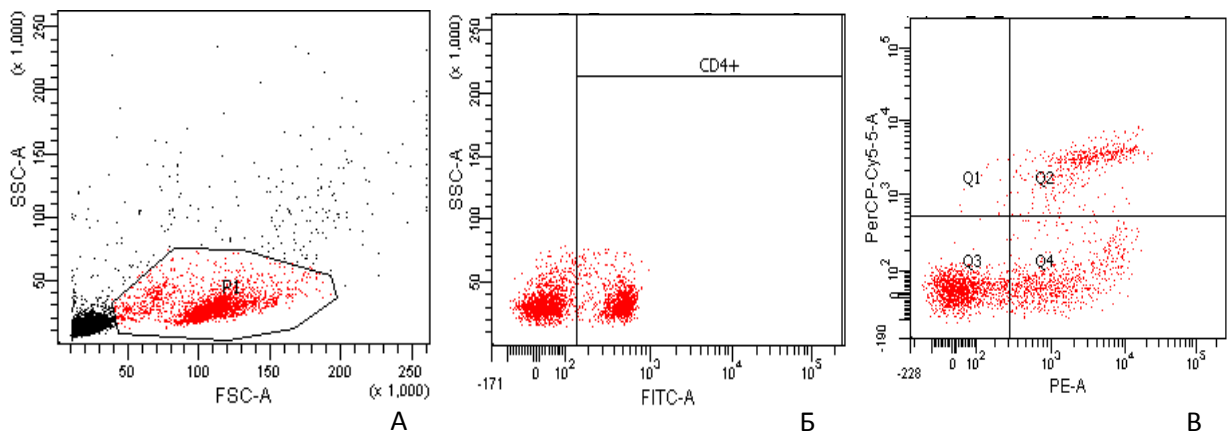


Рисунок 4. Анализ апоптоза $CD4^+$ -лимфоцитов на проточном цитофлюориметре FACSCanto™ II (BD, США): А – выделение гейта лимфоцитов крови; Б – определение $CD4^+$ -лимфоцитов в режиме Dot Plot; В – определение относительного количества $CD4^+$ -лимфоцитов: жизнеспособных (Q3), на ранней стадии апоптоза (Q4), на поздней стадии апоптоза (Q2), в состоянии некроза (Q1)

2.2.4 Исследование деполяризации митохондриальной мембраны в лимфоцитах крови

Изменения трансмембранного потенциала митохондрий исследовали методом проточной цитометрии с помощью митохондриального зонда JC-1 (5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолкарбоцианин йодид). Катионный краситель JC-1 спонтанно диффундирует через плазматическую

мембрану клетки и накапливается преимущественно в эффективно функционирующих митохондриях, где образует агрегаты, характеризующиеся красным спектром флуоресценции ($\lambda=590$ нм). В случае нарушения функции митохондрий JC-1 не накапливается в митохондриях и остается в цитоплазме в виде мономеров с зеленым спектром флуоресценции ($\lambda=525$ нм) [Кудрявцев И.В. и др., 2012; Cottet-Rousselle C. et al., 2011; Perry S.W. et al., 2011].

После 18 ч инкубации клеток с рекомбинантным галектином-1 в чистую полистероловую пробирку переносили 1 мл клеточной суспензии, содержащей $1 \cdot 10^6$ кл/мл, и центрифугировали при 400g в течение 5 мин при комнатной температуре. К клеточному осадку добавляли 0,5 мл свежеприготовленного (согласно инструкции производителя) раствора JC-1 (DePsipher™ Kit, Trevigen Inc., США). Клетки ресуспендировали и инкубировали в течение 10-15 мин при 37⁰С в CO₂-инкубаторе. Затем клетки дважды отмывали буфером. Полученный осадок ресуспендировали в 0,5 мл отмывочного буфера. Полученные образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCanto™ II (BD, США) с использованием программного обеспечения FACSDiva (Version 6.1.3).

Гейт лимфоцитов выделяли на основе малого углового светорассеяния (FSC), характеризующего размер клетки, и бокового светорассеяния (SSC) (рисунок 5А). Затем оценивали распределение лимфоцитов по каналам флуоресценции FL1 (JC-1 момеры) и FL2 (JC-1 агрегаты) (рисунок 5Б).

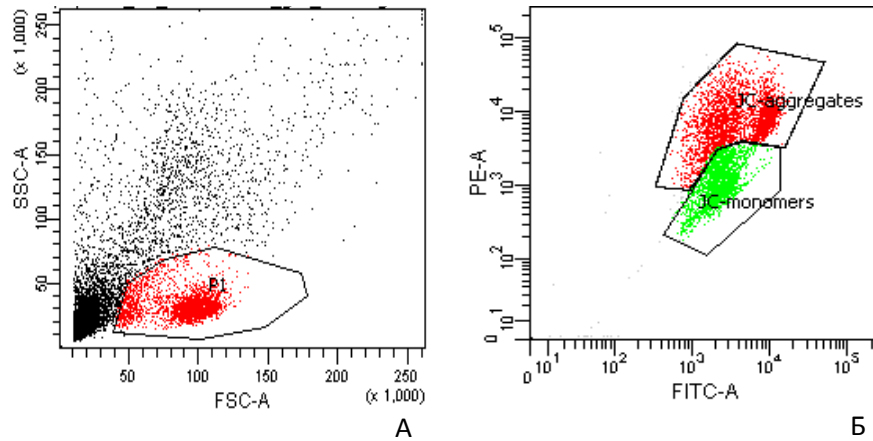


Рисунок 5. Оценка снижения трансмембранного потенциала митохондрий на проточном цитофлуориметре FACSCanto™ II (BD, США): А – выделение гейта лимфоцитов крови; Б – определение % лимфоцитов с поляризованной митохондриальной мембраной (JC-агрегаты) и деполяризованной (JC-мономеры)

2.2.5 Определение содержания белков Vcl-2, Вах, FoxP3, перфорина в мононуклеарных лейкоцитах

Содержание белков Vcl-2, Вах, FoxP3 и перфорина определяли методом вестерн-блоттинга в клеточных лизатах мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров через 18 ч культивирования.

Для приготовления лизатов клетки в количестве 1×10^6 /мл помещали в пробирки типа «эппендорф» и отмывали фосфатно-солевым буфером (PBS), центрифугируя 5 мин при 500 g при $+4^\circ\text{C}$. Удалив надосадочную жидкость, вносили 160 мкл лизирующего буфера, температура которого составляла 4°C , и 5 мкл смеси протеиназных ингибиторов («AMRESCO», США). Состав лизирующего буфера: 50 mM Трис-HCl (pH = 6,5), 100 mM дитиотреитол («Helicon», США), 0,1% бромфеноловый синий («Helicon», США), 2% додецилсульфата натрия (SDS), 15% глицерол («Helicon», США). Образцы тщательно перемешивали с помощью вортекса и инкубировали в течение 30 мин на льду, перемешивая каждые 10 мин. Затем для полного лизиса клетки инкубировали в термостате при 95°C в течение 10 мин. Остывшие до комнатной температуры образцы центрифугировали в течение

10 мин при 3000 g при 8°C с использованием центрифуги с функцией охлаждения Hermle Z383 K (Германия), собирали супернатант и хранили при -70°C до проведения вестерн-блоттинга.

Электрофорез белков проводили в 5%-ном концентрирующем полиакриламидном геле (0,13М Tris-HCl, pH=6,8) и 10%-ном разделяющем полиакриламидном геле (375ММ Tris-HCl, pH=8,8), содержащем 0,1% Sodium dodecyl sulfate (SDS), 0,08% TEMED (tetramethylethylenediamine) («Helikon», США), 0,1% персульфат аммония («Biorad», США). Объем вносимых клеточных лизатов составил 15 мкл, также вносили белковый маркер молекулярного веса (14,3-220,0 кДа, «Fermentas», США). Электрофорез проводили в TGB, pH=8,3 (25М Tris, 250 мМ глицин, 0,1% SDS). Стадия префореза проходила в течение 15 мин при 120 В, стадия фореза – в течение 50 мин при 160 В. Далее осуществляли перенос разделенных в геле белков на нитроцеллюлозную мембрану («Biorad», США) в трансфер-буфере pH=8,3 (25ММ Tris, 192ММ глицин, 20% метанол) в течение 90 мин при 60 мА.

Мембрану с перенесенными белками дважды отмывали в течение 5 мин в TTBS pH=7,5 (0,05% Tween -20, 0,5М NaCl, 20ММ Tris-HCl, pH=7,5) и затем блокировали 1% раствором желатина, разведенном в TTBS, в течение 20 мин. После этого мембрану трижды отмывали и 60 мин инкубировали при комнатной температуре с первичными моноклональными антителами к искомому белку (Bcl-2, Bax, FoxP3, перфорин) («RnDSystems», США). После трех отмывок в TTBS на мембрану наносили вторичные антитела с пероксидазной меткой («RnDSystems», США) и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. По истечении инкубации мембрану трижды отмывали и производили детекцию разделенных белков путем добавления хемилюминесцентного субстрата («Invitrogen», США).

Полученные блоты сканировали, изображение обрабатывали, используя программное обеспечение TotalLab. Вывод о содержании

исследуемого белка в клетке делали по изменению отношения величины сигнала метки искомого белка к величине сигнала с фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH). Результаты выражали в условных единицах.

2.2.6 Оценка уровня экспрессии транскрипционных факторов дифференцировки CD4⁺-лимфоцитов

Выделение РНК из мононуклеарных лейкоцитов осуществляли сорбентно-колоночным методом (RNeasy Plus Mini Kit, QIAGEN, Германия). Метод основан на связывающем свойстве мембран на силико-гелевой основе и микроспиновой технологии.

Для этого 500 мкл суспензии клеток ($2,0 \cdot 10^6$ на 1 мл) осаждали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 5 мин. Супернатант удаляли, добавляли к клеточному осадку 350 мкл лизирующего буфера RLT, содержащего 10 мкл 14,5 М β -меркаптоэтанола на 1 мл буфера, тщательно перемешивали пипетированием до полного удаления конгломератов клеток. Затем лизат центрифугировали 30 сек при 10 000 об/мин на «gDNA Eliminator spin» колонках. Далее вынимали колонку и добавляли 350 мкл 70% этанола для улучшения связывания, тщательно перемешивали пипетированием. Затем 700 мкл образца переносили в «RNeasy spin» колонки и центрифугировали 15 сек при 10 000 об/мин, после чего из пробирки удаляли раствор, прошедший колонку, а на колонку наслаивали 700 мкл RW1 буфера, закрывали крышкой и центрифугировали в течение 15 сек при 10 000 об/мин. Затем дважды выливали раствор, прошедший колонку, и наслаивали на колонку 500 мкл RPE буфера, центрифугировали 15 сек при 10 000 об/мин. Для элюирования РНК колонку переносили в новую пробирку и наслаивали на мембрану 50 мкл RNase-free воду, центрифугировали 1 мин при 10 000 об/мин. Оценку качества выделенного

препарата РНК проводили по итогам электрофоретического разделения в 1,2% агарозном геле и буфере ТАЕ (40 мМ Трис-уксусная кислота, 1мМ ЭДТА (рН=8,0)). Чистота всех тестируемых образцов тотальной РНК оценивалась по наличию в агарозном геле-электрофореze двух бандов, соответствующих 18S и 28S субъединицам рРНК.

Следующим шагом синтезировали ДНК на матрице мРНК при участии обратной транскриптазы. Для этого готовили реакцию смесь: 9 мкл (0,5-2 мкг) РНК, 1 мкл (100 нг) статистического праймера (N₉) (праймера, подобранного к среднестатистической последовательности ДНК), 10 мкл RT-буфера (20 мМ Tris-HCl (рН=8,3), 5 мМ MgCl₂, 10 мМ DTT, 100 мМ KCl, 0,4 мМ dNTP), 200 ед. акт. ДНК-зависимой РНК полимеразы (MMuLV-RT) («Promega», США). Реакцию обратной транскрипции проводили в течение 60 мин при t=42°C.

Полученный фрагмент ДНК амплифицировали методом PCR в режиме реального времени с использованием SYBR Green I («Molecular Probe», США) на амплификаторе Mini Opticon («Bio-Rad», США).

PCR проводили в объеме 25 мкл, реакция смесь содержала K25 буфер (x1), 0,2mM dNTP, 300 nM праймеров, 0,5 ед. акт. SmartTaq ДНК-полимеразы, блокированной антителами (Диалат, Россия), SYBRGreen I [1:25000] и 0,1-5 нг кДНК.

Протокол амплификации:

- первичная денатурация – 3 мин при 96°C;
- амплификационный цикл (x 40): денатурация – 10 сек при 96°C, отжиг праймеров – 7 сек при 60°C, элонгация – 7 сек при 72°C, съем сигнала – 10 сек при температуре плавления продукта амплификации (определялась индивидуально для каждой пары праймеров, при анализе кривой плавления);

- построение кривой плавления – нагревание амплификационной смеси с 75 до 95°C, с шагом 0,5°C, сопровождающиеся съемом флуоресцентного сигнала на каждом шаге в течение 10 сек.

Праймеры, позволяющие специфично амплифицировать фрагменты кДНК генов транскрипционных факторов, представлены в таблице 2.

Для каждой пары праймеров были подобраны оптимальные режимы амплификации. Для этого варьировали температуру отжига праймеров, состав амплификационного буфера, а также параметры амплификационного цикла. Оптимизацию условий PCR проводили при амплификации пяти последовательных 2-х кратных разведений кДНК, каждая точка была представлена в двойном повторе. Качество реакции амплификации считалось приемлемым при выполнении следующих условий:

- разница между значениями Ct (номер цикла в точке пересечения кинетической кривой порогового уровня) превышала 0,5 цикла;
- индекс корреляции между расчетными значениями количества кДНК в пяти точках (пять последовательных 2-х кратных разведений) и экспериментальными значениями превышал 0,95 ($r^2 > 95$);
- эффективность реакции амплификации была более 90% ($E > 90\%$);
- специфичность реакции амплификации (подтверждалась по отсутствию дополнительных пиков на кривой плавления).

Температуру плавления праймеров (T_m), определяющую температуру отжига олигонуклеотидов на матрице, выявляли эмпирически при проведении PCR в режиме, позволяющем задавать градиент температур в пределах блока амплификатора. Температуру плавления продукта амплификации, определяющую температуру съема флуоресцентного сигнала, вычисляли при анализе кривой плавления.

Для нормализации начального количества мРНК в образце и эффективности обратной транскрипции измерялось количество кДНК гена

β -актина – гена «домашнего хозяйства», в относительно равной степени экспрессирующегося во всех клетках.

Аmplификация каждой серии образцов сопровождалась постановкой контроля (пять точек в двойных повторах, каждая последующая точка представляла собой 2-х кратное разведение предыдущей).

Таблица 2

Праймеры, использованные для специфичной амплификации фрагментов кДНК генов транскрипционных факторов и β -актина

Название гена транскрипционного фактора	Последовательность нуклеотидов в прямом (F) и обратном (R) праймерах
FOXP3	F: CTGGCAAATGGTGTCTG R: GTGCCCTGCCCTTCTCAT
RORC	F: TGGTGCTGGTTAGGATGTG R: GGAGTGGGAGAAGTCAAAGATG
TBX21	F: CCAACACGCATATCTTTACTTTCC R: ACTCAAAGTTCTCCCGGAATC
GATA-3	F: GCGGGCTCTATCACAAAATG R: TCCCCATTGGCATTCCCTC
β -актин	F: CATTTCCGAAGCGAGTGTCT R: GAGCGATTCCGGACTACCTT

Относительное количество кДНК в образце рассчитывали по калибровочной кривой.

Результаты выражали в условных единицах: отношение числа порогового цикла амплификации исследуемого гена к пороговому циклу амплификации гена «домашнего хозяйства». Для удобства представления результатов полученную величину умножали на 100.

2.2.7 Оценка содержания цитокинов в культуральных средах мононуклеарных лейкоцитов

Определение содержания интерферона (IFN) γ и интерлейкинов (IL)-13, IL-10, IL-17A в культуральных супернатантах мононуклеарных клеток,

активированных антителами к CD3 и CD28, ФМА и иономицином, осуществляли методом твердофазного иммуноферментного анализа типа «сэндвич» согласно протоколам фирмы-производителя («RnDSystems», США).

После удаления избытка вторичных антител добавляли стрептавидин-пероксидазу, которая связывается с биотилированными антителами с формированием сэндвич-комплекса из 4-х реагентов. После второй инкубации и промывки удаляли несвязавшийся фермент, после чего добавляли субстратный раствор, который взаимодействует с ферментом с образованием цветного комплекса. Оптическая плотность раствора пропорциональна концентрации определяемого вещества и регистрируется колориметрически. Оптическую плотность регистрировали на микропланшетном фотометре Multiskan EX (Финляндия) при длине волны 450 нм. Концентрацию цитокинов вычисляли по калибровочной кривой. Калибровочная кривая строилась с использованием стандартных растворов цитокинов с известной концентрацией.

Результаты выражали в пг/мл. В случае получения значений, превышающих диапазон линейности набора, производилось 5-ти кратное разведение образцов и повторное проведение анализа с умножением результата на фактор разведения.

2.2.8 Оценка содержания лимфоцитов с фенотипом Т-регуляторных клеток

Содержание Т-reg-лимфоцитов определяли по связыванию антител к транскрипционному фактору FoxP3 человека, меченных PE, к CD25, меченных аллофикоцианином (APC), а также к CD4, меченных FITC (BD Pharmingen, США) [Быковская С.Н. и соавт., 2013]. В работе использовался набор буферов Human FoxP3 Buffer Set (BD Pharmingen, США).

Клетки, культивированные в течение 6 сут, разводили в Stain Buffer до 1×10^6 клеток/мл. Stain Buffer используется для иммунофлуоресцентного окрашивания клеточной суспензии, состоит из рН-нейтрального (рН 7.4) солевого раствора (фосфатный буфер Дульбекко), эмбриональной телячьей сыворотки и азиды натрия (NaN_3).

На дно стеклянной пробирки вносили 5 мкл APC-меченных антител к CD25 и 20 мкл FITC-меченных антител к CD4. К антителам добавляли 100 мкл клеток, перемешивали на вортексе и инкубировали 20 мин в темноте. Затем клетки отмывали в 2 мл Stain Buffer, центрифугируя 10 мин при 250g.

Для фиксации аккуратно ресуспендировали осадок в оставшемся объеме отмывочного буфера и добавляли 2 мл 1x Human FoxP3 Buffer A, тщательно перемешивали и инкубировали 10 мин при комнатной температуре в темноте. Фиксированные клетки центрифугировали 5 мин при 500g, удаляли фиксирующий раствор и отмывали, ресуспендируя в 2 мл Stain Buffer и центрифугируя в течение 5 мин при 500g, отмывочный буфер удаляли.

Полученный осадок аккуратно ресуспендировали в оставшемся объеме отмывочного буфера и добавляли 0,5 мл 1x рабочего раствора Human FoxP3 Buffer C, тщательно перемешивали, инкубировали 30 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте. Пермеабелизированные клетки отмыли дважды в 2 мл Stain Buffer и центрифугировали 5 мин при 500g.

После удаления буфера к клеткам добавляли конъюгированные антитела к FoxP3 из расчета 100 мкл на 1×10^6 клеток и тщательно перемешивали. Инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темноте. После окрашивания клетки дважды отмыли в 2 мл Stain Buffer, центрифугируя 5 мин при 500g.

Все процедуры выполнялись при комнатной температуре.

Клетки ресуспендировали в отмывочном буфере и анализировали на проточном цитометре FACSCanto™ II (BD, США). Оценивали количество CD4⁺-клеток и, далее, в этой популяции определяли процент Т-клеток с фенотипом CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻ и CD4⁺CD25⁻FoxP3⁻.

2.2.9 Оценка уровня экспрессии мРНК галектина-1 в мононуклеарных лейкоцитах

Процедуру выделения РНК проводили сорбентно-колоночным методом с помощью набора реактивов «Ахупrep multisource total RNA miniprep kit» (Eurogen) согласно протоколу производителя.

Выделенные на градиенте плотности клетки переносили в 1,5 мл пробирку в количестве 2×10^6 клеток, центрифугировали 5 мин на 2000 об/мин, удаляли супернатант. К осадку добавляли 200 мкл БУФЕР R-I (прогретый на 60 °С в течение 3 мин) и лизировали клетки посредством пипетирования (13-15 раз), избегали вспенивания. Затем добавляли 75 мкл БУФЕР R-II и перемешивали на вортексе 30 сек, центрифугировали в течение 5 мин при 12000 об/мин при комнатной температуре. Супернатант переносили в пробирку на 1,5 мл, добавляли 125 мкл изопропанола и перемешивали на вортексе. Полученный раствор переносили в колонку, помещенную в пробирку на 2 мл, и центрифугировали 1 мин при 6000 об/мин при температуре 4 °С. Осадок удаляли из 2 мл пробирки и снова помещали туда колонку, добавляли в колонку 500 мкл БУФЕР W1A и центрифугировали в течение 1 мин в условиях 12000 об/мин, 4 °С. Осадок удаляли и снова помещали туда колонку, добавляли в неё 700 мкл БУФЕР W2 и центрифугировали в течение 1 мин при 12 000 об/мин при температуре 4°С, повторяя эту процедуру дважды. Осадок удаляли и снова помещали колонку в пробирку, центрифугировали в течение 1 мин при 12000 об/мин при температуре 4°С, после чего переносили её в чистую 1,5 мл пробирку,

добавляли в центр мембраны колонки 50 мкл БУФЕР ТЕ, прогретый до 60°C в течение 3 мин. Далее проводилась инкубация в течение 15 мин при комнатной температуре с последующим центрифугированием в условиях 12000 об/мин, 4°C в течение 1 мин и добавлением следующих 50 мкл буфера ТЕ (в центр мембраны колонки). Инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре, центрифугировали 1 мин в условиях 12000 об/мин, 4°C. На дне пробирки получали 100 мкл РНК, которую переводили в кДНК в реакции с обратной транскриптазой.

Для синтеза ДНК на матрице РНК готовили реакционную смесь: 9 мкл (0,5-2 мкг) РНК, 1 мкл (100 нг) статистического праймера (N₉), 10 мкл RT-буфера, 200 ед. акт. ДНК-зависимой РНК полимеразы. Реакцию обратной транскрипции осуществляли в течение 60 мин при t=42⁰C.

Полимеразную цепную реакцию проводили для гена галектина-1 (в качестве нормировочного гена был выбран ген β2-микроактин). В работе была использована смесь 5xqPCRmix-HS SYBR (Eurogen), в состав которой входят следующие компоненты: Taq ДНК полимеразы со специфическими моноклональными антителами (HS Taq ДНК полимеразы), краситель SYBR Green I, смесь нуклеотидтрифосфатов, Mg²⁺, реакционный буфер. Для проведения амплификации готовили реакционные смеси из расчета 25 мкл на пробу, содержащие qPCRmix-HS SYBR (Eurogen), доведенную до 1x концентрации деионизованной водой и 2 мкл праймера к гену галектину-1 (F: AACCTGGAGAGTGCCTTCGA; R: GTATTGATGGCCTCCAGG T) либо β2-микроактина. В каждую пробу к реакционной смеси добавляли 2 мкл кДНК и переносили в амплификатор.

Устанавливали следующий режим амплификации:

- удерживание температуры 1: 95°C – 3 мин;
- новое циклирование: 95°C – 15 сек; 62 °C – 15 сек; 72°C – 30 сек;
- удерживание температуры 2: 72°C – 3 мин;
- количество циклов – 30

Уровень экспрессии галектина-1 в мононуклеарных лейкоцитах здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом вычисляли по формуле $dCt=2^{(Ct \text{ искомого гена} - Ct \text{ нормировочного гена})}$.

2.2.10 Статистический анализ результатов исследования

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы SPSS 16.0.

Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Шапиро-Вилка.

Для показателей клеточности культуры и жизнеспособность клеток при добавлении рекомбинантных цитокинов (IL-2 и TGF β 1) в различных дозах достоверность различий не оценивалась. Результаты исследования данных показателей, распределенные по нормальному закону, выражали в виде среднего (\bar{X}) \pm стандартное отклонение (m).

Для оценки достоверности различий зависимых выборок (содержание апоптотически измененных CD4⁺-лимфоцитов, изменения трансмембранного потенциала митохондрий лимфоцитов, содержание белков семейства Bcl-2 в лизатах мононуклеарных лейкоцитов, экспрессия мРНК транскрипционных факторов и продукция цитокинов CD4⁺-лимфоцитов, содержание клеток с фенотипом регуляторных Т-лимфоцитов, содержание FoxP3 и перфорина в лизатах мононуклеарных лейкоцитов) использовали непараметрический критерий Вилкоксона с учетом поправки Бонферрони. Для оценки достоверности различий независимых выборок (уровень экспрессии мРНК в мононуклеарных лейкоцитах здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом) использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Различие двух сравниваемых величин считали достоверным при уровне значимости $p < 0,05$. Результаты выражали в виде медианы (Me), первого ($Q1$) и третьего ($Q3$) квартилей.

Глава 3. Результаты собственных исследований

Материал и методы исследования позволили оценить влияние галектина-1 на CD4⁺-лимфоциты в процессе их активации (модель 1), а также на дифференцированные регуляторные Т-лимфоциты (модель 2). На первом этапе в условиях добавления галектина-1 к культуре мононуклеарных лейкоцитов здоровых доноров одновременно с активирующими антителами была определена закономерность апоптоз-индуцирующего влияния галектина-1 на CD4⁺-лимфоциты. Вторым этапом на модели активации лимфоцитов была проведена оценка реализации митохондриального пути апоптоза (деполяризация митохондриальной мембраны, содержание белков Bcl-2 и Bax) при действии галектина-1 в проапоптотических дозах. Для максимальной дозы галектина-1, неиндуцирующей апоптоз CD4⁺-лимфоцитов, была проведена оценка показателей, отражающих направленность дифференцировки CD4⁺-лимфоцитов: экспрессия транскрипционных факторов дифференцировки и уровень продукции цитокинов.

Следующим этапом на модели 2 было исследовано влияние галектина-1 на дифференцированные регуляторные Т-лимфоциты, что включило определение количества клеток с фенотипом CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻/CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, а также оценку содержания транскрипционного фактора FoxP3 и цитолитического белка перфорина.

Кроме того, в рамках блока клинических исследований была проведена сравнительная оценка экспрессии галектина-1 при ревматоидном артрите.

3.1 Результаты исследования влияния галектина-1 на апоптоз CD4⁺-лимфоцитов

Оценка влияния галектина-1 на апоптоз CD4⁺-лимфоцитов была выполнена на модели активации клеток (модель 1). На первом этапе определялось количество апоптотически измененных CD4⁺-лимфоцитов при действии рекомбинантной формы галектина-1 в дозах 0,1 – 4,0 мкг/мл. На втором этапе проведено исследование деполяризации митохондриальной мембраны, а также содержания белков Bcl-2 и Bax в условиях действия галектина-1 в проапоптотических дозах *in vitro*.

3.1.1 Содержание апоптотически измененных CD4⁺-лимфоцитов при действии рекомбинантного галектина-1 *in vitro*

Результаты определения количества CD4⁺-лимфоцитов в состоянии апоптоза при действии рекомбинантного галектина-1 *in vitro* на клетки в процессе их активации с помощью антител к CD3 и CD28 представлены на рисунке 6. Клетки в состоянии апоптоза выявляли методом проточной цитофлуориметрии по связыванию аннексина-V и витального красителя 7AAD.

В контрольной группе (клетки активированные в отсутствие рекомбинантного галектина-1) содержание жизнеспособных CD4⁺-лимфоцитов составило 89,55(84,71–91,78)%, количество CD4⁺Аннексин⁺7AAD⁻ и CD4⁺Аннексин⁺7AAD⁺ лимфоцитов при этом находилось на уровне 6,60(3,26–11,72) и 2,82(2,42–3,32)%, соответственно. Добавление рекомбинантной формы галектина-1 *in vitro* в культуральную среду в дозах 0,1; 0,5 и 1,0 мкг/мл не сопровождалось статистически значимым увеличением содержания апоптотически измененных CD4⁺-лимфоцитов, по сравнению с контрольной группой ($p \geq 0,05$ для указанных

пар сравнения). Галектин-1 в дозе 2,5 мкг/мл значительно повышал процент $CD4^+$ Аннексин⁺7AAD⁺ лимфоцитов до 16,57(9,512–36,53)% ($p < 0,05$ по сравнению со значениями, полученными в контрольной группе и при действии галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл) на фоне снижения содержания $CD4^+$ Аннексин⁻7AAD⁻ лимфоцитов (66,8 (53,57–82,37)%) (рисунок 6).

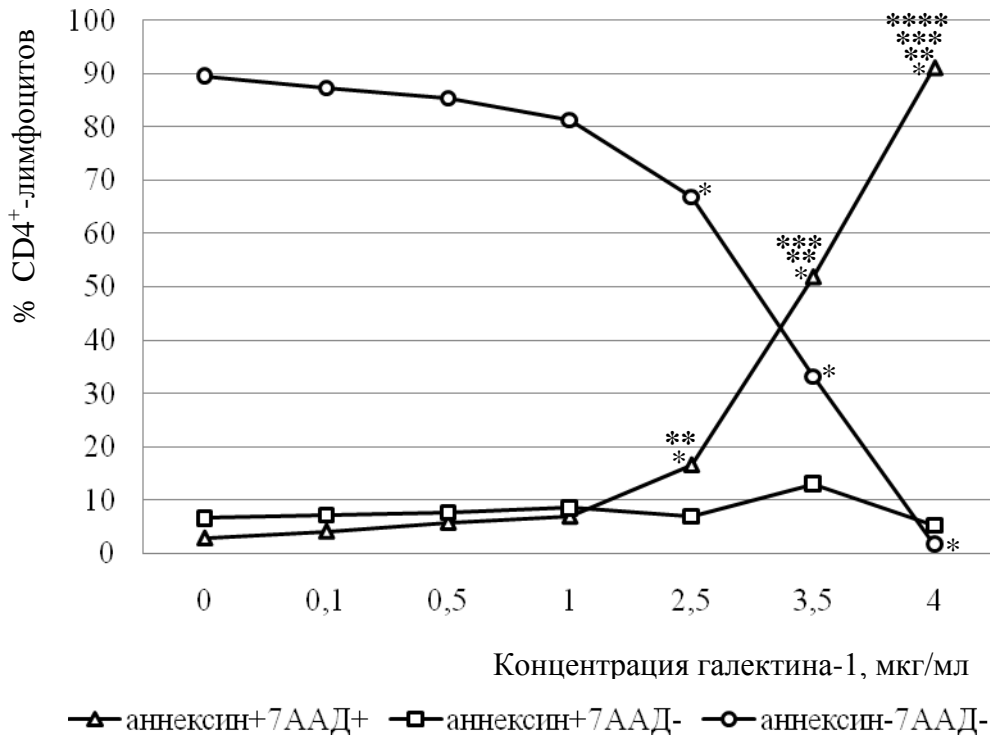


Рисунок 6. Содержание апоптотически измененных и жизнеспособных $CD4^+$ -лимфоцитов, активированных антителами к CD3 и CD28, в зависимости от концентрации рекомбинантного галектина-1 в культуральной среде: * – $p < 0,05$ по сравнению с аналогичными показателями в интактной культуре лимфоцитов; ** – $p < 0,05$ по сравнению с аналогичными показателями, полученными при добавлении галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл; *** – $p < 0,05$ по сравнению с аналогичными показателями, полученными при добавлении галектина-1 в дозе 2,5 мкг/мл; **** – $p < 0,05$ по сравнению с аналогичными показателями, полученными при добавлении галектина-1 в дозе 3,5 мкг/мл

При действии галектина-1 в дозе 3,5 мкг/мл содержание $CD4^+$ Аннексин⁺7AAD⁺ лимфоцитов увеличивалось в 18 раз по сравнению с контролем ($p < 0,05$), составив 51,90(41,85–55,10)%. Полученные при добавлении галектина-1 в дозе 3,5 мкг/мл значения количества $CD4^+$ Аннексин⁺7AAD⁺ лимфоцитов достоверно превышали значения, полученные при добавлении данного лектина в дозах 1,0 и 2,5 мкг/мл ($p <$

0,05 для указанных пар сравнения). Увеличение количества $CD4^+$ Annexin⁺7AAD⁺ лимфоцитов под действием галектина-1 в дозе 3,5 мкг/мл сопровождалось уменьшением количества $CD4^+$ Annexin⁻7AAD⁻ лимфоцитов до 33,10(30,47–46,72)%. Содержание $CD4^+$ Annexin⁺7AAD⁺ лимфоцитов при действии галектина-1 в дозе 4,0 мкг/мл находилось на уровне 91,15(88,50–94,85)%, а $CD4^+$ Annexin⁻7AAD⁻ лимфоцитов – на уровне 1,75(1,15–2,77)% (рисунок 6). Сравнение процента $CD4^+$ Annexin⁺7AAD⁺ лимфоцитов, полученного при добавлении галектина-1 в дозе 4,0 мкг/мл, со значениями, полученными при добавлении галектина-1 в дозах 1,0, 2,5 и 3,5 мкг/мл, выявило достоверность различий данного показателя ($p < 0,05$ для указанных пар сравнения).

Содержание $CD4^+$ Annexin⁺7AAD⁻ лимфоцитов статистически значимо не различалось ($p \geq 0,05$) в зависимости от дозы рекомбинантного галектина-1 и находилось на уровне 6,90(4,75–11,80), 13,05(8,75–15,30) и 5,20 (2,82–7,15)%, при добавлении галектина-1 *in vitro* в дозах 2,5; 3,5 и 4,0 мкг/мл, соответственно.

В отсутствие гейтирования лимфоцитов по маркеру CD4 было определено количество апоптотически измененных клеток в общей популяции лимфоцитов при действии галектина-1 в дозе 3,5 мкг/мл. Сравнение содержания клеток в состоянии апоптоза ($CD4^+$ Annexin⁺7AAD⁻ и $CD4^+$ Annexin⁺7AAD⁺) в популяции $CD4^+$ -лимфоцитов и общей популяции лимфоцитов не выявило достоверных различий (таблица 3).

Таким образом, в условиях активации клеток *in vitro* с помощью антител к CD3 и CD28 рекомбинантный галектин-1 дозозависимо индуцирует апоптоз $CD4^+$ -лимфоцитов при добавлении в концентрациях 2,5 мкг/мл и выше. Чувствительность лимфоцитов к апоптоз-индуцирующему действию рекомбинантного галектина-1 не зависит от наличия маркера CD4.

Таблица 3

Содержание (%) апоптотически измененных клеток в популяции CD4⁺-лимфоцитов и в общей популяции лимфоцитов при добавлении в культуральную среду рекомбинантного галектина-1 в дозе 3,5 мкг/мл, $Me (Q_1 - Q_3)$

Показатель	CD4 ⁺ -лимфоциты	Общая популяция лимфоцитов
	(n = 15)	
Annexin ⁺ 7AAD ⁺ -клетки, %	51,90 (41,85–55,10)	49,80 (43,30–54,33) $p \geq 0,05$
Annexin ⁺ 7AAD ⁻ -клетки, %	13,05 (8,75–15,30)	17,25 (9,15–21,40) $p \geq 0,05$

Примечание: p – уровень значимости различий по сравнению с аналогичным показателем в популяции CD4⁺-лимфоцитов

3.1.2 Изменения трансмембранного потенциала митохондрий лимфоцитов при действии рекомбинантного галектина-1

С использованием флуорохрома JC-1 исследовано снижение трансмембранного потенциала митохондрий при действии рекомбинантного галектина-1 в дозах 2,5; 3,5 и 4,0 мкг/мл на клетки в условиях активации антителами к CD3 и CD28. В результате анализа на лазерном проточном цитофлуориметре определено соотношение лимфоцитов, окрашенных JC-1-мономерами и JC-1-агрегатами (таблица 4).

Количество клеток, содержащих JC-1 в форме мономеров, в контрольной группе составило 12,55(11,10–14,10)%. Действие рекомбинантного галектина-1 в дозе 2,5 мкг/мл приводило к статистически значимому увеличению ($p < 0,05$) величин данного показателя до 27,00(22,95–31,25)%. При добавлении галектина-1 в дозе 3,5 мкг/мл число лимфоцитов, содержащих JC-1 в виде мономеров, составило 38,80(35,75–42,98)%, что превышало величину данного показателя в контрольной группе в 3 раза. При добавлении галектина-1 в дозе 4,0 мкг/мл, величина данного

показателя составляла 49,10(43,83–51,43)%, значимо превышая соответствующие значения в контрольной группе (таблица 4).

Таблица 4

Количество лимфоцитов (%), окрашенных JC-1 в форме мономеров/агрегатов, при добавлении проапоптотических доз рекомбинантного галектина-1 в культуру клеток, активированных антителами к CD3 и CD28, $Me (Q_1 - Q_3)$

Показатель	Концентрация г-галектина-1, (n = 15)			
	0,0 мкг/мл	2,5 мкг/мл	3,5 мкг/мл	4,0 мкг/мл
Лимфоциты, окрашенные JC-1-мономерами, %	12,55 (11,10–14,10)	27,00 (22,95–31,25) $p_1 < 0,05$	38,80 (35,75–42,98) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	49,10 (43,83–51,43) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
Лимфоциты, окрашенные JC-1-агрегатами, %	79,98 (72,40–87,00)	70,35 (66,15–74,70) $p_1 < 0,05$	58,6 (52,32–65,40) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	48,7 (42,20–51,60) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$

Примечание: p_1 – уровень значимости различий по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе; p_2 – по сравнению с аналогичным показателем при добавлении галектина-1 в дозе 2,5 мкг/мл; p_3 – по сравнению с аналогичным показателем при добавлении галектина-1 в дозе 3,5 мкг/мл

Таким образом, в условиях активации клеток антителами к CD3 и CD28 добавление галектина-1 *in vitro* в проапоптотических дозах приводит к деполяризации митохондриальной мембраны.

3.1.3 Содержание белков семейства Bcl-2 в мононуклеарных клетках при действии рекомбинантного галектина-1

В лизатах мононуклеарных клеток было определено количество белков семейства Bcl-2 при действии галектина-1 в дозе 3,5 мкг/мл в условиях активации лимфоцитов с помощью антител к CD3 и CD28 (рисунок 7). Добавление галектина-1 приводило к значимому снижению ($p < 0,05$) содержания антиапоптотического белка Bcl-2 до 4,70 (1,70–5,63) усл.ед., при этом в контрольной группе величина данного показателя составила 11,11(7,67–13,54) усл.ед. (рисунок 7). Уровень проапоптотического белка Вах статистически значимо ($p < 0,05$) повышался при действии галектина-1, составив 0,05(0,01–0,09) усл. ед. в клетках контрольной группы и 0,62(0,48–0,90) усл. ед. – в клетках, культивированных при добавлении галектина-1.

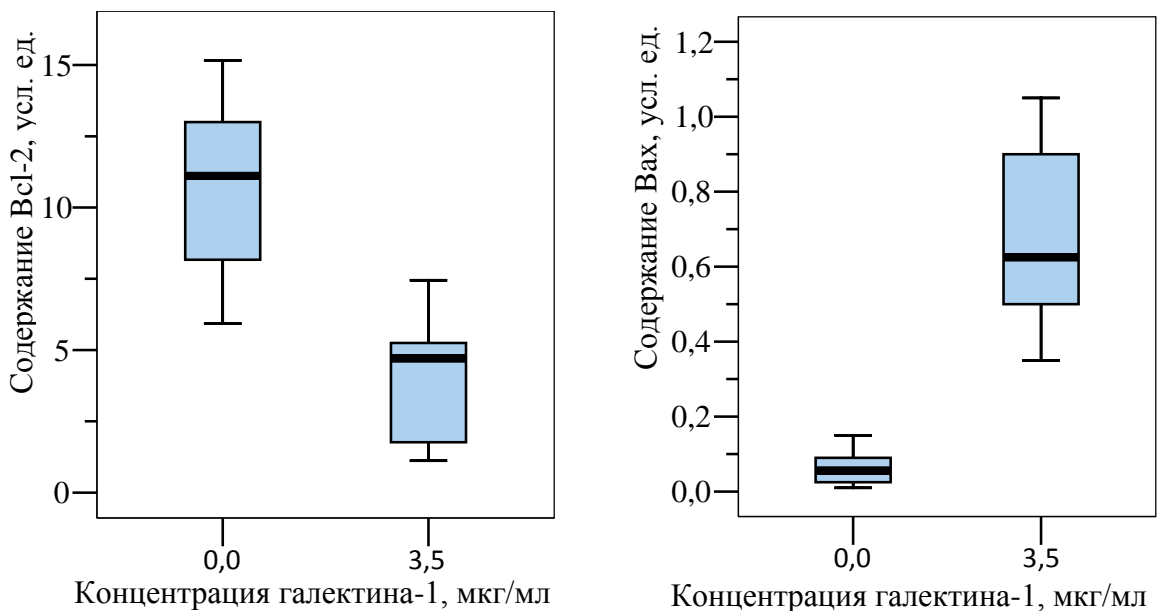
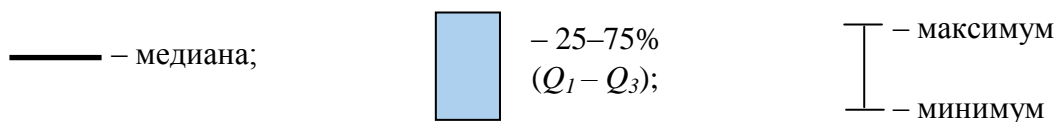


Рисунок 7. Внутриклеточное содержание антиапоптотического белка Bcl-2 и проапоптотического белка Вах в лизатах мононуклеарных лейкоцитов при действии *in vitro* рекомбинантного галектина-1 в условиях активации клеток с помощью антител к CD3 и CD28, Me ($Q_1 - Q_3$)

Примечание: здесь и на рисунках 8, 9, 11:



Таким образом, *in vitro* в условиях активации клеток антителами к CD3 и CD28 добавление галектина-1 в дозе 3,5 мкг/мл приводит к снижению содержания антиапоптотического белка Bcl-2 и увеличению уровня проапоптотического белка Bax.

Проведенные *in vitro* исследования показали, что действие рекомбинантной формы галектина-1 в дозах 2,5 мкг/мл и выше на клетки в условиях активации с помощью антител к CD3 и CD28 увеличивает количество апоптотически измененных CD4⁺-лимфоцитов. Проапоптотическое действие галектина-1 сопровождалось деполяризацией митохондриальной мембраны лимфоцитов и изменением внутриклеточного содержания антиапоптотических и проапоптотических белков семейства Bcl-2. Полученные результаты свидетельствуют о способности галектина-1 индуцировать митохондриальный путь апоптоза CD4⁺-лимфоцитов в процессе активации через CD3 и CD28.

3.2 Результаты исследования влияния галектина-1 на дифференцировку CD4⁺-лимфоцитов

Моделью изучения влияния галектина-1 на направление дифференцировки CD4⁺-лимфоцитов (Th1, Th2, Th17, Treg) явилась активация клеток *in vitro* (модель 1). Для оценки направления дифференцировки CD4⁺-лимфоцитов было проведено исследование экспрессии мРНК транскрипционных факторов Th1- (Tbet), Th2- (Gata-3), Th17-клеток (RORc) и регуляторных Т-лимфоцитов (FoxP3). Была также исследована продукция основных цитокинов, характеризующих Th1-, Th2-, Th17- и регуляторные Т-лимфоциты.

3.2.1 Экспрессия мРНК транскрипционных факторов CD4⁺-лимфоцитов при действии рекомбинантного галектина-1

Результаты оценки количества мРНК генов транскрипционных факторов (TBX21, GATA3, RORC, FOXP3) в клетках, активированных с помощью антител к CD3 и CD28, представлены на рисунке 8.

Клетки, культивированные в условиях активации с помощью антител без добавления галектина-1, характеризовались наибольшим количеством мРНК TBX21 (3,54(2,61–7,10) усл.ед.). Количество мРНК Gata-3, RORc и FoxP3 находилось на уровне 1,30(0,10–3,61), 0,24(0,15–0,31) и 0,32(0,27–0,38) усл. ед., соответственно (рисунок 8).

Добавление галектина-1 приводило к статистически значимому ($p < 0,05$) снижению экспрессии мРНК транскрипционного фактора Tbet по сравнению с контрольными значениями (рисунок 8). Так, количество мРНК TBX21 в клетках при добавлении галектина-1 в дозах 1,0 и 2,0 мкг/мл составляло, соответственно, 1,62(0,52–2,16) и 1,60(0,51–2,09) усл. ед. Значимых различий при оценке количества мРНК Tbet в зависимости от дозы галектина-1 выявлено не было ($p \geq 0,05$).

Экспрессия мРНК транскрипционного фактора Gata-3 статистически значимо ($p < 0,05$) повышалась при добавлении галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл. Количество мРНК GATA3 в данной группе составило 16,18(15,06–18,40) усл.ед., превысив значения аналогичного показателя в контрольной группе в 12 раз. При увеличении концентрации галектина-1 до 2,0 мкг/мл содержание мРНК GATA3 значимо уменьшалось ($p < 0,05$), по сравнению с данным показателем при действии галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл, но оставалось статистически значимо выше ($p < 0,05$), по сравнению с контрольной группой, составив 5,46(2,95–6,17) усл.ед (рисунок 8).

При исследовании экспрессии мРНК RORC отмечалось статистически значимое ($p < 0,05$) снижение количества мРНК данного транскрипционного фактора до 0,07(0,04–0,10) и 0,05(0,04–0,11) усл.ед. в ответ на добавление галектина-1 в дозах 1,0 и 2,0 мкг/мл, соответственно (рисунок 8). При сравнении количества мРНК RORC в зависимости от дозы галектина-1 значимых различий не обнаруживалось ($p \geq 0,05$).

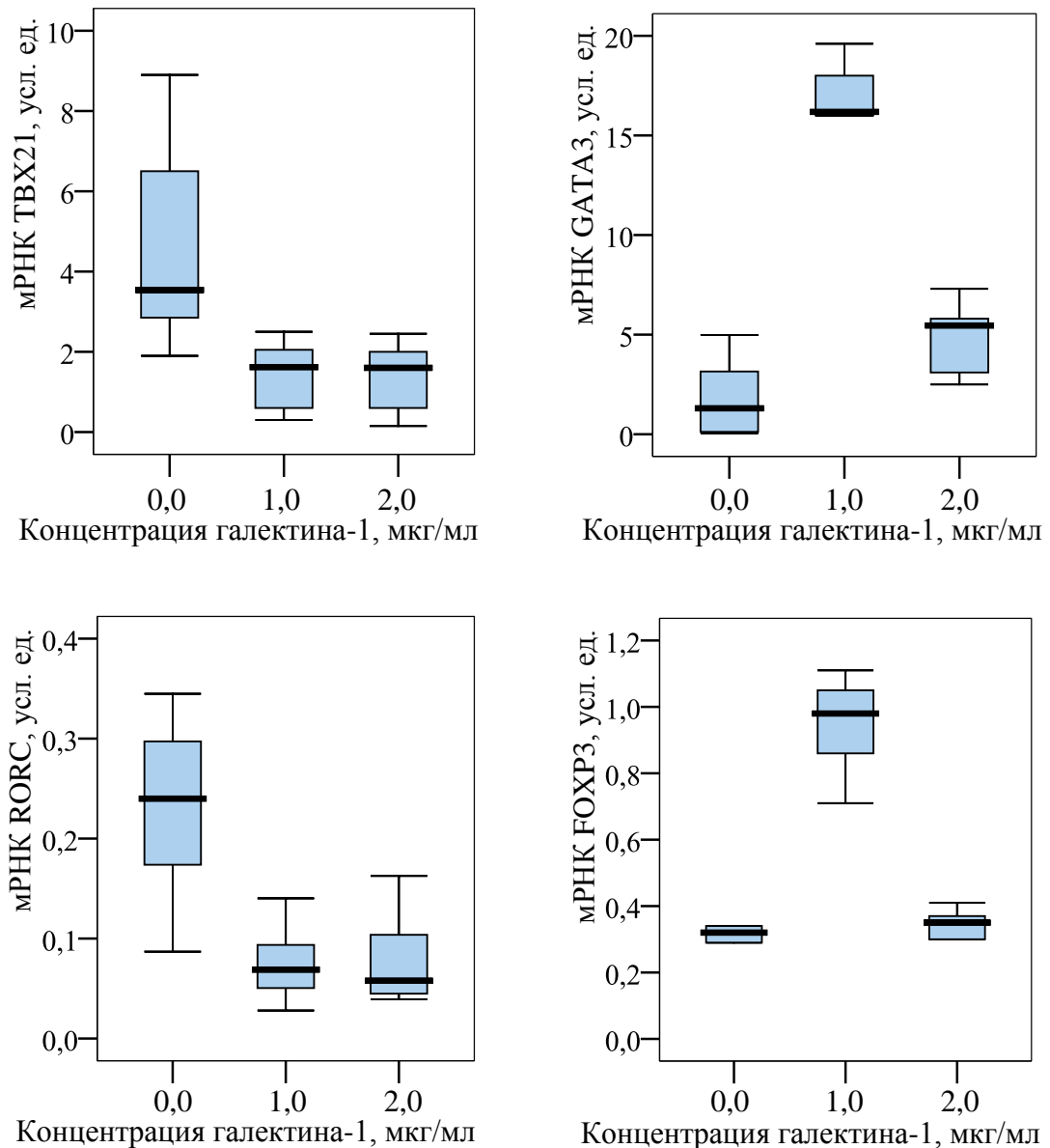


Рисунок 8. Уровень экспрессии мРНК транскрипционных факторов дифференцировки $CD4^+$ -лимфоцитов в мононуклеарных клетках при действии рекомбинантного галектина-1 в условиях активации лимфоцитов антителами к CD3 и CD28, $Me (Q_1 - Q_3)$.

Экспрессия мРНК транскрипционного фактора FOXP3 при добавлении галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл была значимо ($p < 0,05$) выше, чем в контрольной группе и в клетках, культивированных с добавлением галектина-1 в дозе 2,0 мкг/мл (рисунок 8). Количество мРНК FOXP3 в клетках при добавлении галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл находилось на уровне 0,98(0,82–1,06) усл. ед., а в дозе 2,0 мкг/мл – на уровне 0,35(0,24–0,38) усл. ед. При сравнении уровня мРНК FOXP3 в контрольной группе и в группе с добавлением галектина-1 в дозе 2,0 мкг/мл значимых отличий не обнаруживалось.

Таким образом, добавление рекомбинантного галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл в условиях активации антителами к CD3 и CD28 приводит к увеличению экспрессии мРНК транскрипционных факторов дифференцировки Th2- (Gata-3) и регуляторных T-лимфоцитов (FoxP3) на фоне снижения экспрессии мРНК транскрипционных факторов дифференцировки Th1- (Tbet) и Th17-лимфоцитов (RORc). Добавление рекомбинантного галектина-1 в дозе 2,0 мкг/мл приводит к неспецифическому снижению экспрессии мРНК исследованных транскрипционных факторов дифференцировки CD4⁺-лимфоцитов.

3.2.2 Продукция цитокинов CD4⁺-лимфоцитов при действии рекомбинантного галектина-1

С использованием метода иммуноферментного анализа было исследовано влияние галектина-1 на продукцию клетками цитокинов (IFN- γ , IL-13, IL-17 и IL-10) в условиях активации с помощью антител к CD3 и CD28 (рисунок 9).

Содержание IFN- γ в надосадочных фракциях клеток контрольной группы (6097,10(5334,18–7219,59) пг/мл) и при добавлении галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл (6330,91(5572,69–7623,10) пг/мл) статистически значимо не

отличалось ($p \geq 0,05$). Увеличение дозы рекомбинантного галектина-1 до 2,0 мкг/мл приводило к значимому повышению ($p < 0,05$) содержания IFN- γ до 7625,34(7355,88–10678,26) пг/мл (рисунок 9).

При добавлении галектина-1 в дозах 1,0 и 2,0 мкг/мл количество IL-13 в надосадочных фракциях клеток составило 1049,00(952,75–1241,37) и 543,00(379,12–799,50) пг/мл, что оказалось статистически значимо выше ($p < 0,05$) значений аналогичного показателя в контрольной группе (164,00(117,37–295,12) пг/мл). При этом в пробе с добавлением галектина-1 в дозе 2,0 мкг/мл содержание IL-13 было значимо ниже ($p < 0,05$), по сравнению с данным показателем при действии галектина-1 в концентрации 1,0 мкг/мл (рисунок 9).

Статистически значимых различий при сравнении содержания IL-17 в надосадочных фракциях клеток контрольной группы (5492,50(5173,53–6120,51) пг/мл) и клеток, культивированных при добавлении галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл (5720,29(5535,05–5970,79) пг/мл), выявлено не было ($p \geq 0,05$). При действии галектина-1 в дозе 2,0 мкг/мл содержание IL-17 составило 4779,96(4434,82–5098,48) пг/мл, что оказалось статистически значимо ниже ($p < 0,05$) значений аналогичного показателя в клетках контрольной группы и в клетках, культивированных в условиях действия галектина-1 в концентрации 1,0 мкг/мл (рисунок 9).

Сравнение содержания IL-10 в надосадочных фракциях клеток контрольной группы (2204,80(1783,64–2768,95) пг/мл) и клеток, культивированных при добавлении галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл (2018,69(1388,74–2775,39) пг/мл), статистически значимых различий не выявило ($p \geq 0,05$). В надосадочных фракциях клеток, культивированных в условиях добавления галектина-1 в дозе 2,0 мкг/мл, отмечалось снижение количества IL-10 до 891,48(408,77–1248,04) пг/мл, что значимо отличалось от аналогичного показателя в контрольной группе и в условиях действия галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл ($p < 0,05$) (рисунок 9).

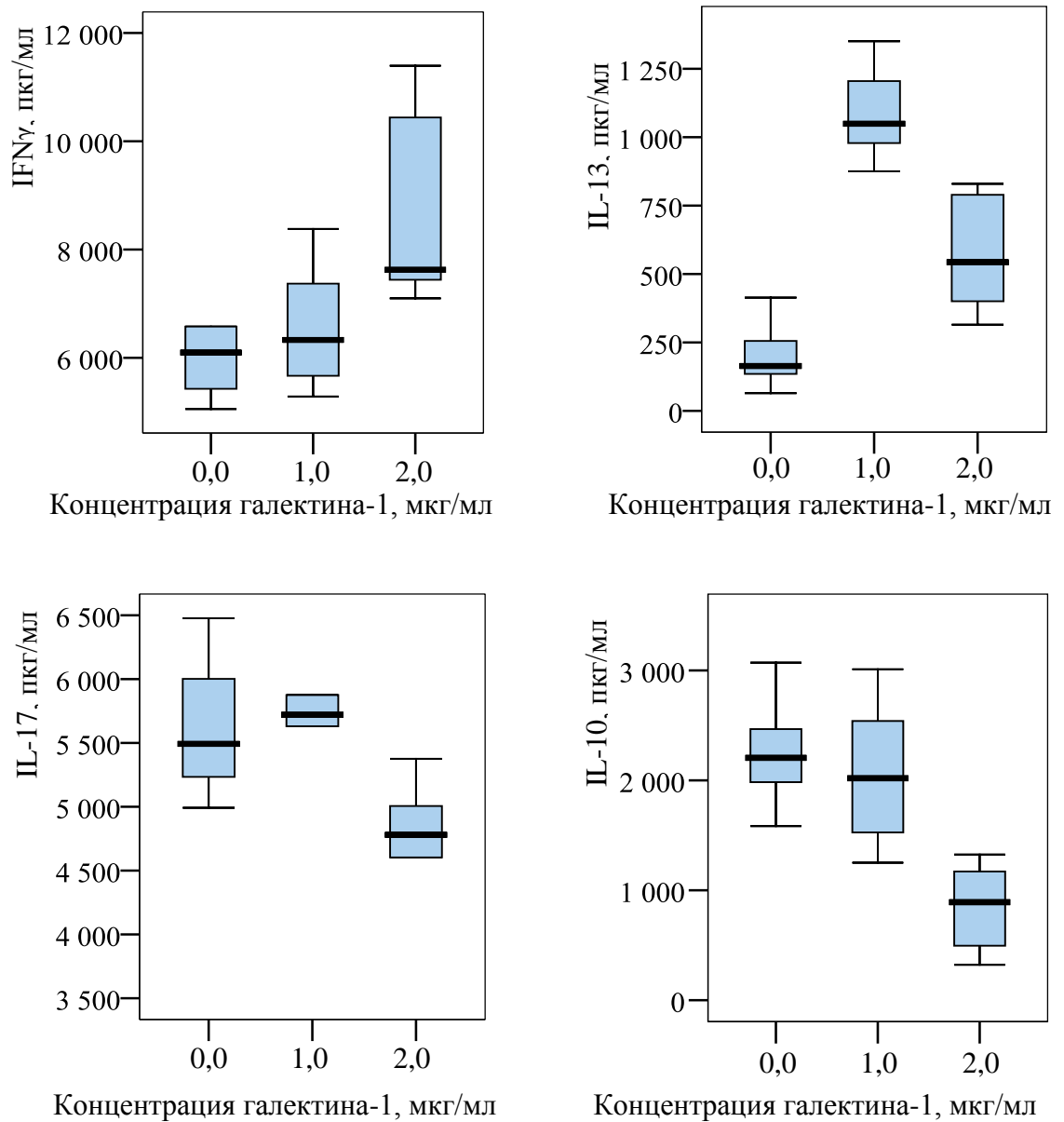


Рисунок 9. Содержание цитокинов в надосадочных фракциях культур клеток при действии рекомбинантного галектина-1 в условиях активации антителами к CD3 и CD28, $Me (Q_1 - Q_3)$

Таким образом, добавление рекомбинантного галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл одновременно с активацией лимфоцитов антителами к CD3 и CD28 увеличивает продукцию клетками IL-13 в отсутствие влияния на продукцию других исследованных цитокинов. Добавление рекомбинантного галектина-1 в дозе 2,0 мкг/мл приводит к неспецифическому снижению продукции IL-13, IL-17, IL-10, на фоне увеличения продукции IFN- γ .

В целом, проведенные исследования на модели активации клеток *in vitro* (модель 1) показали способность галектина-1 стимулировать дифференцировку CD4⁺-лимфоцитов по направлению Th2- и регуляторных Т-лимфоцитов в процессе взаимодействия с антигенпрезентирующими клетками, что проявляется увеличением экспрессии мРНК Gata-3 и FoxP3 и продукции IL-13.

3.3 Результаты исследования влияния галектина-1 на дифференцированные регуляторные Т-лимфоциты

С целью оценки влияния галектина-1 на дифференцированные регуляторные Т-лимфоциты было проведено исследование фенотипа CD4⁺CD25^{high}-лимфоцитов, а также внутриклеточного содержания транскрипционного фактора дифференцировки FoxP3 и эффекторного белка перфорина при действии рекомбинантного галектина-1 в дозах 0,5 и 1,0 мкг/мл. Данная часть работы выполнена на модели направленной дифференцировки в регуляторные Т-лимфоциты *in vitro* (модель 2).

3.3.1 Результаты экспериментального подбора доз рекомбинантных цитокинов для осуществления дифференцировки CD4⁺-лимфоцитов в Т-регуляторные клетки

Для подбора условий направленной дифференцировки клеток в регуляторные Т-лимфоциты был проведен анализ фенотипа CD4⁺CD25^{high}-лимфоцитов, общей клеточности и жизнеспособности на 6-е сут культивирования при добавлении различных сочетаний концентраций рекомбинантных цитокинов (IL-2 и TGF-β₁) в процессе активации антителами к CD3 и CD28 (таблица 5). Необходимо отметить, что CD4⁺CD25⁺-лимфоциты независимо от условий культивирования

характеризовались высокой экспрессией CD25, т.е. относились к CD4⁺CD25^{high}-лимфоцитам.

В результате экспериментального подбора доз было установлено, что добавление IL-2 в дозе 20 нг/мл и TGF-β₁ в концентрации 30 нг/мл сопровождается высоким значением клеточной гибели (жизнеспособность клеток при окраске трипановым синим составила 0%). При добавлении цитокинов в минимальных дозах (5 нг/мл - для IL-2, 10 нг/мл – для TGF-β₁), культура клеток характеризовалась низкой активностью дифференцировки в направлении регуляторных T-лимфоцитов и низкой активностью пролиферации клеток (количество CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺-лимфоцитов в культуре составило 7,40(3,00–14,10)% при клеточности (2,5 ± 0,4)×10⁶/мл).

При добавлении в культуру клеток IL-2 в концентрации 10 нг/мл и TGF-β₁ в дозе 20 нг/мл процент T-регуляторных клеток, экспрессирующих транскрипционный фактор Foxp3, составил 40,20(40,00–49,20)%, а общая клеточность в культуре возросла в 2,5 раза (с 2,0×10⁶/мл до (5,2 ± 0,6)×10⁶/мл). Последующее увеличение концентрации rTGF-β₁ приводило к снижению содержания клеток с фенотипом CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ и клеточности культуры (таблица 5). При добавлении IL-2 в концентрации 10 нг/мл в сочетании с TGF-β₁ в концентрации 30 нг/мл количество CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺-лимфоцитов составляло 31,60(25,80–37,40)% при общей клеточности (4,10 ± 0,35)×10⁶/мл. Сочетание IL-2 в концентрации 10 нг/мл с TGF-β₁ в дозе 40 нг/мл сопровождалось снижением количества CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺-лимфоцитов до 25,40(18,00–32,90)%, клеточность культуры при этом составила (3,70 ± 0,30)×10⁶/мл, что было существенно ниже, чем при добавлении rTGF-β₁ в концентрации 20 нг/мл.

Таким образом, наиболее оптимальным условием *in vitro* дифференцировки регуляторных T-лимфоцитов в проведенных нами исследованиях явилась комбинация rIL-2 в концентрации 10 нг/мл и rTGF-β₁ в дозе 20 нг/мл, позволившая получить наибольшее содержание клеток с фенотипом CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ при максимальной клеточности. Суммарное количество CD4⁺CD25^{high}-лимфоцитов при этом составило 95,9(89,1 – 99,9)%.

Таблица 5

Особенности дифференцировки CD4⁺-лимфоцитов в Т-регуляторные клетки, клеточность культуры и жизнеспособность клеток в условиях действия рекомбинантных цитокинов (IL-2, TGF-β₁) в различных дозах

Доза рекомбинантных цитокинов		Показатель				
IL-2, нг/мл	TGF-β ₁ , нг/мл	Количество CD4 ⁺ -клеток, %	Количество CD4 ⁺ CD25 ^{high} FoxP3 ⁻ клеток, %	Количество CD4 ⁺ CD25 ^{high} FoxP3 ⁺ клеток, %	Клеточность культуры, 10 ⁶ /мл	Жизнеспособность клеток, %
5	10	39,40 ± 4,30	92,10 (86,70 – 97,90)	7,40 (3,00 – 14,10)	2,50 ± 0,40	95,00 ± 4,10
10	20	47,00 ± 2,80	59,70 (49,10 – 61,20)	40,20 (40,00 – 49,20)	5,20 ± 0,60	90,00 ± 4,60
10	30	52,70 ± 6,70	59,80 (52,20 – 67,10)	31,60 (25,80 – 37,40)	4,10 ± 0,35	86,60 ± 6,30
10	40	50,90 ± 5,30	64,10 (60,30 – 70,40)	25,40 (18,00 – 32,90)	3,70 ± 0,30	91,26 ± 5,10
20	30	–	–	–	–	0

3.3.2 Содержание клеток с фенотипом регуляторных Т-лимфоцитов при действии рекомбинантного галектина-1

В мононуклеарных клетках, культивированных в условиях направленной дифференцировки в регуляторные Т-лимфоциты, было исследовано содержание лимфоцитов с фенотипами $CD4^+CD25^+FoxP3^-$ и $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ при действии галектина-1 в 1-е сут культивирования (схема 1), а также через 72 ч (схема 2).

В контрольной группе, клетки которой культивировались с добавлением активирующих антител в отсутствие рекомбинантных цитокинов и галектина-1, наибольший процент составили $CD4^+CD25^-FoxP3^-$ лимфоциты (67,30(57,30 – 74,60) %). Смещение субпопуляционного состава в сторону $CD4^+CD25^+$ -лимфоцитов, сопровождаемое статистически значимым снижением ($p < 0,05$) количества $CD4^+CD25^-FoxP3^-$ клеток, было установлено в условиях направленной дифференцировки без добавления галектина-1, а также при добавлении галектина-1 как одновременно с активирующими антителами, так и через 72 ч.

При культивировании клеток в условиях направленной дифференцировки в регуляторные Т-лимфоциты (добавление рекомбинантных IL-2 и TGF- β_1) 59,70(49,10 – 61,20)% клеток характеризовались фенотипом $CD4^+CD25^+FoxP3^-$, 40,20(40,00 – 49,20)% – фенотипом $CD4^+CD25^+FoxP3^+$, что было статистически значимо выше соответствующих показателей в контрольной группе ($p < 0,05$) (таблица 6, 7). На рисунке 10 представлено распределение $CD4^+$ -лимфоцитов по экспрессии FoxP3 и CD25 в культурах с добавлением рекомбинантных цитокинов.

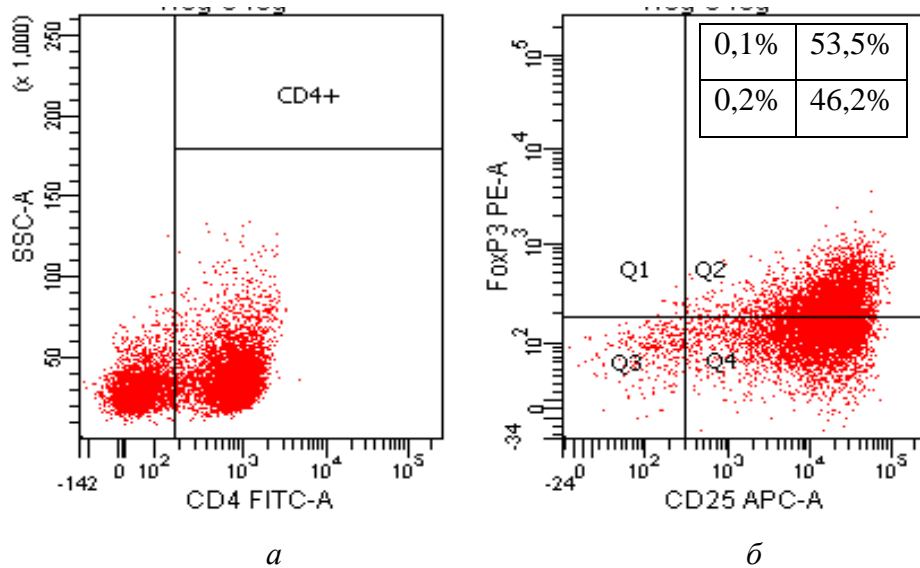


Рисунок 10. Распределение $CD4^+$ -лимфоцитов, культивированных в условиях направленной дифференцировки по фенотипам $CD25^+FoxP3^- / CD25^+FoxP3^+$: *а* – выделение популяции $CD4^+$ клеток (FITC⁺), *б* – гейтирование клеток по маркерам CD25 и FoxP3. Квадрант Q1 – $CD25^-FoxP3^+$; квадрант Q2 – $CD25^+FoxP3^+$; квадрант Q3 – $CD25^-FoxP3^-$; квадрант Q4 – $CD25^+FoxP3^-$

Результаты исследования субпопуляционного состава культуры клеток при добавлении галектина-1 одновременно с активирующими антителами (схема 1) представлены в таблице 6. Добавление галектина-1 одновременно с активирующими антителами повышало содержание $CD4^+CD25^+FoxP3^-$ лимфоцитов в 1,3 раза, по сравнению с клетками, культивированными в условиях направленной дифференцировки. Содержание $CD4^+CD25^+FoxP3^-$ -клеток составило 77,90(73,20 – 82,60)% от общего количества $CD4^+$ -лимфоцитов при добавлении галектина-1 в дозе 0,5 мкг/мл и 83,45(80,80 – 87,90)% – при добавлении галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл. При этом добавление галектина-1 одновременно с активирующими антителами приводило к снижению содержания $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ клеток до 13,35(8,50 – 15,60)%, что соответствовало значениям данного показателя в контрольной группе.

При оценке влияния изучаемого лектина на уже поляризованные Т-регуляторные клетки (схема 2) был выявлен дозозависимый эффект.

Добавление в культуральную среду галектина-1 через 72 ч культивирования в дозе 0,5 мкг/мл не оказывало влияния на фенотип CD4⁺-лимфоцитов. Содержание клеток с фенотипами CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻ и CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ в данной группе составило 54,60(44,20 – 62,20)% и 45,30(37,70 – 54,00)%, соответственно, что значимо не отличалось ($p \geq 0,05$) от аналогичных показателей в клетках, культивированных с добавлением рекомбинантных цитокинов, и было также статистически значимо выше, по сравнению с контрольными значениями ($p < 0,05$) (таблица 7). Действие галектина-1 через 72 ч культивирования в дозе 1,0 мкг/мл приводило к увеличению содержания CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺-лимфоцитов до 59,10(45,30 – 64,20) %, что было статистически значимо выше ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичным показателем, полученным при культивировании клеток в условиях направленной дифференцировки без добавления галектина-1 (таблица 7). На фоне увеличения содержания CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺-клеток происходило пропорциональное снижение числа лимфоцитов с фенотипом CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻.

Таким образом, в условиях направленной дифференцировки *in vitro* галектин-1 обладает разнонаправленным влиянием на фенотип CD4⁺-лимфоцитов в зависимости от стадии дифференцировки. Добавление рекомбинантного галектина-1 одновременно с активирующими антителами ингибирует экспансию клеток с фенотипом CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. Добавление галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл через 72 ч культивирования клеток повышает количество клеток с фенотипом CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺.

Таблица 6

Содержание субпопуляций CD4⁺-лимфоцитов при добавлении в культуру клеток рекомбинантного галектина-1 одновременно с активирующими антителами, Me (Q₁ – Q₃)

Субпопуляции CD4 ⁺ лимфоцитов на 6-е сут культивирования	Условия культивирования			
	антиCD3/CD28 антитела (контроль) (n = 15)	IL-2, TGF-β ₁ , антиCD3/CD28 антитела (n = 15)	IL-2, TGF-β ₁ , антиCD3/CD28 антитела, галектин-1 0,5 мкг/мл (n = 15)	IL-2, TGF-β ₁ , антиCD3/CD28 антитела, галектин-1 1,0 мкг/мл (n = 15)
CD4 ⁺ CD25 ⁻ FoxP3 ⁻ , %	67,30 (57,30 – 74,60)	0,30 (0,10 – 1,70) <i>p</i> ₁ < 0,05	4,70 (4,50 – 4,90) <i>p</i> ₁ < 0,05 <i>p</i> ₂ < 0,05	3,60 (3,40 – 3,60) <i>p</i> ₁ < 0,05 <i>p</i> ₂ < 0,05 <i>p</i> ₃ ≥ 0,05
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁻ , %	15,40 (8,40 – 21,70)	59,70 (49,10 – 61,20) <i>p</i> ₁ < 0,05	77,90 (73,20 – 82,60) <i>p</i> ₁ < 0,05 <i>p</i> ₂ < 0,05	83,45 (80,80 – 87,90) <i>p</i> ₁ < 0,05 <i>p</i> ₂ < 0,05 <i>p</i> ₃ < 0,05
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ , %	17,30 (12,90 – 21,00)	40,20 (40,00 – 49,20) <i>p</i> ₁ < 0,05	17,35 (12,40 – 22,30) <i>p</i> ₁ ≥ 0,05 <i>p</i> ₂ < 0,05	13,35 (8,50 – 15,60) <i>p</i> ₁ < 0,05 <i>p</i> ₂ < 0,05 <i>p</i> ₃ < 0,05

Примечание: здесь и в таблице 7, *p*₁ – уровень значимости различий показателей по сравнению с контрольной группой; *p*₂ – по сравнению с группой с добавлением рекомбинантных цитокинов в отсутствие галектина-1; *p*₃ – по сравнению с группой с добавлением рекомбинантных цитокинов и галектина-1 в дозе 0,5 мкг/мл.

Таблица 7

Содержание субпопуляций CD4⁺-лимфоцитов при добавлении в культуру клеток рекомбинантного галектина-1 через 72 ч от начала культивирования, *Me (Q₁ – Q₃)*

Субпопуляции CD4 ⁺ лимфоцитов на 6-е сутки культивирования	Условия культивирования			
	антиCD3/CD28 антитела (контроль), (n=15)	IL-2, TGF-β ₁ , антиCD3/CD28 антитела, (n=15)	IL-2, TGF-β ₁ , антиCD3/CD28 антитела, галектин-1 0,5 мкг/мл (n=15)	IL-2, TGF-β ₁ , антиCD3/CD28 антитела, галектин-1 1,0 мкг/мл (n=15)
CD4 ⁺ CD25 ⁻ FoxP3 ⁻ , %	67,30 (57,30 – 74,60)	0,30 (0,10 – 1,70) <i>p₁ < 0,05</i>	0,20 (0,10 – 1,80) <i>p₁ < 0,05</i> <i>p₂ ≥ 0,05</i>	0,30 (0,20 – 1,90) <i>p₁ < 0,05</i> <i>p₂ ≥ 0,05</i> <i>p₃ ≥ 0,05</i>
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁻ , %	15,40 (8,40 – 21,70)	59,70 (49,10 – 61,20) <i>p₁ < 0,05</i>	54,60 (44,20 – 62,20) <i>p₁ < 0,05</i> <i>p₂ ≥ 0,05</i>	40,60 (33,90 – 54,60) <i>p₁ < 0,05</i> <i>p₂ < 0,05</i> <i>p₃ < 0,05</i>
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ , %	17,30 (12,90 – 21,00)	40,20 (40,00 – 49,20) <i>p₁ < 0,05</i>	45,30 (37,70 – 54,00) <i>p₁ < 0,05</i> <i>p₂ ≥ 0,05</i>	59,10 (45,30 – 64,20) <i>p₁ < 0,05</i> <i>p₂ < 0,05</i> <i>p₃ < 0,05</i>

3.3.3 Содержание транскрипционного фактора FoxP3 в лизатах мононуклеарных лейкоцитов при действии рекомбинантного галектина-1

Методом вестерн-блоттинга на 6-е сут культивирования было исследовано внутриклеточное содержание транскрипционного фактора FoxP3 (рисунок 11). В контрольной группе (клетки, культивированные без добавления рекомбинантных цитокинов и галектина-1) количество белка FoxP3 составило 0,19(0,16 – 0,23) усл. ед. В клетках, культивированных в условиях направленной дифференцировки (добавление рекомбинантных IL-2 и TGF- β_1), данный показатель был статистически значимо выше ($p < 0,05$), чем в контрольной группе и составил 0,32(0,24 – 0,40) усл. ед. Добавление галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл через 72 ч в культуру предварительно дифференцированных клеток приводило к значимому увеличению ($p < 0,05$) количества FoxP3 по сравнению с таковым в контрольной группе и клетками, культивированными в условиях направленной дифференцировки. Значения данного показателя при добавлении галектина-1 оказалось в 2 раза выше, чем в дифференцированных клетках, и составило 0,68(0,62 – 0,92) усл. ед.

Таким образом, действие галектина-1 на клетки, предварительно активированные и дифференцированные в направлении регуляторных Т-лимфоцитов, приводит к повышению экспрессии транскрипционного фактора дифференцировки регуляторных Т-лимфоцитов FoxP3

3.3.4 Содержание цитолитического белка перфорины в лизатах мононуклеарных лейкоцитов при действии рекомбинантного галектина-1

В результате исследования методом вестерн-блоттинга внутриклеточного содержания перфорины на 6-е сут культивирования было установлено, что добавление рекомбинантных цитокинов приводит к статистически значимому повышению ($p < 0,05$) значений данного показателя (рисунок 11). Количество перфорины в клетках, культивированных в условиях направленной дифференцировки, составило 3,13(2,21 – 4,67) усл. ед., в то время как в контрольной группе данный показатель находился на уровне 2,38(1,94 – 3,30) усл. ед. При действии галектина-1, добавляемого к дифференцированным клеткам через 72 ч, внутриклеточное содержание перфорины статистически значимо повышалось ($p < 0,05$) - до 4,98(3,24 – 7,28) усл. ед. Полученные значения количества перфорины оказались в 2 раза выше аналогичного показателя в клетках, культивируемых в условиях направленной дифференцировки без добавления галектина-1.

Таким образом, действие галектина-1 на клетки, предварительно активированные и дифференцированные в направлении регуляторных Т-лимфоцитов, приводит к повышению внутриклеточного содержания эффекторного белка регуляторных Т-лимфоцитов перфорины.

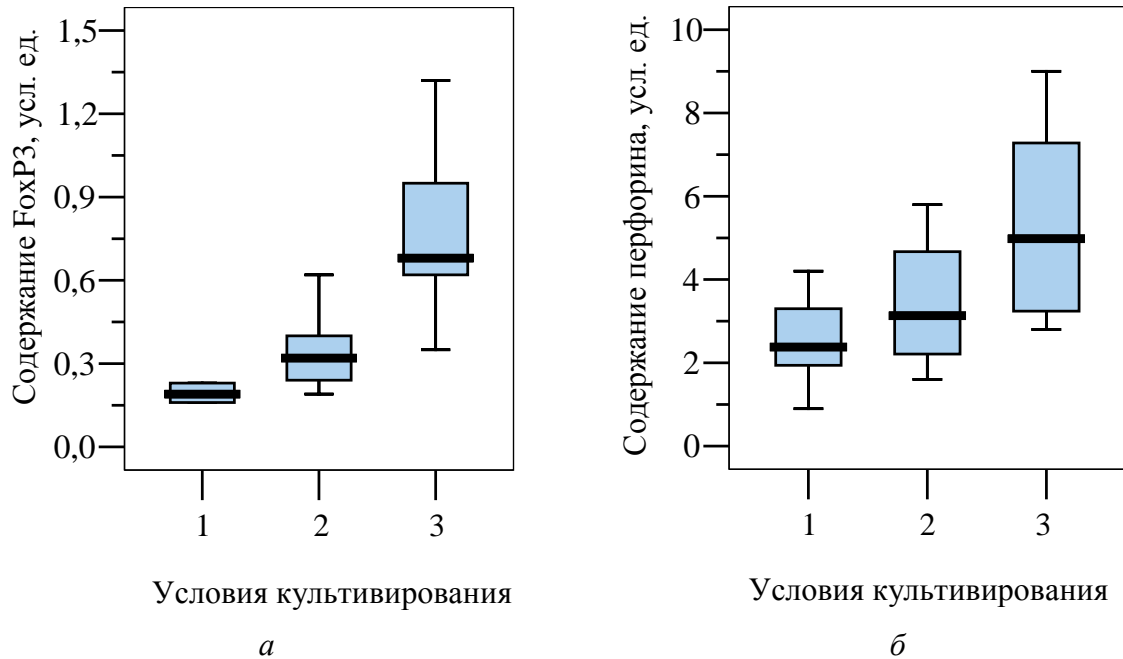


Рисунок 11. Внутриклеточное содержание транскрипционного фактора FoxP3 (а) и перфорина (б) в мононуклеарных клетках на 6-е сут культивирования
 Примечание: 1 – добавление активирующих антител на 1-е сут культивирования; 2 – добавление активирующих антител и цитокинов (IL-2, TGFβ1) на 1-е сут культивирования; 3 – добавление активирующих антител, цитокинов (IL-2, TGFβ1) на 1-е сут культивирования, добавление рекомбинантного галектина-1 через 72 ч от начала культивирования

В результате проведенных исследований на модели направленной дифференцировки *in vitro* было установлено, что галектин-1 при действии на регуляторные Т-лимфоциты индуцирует экспансию клеток с фенотипом CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, при этом увеличивается внутриклеточное содержание транскрипционного фактора FoxP3 и эффекторного белка перфорина.

3.4 Экспрессия мРНК галектина-1 в мононуклеарных клетках здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом

Блок клинических исследований включал анализ экспрессии мРНК галектина-1 у здоровых доноров и у пациентов с ревматоидным артритом.

Экспрессия галектина-1 у здоровых доноров (28,42(19,39 – 34,44) усл.ед.) оказалась достоверно выше ($p < 0,05$), чем у пациентов с ревматоидным артритом (4,22(0,58 – 6,56) усл.ед.) (рисунок 12).

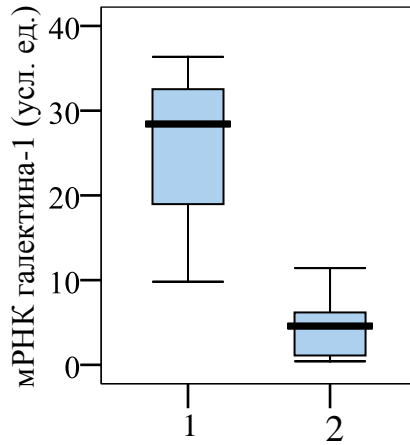


Рисунок 12. Количество мРНК галектина-1 в мононуклеарных клетках здоровых доноров (1) и пациентов с ревматоидным артритом (2)

Таким образом, установлено, что мононуклеарные клетки пациентов, страдающих ревматоидным артритом, характеризуются низкой экспрессией галектина-1.

Заключение

В ходе выполнения диссертационного исследования были получены данные фундаментального характера о механизмах влияния галектина-1 на баланс $CD4^+$ -лимфоцитов, а также данные об экспрессии галектина-1 при ревматоидном артрите.

В результате исследований, проведенных на моделях активации и направленной дифференцировки *in vitro*, установлена способность галектина-1 дозозависимо регулировать апоптоз и дифференцировку $CD4^+$ -лимфоцитов в процессе их взаимодействия с антиген-презентирующими

клетками, а также регулировать фенотип и функциональную активность регуляторных Т-лимфоцитов.

При добавлении галектина-1 в дозах 2,5 мкг/мл и выше в культуру клеток одновременно с активирующими антителами (модель 1) возрастало количество апоптотически измененных CD4⁺-лимфоцитов, что сопровождалось деполяризацией митохондриальной мембраны лимфоцитов и изменением внутриклеточного содержания антиапоптотических и проапоптотических белков семейства Bcl-2. Полученные результаты свидетельствуют о том, что действие галектина-1 на CD4⁺-лимфоциты в процессе их активации запускает митохондриальный путь апоптоза.

Добавление галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл в культуру мононуклеарных клеток одновременно с активирующими антителами (модель 1) приводило к увеличению экспрессии мРНК GATA-3 и FOXP3 на фоне снижения экспрессии мРНК TBX21 и RORC, а также к повышению продукции IL-13. Примечательным является неспецифическое угнетение экспрессии мРНК транскрипционных факторов дифференцировки и цитокинов (за исключением IFN γ) при действии галектина-1 в дозе 2,0 мкг/мл, что, вероятно, связано с гибелью CD4⁺-лимфоцитов в результате проапоптотического влияния галектина-1. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при действии галектина-1 в дозах ниже проапоптотической CD4⁺-лимфоциты дифференцируются в направлении Th2- и регуляторных Т-лимфоцитов.

В условиях направленной дифференцировки добавление в культуру клеток галектина-1 в дозах 0,5 и 1,0 мкг/мл одновременно с активирующими антителами (модель 2) приводило к уменьшению количества клеток с фенотипом CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. Предварительно дифференцированные регуляторные Т-лимфоциты (модель 2) реагировали на добавление галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл экспансией CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺-лимфоцитов, увеличением внутриклеточного содержания транскрипционного фактора

FoxP3 и эффекторного белка перфорина. Полученные данные свидетельствуют о том, что галектин-1 поддерживает фенотип и функциональную активность дифференцированных регуляторных Т-лимфоцитов.

В результате проведенного клинического исследования было установлено, что мононуклеарные лейкоциты пациентов, страдающих ревматоидным артритом, характеризуются низкой экспрессией галектина-1.

Глава 4. Обсуждение результатов

Оценка молекулярных механизмов регуляции процессов апоптоза, функциональной активности и дифференцировки CD4⁺-лимфоцитов представляет собой актуальную задачу медицинской науки. Это связано с тем, что CD4⁺-лимфоциты, являясь основными клетками, определяющими свойства иммунного ответа, приобретают патогенетическое значение в условиях дисрегуляции субпопуляционного баланса. Известно, что преобладание Th1-, Th2-, Th17-лимфоцитов, а также недостаточность T-регуляторного звена являются факторами патогенеза ряда аутоиммунных и аллергических заболеваний [Dardalhon V. et al., 2008; Korn T. et al., 2010; Piccirillo C.A., 2008; Lin C.H. et al., 2013]. Вместе с тем предполагается, что иммуносупрессорная активность регуляторных T-лимфоцитов способствует опухолевой прогрессии [Cao X., 2010; Nishikawa H. et al., 2010; Mandapathil M. et al., 2011; Adeegbe D.O., Nishikawa H., 2013]. В связи с этим молекулы кооперации клеток иммунной системы, участвующие в регуляции баланса CD4⁺-лимфоцитов, могут рассматриваться в качестве диагностических маркеров, а также агентов или мишеней в терапии аутоиммунных и опухолевых заболеваний.

Представленная нами работа направлена на исследование роли галектина-1 в регуляции баланса CD4⁺-лимфоцитов.

Предполагается, что, секретирясь в центральных и периферических органах иммунной системы, а также клетками некоторых типов опухолей, галектин-1 участвует в кооперации клеток иммунной системы. Несмотря на данные о терапевтическом эффекте галектина-1, полученные на экспериментальных моделях аутоиммунной патологии, и некоторые свидетельства о негативной роли галектина-1 при опухолевой прогрессии, к настоящему времени нет понимания механизмов иммунорегуляторного

действия галектина-1. Так, нет достаточной информации о влиянии галектина-1 на CD4⁺-лимфоциты. В литературе представлены немногочисленные работы, направленные на оценку влияния галектина-1 на апоптоз лимфоцитов, при этом, большинство работ в рамках обсуждаемой проблемы было выполнено на клеточных линиях или общей популяции лимфоцитов. Кроме того, описаны редкие исследования, оценивающие продукцию цитокинов при действии галектина-1 на моделях с экспериментальными животными, косвенно отражающие влияние галектина-1 на дифференцировку CD4⁺-лимфоцитов; внимание при этом преимущественно обращено на Th1- и Th2-типы дифференцировки [Santucci L. et al., 2003; Motran C.C. et al., 2008; Stowell S.R. et al., 2008; Perone M.J. et al., 2009]. Результаты работ, опубликованных в литературе, часто оказываются противоречивыми. Вероятно, это связано с изменением чувствительности клеток к галектину-1 в зависимости от субпопуляционной принадлежности, стадии лимфопозеза и статуса активации [Toscano M.A. et al., 2007].

В рамках экспериментальной части нашей работы было исследовано влияние галектина-1 на апоптоз, дифференцировку и функциональную активность CD4⁺-лимфоцитов. При этом информативность полученных результатов определяется объектом и условиями исследования. В основу представленного исследования были положены две модели, созданные *in vitro*. Первая модель воспроизводит процесс взаимодействия лимфоцитов с антиген-презентирующими клетками: связывание CD3 (Т-клеточного рецептора) с комплексом HLA-антигенный эпитоп и костимуляция через рецептор CD28, приводящие *in vivo* к пролиферации и дифференцировке лимфоцитов [Choudhuri K., Dustin M.L., 2010]. Вторая модель отражает этап дифференцированных клеток с преобладанием регуляторных Т-лимфоцитов.

Клиническая часть работы включила исследование экспрессии галектина-1 у пациентов с ревматоидным артритом, позволившее дополнить

существующие знания о патогенезе аутоиммунных заболеваний новыми фактическими данными для оценки перспективы использования данного белка в медицинской практике.

4.1 Влияние галектина-1 на апоптоз CD4⁺-лимфоцитов

Программированная клеточная гибель является необходимым механизмом контроля иммунного ответа на различных стадиях лимфопоэза [Ryazantseva N.V. et al., 2010; Saveleva O.E. et al., 2012]. Влияние галектина-1 на апоптоз CD4⁺-лимфоцитов рассматривается в качестве возможного механизма иммунорегуляторного действия данного лектина.

Для оценки способности галектина-1 индуцировать апоптоз CD4⁺-лимфоцитов было проведено окрашивание клеток аннексином-V и витальным красителем 7ААД, что позволяет выявить такие признаки апоптотической гибели, как переход фосфатидилсерина на внешнюю поверхность клеточной мембраны и увеличение проницаемости клеточной мембраны для низкомолекулярных соединений. В результате проведенного на лазерном проточном цитофлуориметре анализа окрашенных клеток было выявлено статистически значимое увеличение ($p < 0,05$) количества CD4⁺аннексин⁺7ААД⁺ лимфоцитов при действии галектина-1 в дозах 2,5; 3,5 и 4,0 мкг/мл в процессе активации клеток через CD3 и CD28 (модель 1) (рисунок 6).

Таким образом, галектин-1 в дозах 2,5, 3,5 и 4,0 мкг/мл индуцирует переход фосфатидилсерина на внешнюю поверхность цитоплазматической мембраны и увеличение проницаемости мембраны для витального красителя 7ААД (рисунок 6). О дозозависимом характере выявленного эффекта галектина-1 свидетельствуют значимые различия, наблюдаемые при сравнении этого показателя между группами с добавлением галектина-1 в дозах 2,5 – 4,0 мкг/мл. В литературе представлены работы, в которых

также отмечался переход фосфатидилсерина на внешнюю сторону цитоплазматической мембраны при действии галектина-1. Объектами исследования в этих работах явились активированные с помощью фитогемагглютинаина и IL-2 Т-клетки человека, Т-клетки линий СЕМ и MOLT-4 [Hahn H.P. et al., 2004; Matarrese P. et al., 2005].

Известно, что переход фосфатидилсерина является ранним признаком апоптоза и связан с действием фермента скрамблазы, активирующейся в ответ на повышение внутриклеточного содержания Ca^{2+} [Verhoven B. et al., 1995; Williamson P. et al., 2001]. Однако на данной стадии процесс апоптоза обратим. Так, в ряде исследований было показано, что выход фосфатидилсерина под действием галектина-1 не сопровождался апоптотической гибелью клеток (отсутствие фрагментации ДНК и морфологических изменений) [Stowell S.R. et al., 2008]. При этом авторы не отмечали ни деполяризации митохондриальной мембраны, ни увеличения проницаемости клеточной мембраны для витального красителя 7ААД, хотя продолжительность культивирования клеток была доведена до 30 ч. Можно предположить, что расхождение результатов связано с отличиями чувствительности исследуемых клеток. Указанная работа S.R. Stowell et al. [Stowell S.R. et al., 2008] была выполнена на нейтрофилах и клеточной линии HL-60, также представляющей клетки нейтрофильного происхождения.

Так как в проведенном нами исследовании переход фосфатидилсерина в $CD4^+$ -лимфоцитах сопровождался увеличением проницаемости плазматической мембраны для витального красителя 7ААД (рисунок 6), соответствующим необратимым изменениям клетки, можно сделать вывод о запуске программы апоптотической гибели $CD4^+$ -лимфоцитов при действии галектина-1 в процессе активации клеток через CD3 и CD28. При этом отсутствие значимого увеличения количества $CD4^+$ аннексин⁺7ААД лимфоцитов при добавлении исследуемых доз галектина-1 в исследуемых

дозах (рисунок 6) может быть связано с продолжительностью экспозиции клеток с рекомбинантной формой белка. Подтверждением способности галектина-1 индуцировать апоптоз Т-лимфоцитов являются результаты, полученные другими исследователями на клетках линии Jurkat и Т-клетках крыс. Так, через 6 ч после добавления галектина-1 была выявлена фрагментация ДНК, что считается достоверным признаком апоптотической гибели [Rabinovich G.A., 2000; Brandt B., 2010].

Основные механизмы запуска апоптоза можно условно разделить на рецепторный и митохондриальный пути [Elmore S., 2007]. В литературе представлены свидетельства способности галектина-1 модулировать рецепторный путь, с одной стороны, и индуцировать запуск митохондриального пути, с другой.

P. Matarrese et al. [2005] показали, что действие галектина-1 повышает чувствительность Т-лимфоцитов человека к Fas-индуцированному апоптозу. Основанием для такого заключения явилась активация каспазы-8 через 6 ч инкубации в отсутствие активации каспазы-9 и -3 и выхода цитохрома С. В качестве подтверждения описано угнетение экспрессии фосфатидилсерина и подавление активации каспаз в результате ингибирования церамида, являющегося вторичным мессенджером в сигнальной трансдукции от Fas/CD95 [Matarrese P. et al., 2005]. Однако в приведенном исследовании индуктором апоптоза являлся Fas-лиганд, а галектин-1 играл роль сенсibilизатора.

Исследования других авторов свидетельствуют в пользу митохондриального пути реализации запрограммированной клеточной гибели, индуцированной галектином-1. В этом случае выявленные в нашем исследовании признаки апоптоза CD4⁺-лимфоцитов при действии галектина-1 (переход фосфатидилсерина и увеличение проницаемости клеточной мембраны для витального красителя 7ААД) могут быть следствием влияния эффекторных молекул митохондриального пути

апоптоза. Данный путь программированной клеточной гибели заключается в увеличении проницаемости митохондриальной мембраны и выходе цитохрома С, участвующего в активации каспазы 9, а также АIF и эндонуклеазы G, осуществляющих фрагментацию хроматина [Martinou J.C., Youle R.J., 2011]. Интересными являются результаты, полученные на клетках линий СЕМ и MOLT-4, имеющих Т-лимфоцитарное происхождение. Индуцированный галектином-1 апоптоз сопровождался быстрой транслокацией эндонуклеазы G из митохондрий в ядро в отсутствие выхода цитохрома С, перехода в ядро АIF (апоптоз-индуцирующего фактора) и активации каспаз. При этом деполяризация митохондриальной мембраны происходила позднее перехода фосфатидилсерина [Hahn H.P. et al., 2004]. Последующие исследования других авторов показали активацию каспазы-3 и -9 в апоптозе клеток линии Jurkat, индуцированном галектином-1 [Brandt B., 2010]. Возможно, различия механизмов наблюдаемых апоптотических изменений клеток при действии галектина-1 связаны с особенностями клеточных линий, представляющих собой трансформированные клетки, для которых характерна модуляция апоптоза.

Для подтверждения запуска митохондриального пути апоптоза в CD4⁺-лимфоцитах под действием галектина-1 нами было проведено исследование трансмембранного потенциала митохондрий. Данное исследование было выполнено в общей популяции лимфоцитов, что связано с отсутствием возможности использования антител к CD4 в результате наложения спектров эмиссии флюорохромной метки антител и агрегированной формы митохондриального зонда JC-1. Необходимо заметить, что количество CD4⁺-клеток составляло 40–50% популяции лимфоцитов и не зависело от условий культивирования, что соответствует данным литературы о распределении маркера CD4 [Хайдуков С.В., 2007]. Сравнение количества клеток, связавших аннексин-V и 7AAD, в общей

популяции лимфоцитов и в популяции CD4⁺-лимфоцитов не выявило значимых различий (таблица 3). Проведенный анализ впервые позволил сделать предположение об одинаковой чувствительности клеток разных популяций лимфоцитарной фракции, в том числе CD4⁺-, CD8⁺-, В- и NK-лимфоцитов, к апоптоз-индуцирующему действию галектина-1.

В результате окрашивания клеток, проведенного с помощью митохондриального зонда JC-1, было установлено, что действие галектина-1 в проапоптотических дозах (2,5; 3,5 и 4,0 мкг/мл) на клетки в процессе активации приводит к деполяризации митохондриальной мембраны (таблица 4). Полученные результаты подтверждают предположение, что галектин-1 индуцирует митохондриальный путь апоптоза.

Для выяснения роли механизмов регуляции митохондриального пути в реализации апоптоза, индуцированного галектином-1, было исследовано семейство белков Bcl-2. Согласно современным представлениям, белок Bax, в норме ингибированный белком Bcl-2, в ответ на проапоптотические сигналы претерпевает конформационные изменения и, олигомеризуясь, пермеабелизует внешнюю мембрану митохондрий [Martinou J.C., Youle R.J., 2011]. Появление свободной формы белка Bax может быть связано с увеличением его экспрессии, а также со снижением экспрессии или фосфорилированием Bcl-2, блокирующим его гетеродимеризацию с белком Bad [Yamamoto K. et al., 1999]. В результате проведенного методом вестерн-блоттинга анализа было показано, что добавление галектина-1 приводит к снижению уровня антиапоптотического белка Bcl-2 и повышению уровня проапоптотического белка Bax (рисунок 7).

Деполяризация митохондриальной мембраны и изменения содержания белков семейства Bcl-2 при действии галектина-1 подтверждают способность данного лектина индуцировать митохондриальный путь апоптоза. Однако механизмы трансдукции проапоптотического сигнала от галектина-1 остаются не изученными. Предполагается, что трансдукция

проапоптотического сигнала от галектина-1 осуществляется через JNK/c-Jun/AP-1 и TCR ζ /Lck/ZAP70 пути. G.A. Rabinovich et al. (2000) на Т-клетках крыс показали, что индуцированный галектином-1 апоптоз реализуется с участием JNK и AP-1: добавление галектина-1 сопровождалось связыванием AP-1 с ДНК, увеличивало экспрессию мРНК c-Jun и снижало экспрессию Bcl-2, индуцированную конканавалином-А. При этом ингибирование экспрессии c-Jun снижало уровень фрагментации ДНК, индуцированной галектином-1 [Rabinovich G.A. et al., 2000]. Позднее, при использовании ингибиторов JNK/c-Jun/AP-1 пути, было доказано, что снижение экспрессии и фосфорилирования антиапоптотического белка Bcl-2, увеличение экспрессии Bad и активация каспазы-9 и -3 при действии галектина-1 обусловлены способностью последнего индуцировать фосфорилирование MKK4, MKK7, JNK и c-Jun киназ, а также активировать транскрипционный фактор AP-1. Используя линию клеток Jurkat 31-13 с дефектом CD3, авторы показали, что активация AP-1 и фрагментация ДНК, индуцированная галектином-1, запускаются через CD3 [Brandt B., 2010]. G. Ion et al. (2005) объяснили выход церамида С и запуск митохондриального пути апоптоза активацией галектином-1 трансдукции сигнала через TCR ζ /Lck/ZAP70 [Ion G. et al., 2005]. На основании результатов этих исследований можно предположить, что проапоптотическое действие галектина-1 связано с передачей активационного сигнала от комплекса TCR-CD3. Влияние галектина-1 на трансдукцию сигнала от TCR объясняется его связыванием с коактиваторами (CD3, CD4, CD7, CD43, CD45 и GM1), что приводит к изменению их кластеризации. Действие рекомбинантного галектина-1 на тимоциты приводило к образованию сегрегированных микродоменов из CD45/CD3 и CD43/CD7 [Hernandez J.D. et al., 2006]. Кроме того, решетка, образованная галектином-1 и гликопротеинами клеточной поверхности, вероятно, влияет на подвижность TCR [Garner O.V., Baum L.G., 2008].

На основании исследования, проведенного на модели активации клеток *in vitro*, можно сделать вывод, что галектин-1 индуцирует апоптоз в CD4⁺-лимфоцитах при действии в момент активации. Выявленная гибель CD4⁺-лимфоцитов носит дозозависимый характер и требует концентрации галектина-1 не менее 2,5 мкг/мл. Механизмы, задействованные в реализации индуцированного галектином-1 апоптоза, связаны с запуском митохондриального пути, что проявляется деполяризацией митохондриальной мембраны, снижением количества антиапоптотического белка Bcl-2 и увеличением проапоптотического белка Bax.

Таким образом, индукция митохондриального пути апоптоза в CD4⁺-лимфоцитах в процессе их активации через CD3 и CD28 является одним из возможных механизмов иммуносупрессорного влияния галектина-1.

4.2 Влияние галектина-1 на дифференцировку CD4⁺-лимфоцитов

Известно, что свойства иммунного ответа (преобладание клеточных или гуморальных реакций, или, напротив, иммуносупрессия) определяются субпопуляционной принадлежностью CD4⁺-лимфоцитов. В настоящее время выделяют такие эффекторные субпопуляции, как Th1, Th2, Th17, Th9 и Tfh, обеспечивающие реакции, направленные на элиминацию патогена. Антагонистическим эффектом обладают субпопуляции регуляторных CD4⁺-лимфоцитов Treg, Tr1, Th3, которые обеспечивают поддержание аутоотолерантности. Специализация CD4⁺-лимфоцитов происходит в результате дифференцировки при действии факторов микроокружения и сигналов от дендритных клеток в процессе активации, воспроизведенной нами на модели *in vitro* с помощью антител к CD3 и CD28.

Суть клеточной дифференцировки составляет стабильная смена спектра экспрессируемых генов при действии транскрипционных факторов,

являющихся конечными продуктами внутриклеточных сигнальных каскадов. В результате взаимодействия транскрипционных факторов с регуляторными участками (промоторами, энхансерами) включается экспрессия генов, определяющих функциональную специализацию и фенотип клеток [Донецкова А.Д. и соавт., 2011]. Уровень экспрессии транскрипционных факторов T-bet, GATA-3, RORc и FoxP3 в мононуклеарных клетках позволяет судить о влиянии заданных условий культивирования на направление дифференцировки CD4⁺-лимфоцитов. Это связано с тем, что данные транскрипционные факторы экспрессируются исключительно в клетках соответствующих субпопуляций (T-bet – в Th1, FoxP3 – в Treg) либо Т-клетки указанного типа являются единственными клетками крови, хотя и не единственными клетками организма, в которых они экспрессируются (GATA-3 – в Th2, RORc – в Th17) [Ярилин А.А., 2010]. Необходимо отметить, что, хотя FoxP3 является отличительным транскрипционным фактором регуляторных Т-лимфоцитов, не все CD4⁺-лимфоциты, обладающие функцией регуляторных клеток, экспрессируют транскрипционный фактор FoxP3.

Нами было проведено исследование экспрессии мРНК транскрипционных факторов основных направлений дифференцировки CD4⁺-лимфоцитов при действии галектина-1 в процессе активации клеток через CD3 и CD28 (модель 1). Дозы галектина-1 выбирались на основании результатов оценки содержания апоптотически измененных клеток. На данном этапе работы использовалась максимальная, не вызывающая гибель клеток концентрация галектина-1 – 1,0 мкг/мл, а также концентрация галектина-1, пограничная с минимальной проапоптотической дозой, – 2,0 мкг/мл.

Модель активации лимфоцитов, дополненная культивированием клеток в течение 72 ч в сочетании со стимуляцией 4-форбол-12-миристан-13-ацетатом (ФМА) и иономицином, позволила получить в контрольной группе

популяцию CD4⁺-лимфоцитов, дифференцированных по пути Th1, что проявлялось экспрессией мРНК TBX21, превышающей экспрессию GATA3, RORC и FOXP3 (рисунок 8). Полученный субпопуляционный состав контрольной группы имеет принципиальное значение, так как, согласно данным литературы, Th1-лимфоциты в условиях избыточной активации являются патогенетическим звеном таких аутоиммунных заболеваний, как ревматоидный артрит и рассеянный склероз [Jäger A., 2009].

При действии галектина-1 направление дифференцировки, заданное нами *in vitro*, менялось в сторону Th2- и регуляторных Т-лимфоцитов (рисунок 8). Добавление галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл одновременно с активирующими антителами приводило к повышению экспрессии мРНК транскрипционных факторов GATA3 и FOXP3. Кратность увеличения при этом составила соответственно 12,4 и 3,0 раза, по сравнению с соответствующими значениями в контрольной группе (рисунок 8).

Данных, объясняющих механизмы влияния галектина-1 на экспрессию транскрипционных факторов дифференцировки CD4⁺-лимфоцитов, в доступной нам литературе найти не удалось. Можно предположить, что связывание галектина-1 с гликопротеинами клеточной поверхности модулирует пути трансдукции сигнала через киназные каскады, запускаемые в лимфоцитах активирующими лигандами. Кроме того, направление дифференцировки, первично заданное действием галектина-1, может поддерживаться за счет последующего подавления реципрокного типа дифференцировки, что характерно для Th1-/Th2-лимфоцитов [Singh R.A. et al., 1999; Chitnis T. et al., 2004]. Принимая во внимание данные об устойчивости Th2-лимфоцитов к апоптоз-индуцирующему действию галектина-1 [Toscano M.A., 2007; Zhuo Y., Bellis S.L., 2011], можно было бы предположить, что наблюдаемое смещение дифференцировки лимфоцитов связано с апоптотической гибелью Th1- и Th17-дифференцированных лимфоцитов. Однако данное объяснение

представляется маловероятным, так как на первом этапе работы было показано, что добавление галектина-1 в дозе 1 мкг/мл не приводило к появлению апоптотически измененных клеток в популяции CD4⁺-лимфоцитов (рисунок 8).

Выявленное неспецифическое снижение экспрессии мРНК транскрипционных факторов в клетках, культивированных с добавлением галектина-1 в дозе 2 мкг/мл, вероятно, связано с гибелью клеток, так как данная доза была близка к проапоптотической (2,5 мкг/мл). Примечательно, что в отличие от мРНК Tbet, RORc и FoxP3, количество мРНК Gata-3, хоть и снижалось по сравнению с действием галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл, но было в 4 раза выше контрольных значений. Наблюдаемый эффект соответствует данным об устойчивости Th2-лимфоцитов к апоптоз-индуцирующему действию галектина-1, связанной с сиалированием гликопротеинов клеточной поверхности [Toscano M.A., 2007; Zhuo Y., Bellis S.L., 2011].

Таким образом, в результате исследования экспрессии мРНК транскрипционных факторов было установлено, что действие галектина-1 на CD4⁺-лимфоциты в процессе их активации в дозах ниже проапоптотической приводит к преобладанию дифференцировки в направлении Th2- и Treg-клеток. Изменяя направление дифференцировки, галектин-1 обладает не просто иммуносупрессорным действием, но и модулирует характер иммунного ответа в соответствии с эффекторными функциями доминирующего типа дифференцировки.

Так как проявлением функциональной активности дифференцированных CD4⁺-лимфоцитов является продукция цитокинов, можно прогнозировать смещение цитокинового профиля культуры в сторону противовоспалительного при действии галектина-1. Подтверждением этого предположения являются данные литературы об изменении уровня про- и противовоспалительных цитокинов, сопровождавшем терапевтические эффекты галектина-1, наблюдаемые на

экспериментальных моделях аутоиммунной патологии *in vivo*. Так, генная доставка галектина-1 снижала уровень IFN- γ и повышала содержание IL-5 в сыворотке крови при экспериментальном коллаген-индуцированном артрите [Rabinovich G.A. et al., 1999]. В экспериментальной модели колита введение рекомбинантного галектина-1 сопровождалось снижением содержания в сыворотке IFN- γ , IL-12 и IL-1 β [Santucci L. et al., 2003]. Кроме того, увеличение количества CD4⁺-лимфоцитов, секретирующих IL-4, IL-5 и IL-10, на фоне снижения количества Th1 лимфоцитов отмечалось на мышах с аутоиммунным диабетом при действии галектина-1 [Perone M.J. et al., 2009].

Нами было исследовано содержание IL-13, IFN- γ , IL-10 и IL-17 в надосадочной фракции культур клеток при действии галектина-1 на модели активации лимфоцитов *in vitro* (модель 1). С целью неспецифической индукции синтеза цитокинов клетки стимулировались с помощью ФМА (форболмиристатацетат) и иономицина. ФМА напрямую активирует протеинкиназу C, а иономицин, являясь ионофором, приводит к повышению внутриклеточного содержания Ca²⁺ [Wang H. et al., 2013]. В результате проведенного исследования установлено, что добавление галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл повышает продукцию IL-13, не оказывая воздействия на уровень IFN- γ , IL-10 и IL-17 (рисунок 9).

Установленное увеличение уровня IL-13 при действии галектина-1, вероятно, связано с продукцией данного цитокина Th2-клетками, что соответствует описанному выше повышению экспрессии мРНК транскрипционного фактора дифференцировки Th2 лимфоцитов GATA-3. Так как IL-13 является противовоспалительным цитокином, угнетающим функции макрофагов, в том числе в результате блокирования образования провоспалительных цитокинов, а также молекул окиси азота [Martinez-Nunez R.T. et al., 2011], повышение его продукции при действии галектина-1 может объяснять терапевтическое значение последнего при аутоиммунных процессах в результате снижения повреждения тканей макрофагами. Вместе

с тем, IL-13, стимулируя секрецию иммуноглобулинов (IgG1 и IgGE) плазматическими клетками, играет ведущую роль в патогенезе аллергических заболеваний [Mitchell J. et al., 2010]. Однако данные об иммунорегуляторном значении галектина-1 при аллергических заболеваниях в литературе отсутствуют. Экспрессия IL-13 в Th2-лимфоцитах связана с трансдукцией сигнала через STAT6 и активацией транскрипционного фактора Gata3 [Smeets R.L. et al., 2012]. Помимо Th2-лимфоцитов, клетками-продуцентами IL-13 в культуре мононуклеаров могли стать NK-клетки. Сведений о влиянии галектина-1 на NK-клетки в литературе также не обнаружено, что не позволяет подтвердить или опровергнуть данную гипотезу. Другие клетки, способные секретировать IL-13 – эозинофилы и базофилы, не могли внести вклад в уровень продукции IL-13. Используемый нами протокол для выделения клеток на градиенте плотности фиколла 1,077 позволяет получить фракцию мононуклеаров, лишенную гранулоцитов, что было подтверждено при проведении исследования с использованием проточного цитометра в результате анализа распределения клеток по FSC и SSC.

Отсутствие изменений количества IL-10 и IFN- γ в надосадочной фракции культур мононуклеарных клеток при добавлении галектина-1 противоречит ожидаемым результатам, а также результатам, полученным другими исследователями. Известно, что IFN- γ является провоспалительным цитокином, секретлируемым Th1-клетками, а IL-10, напротив, противовоспалительным цитокином как Th2-клеток, так и регуляторных T-лимфоцитов, особенно Tr1-клеток. Учитывая установленное при действии галектина-1 снижение экспрессии транскрипционного фактора дифференцировки Th1-клеток и увеличение экспрессии транскрипционных факторов дифференцировки Th2-клеток и регуляторных T-лимфоцитов (рисунок 5), можно прогнозировать снижение продукции IFN- γ на фоне увеличения продукции IL-10. Известно, что IFN- γ

активирует микробицидную активность макрофагов, а IL-10, напротив, ингибирует активность макрофагов, в том числе их функционирование в роли антигенпрезентирующих клеток и функцию дендритных клеток [Moore K.W. et al., 2001]. В связи с этим, изменение уровня секреции IFN- γ и IL-10 позволило бы объяснить улучшение течения аутоиммунных заболеваний, наблюдаемое на экспериментальных моделях *in vivo* при действии галектина-1, снижением активности макрофагов в результате влияния галектина-1 на продукцию CD4⁺-лимфоцитами IFN- γ и IL-10. Кроме того, данные цитокины участвуют в реципрокном отношении Th1- и Th2-клеток; так, IFN- γ ингибирует Th2-путь иммунного ответа, а IL-10 – функцию Th1-лимфоцитов, что может усиливать эффект галектина-1 на дифференцировку CD4⁺-лимфоцитов.

Действительно, повышение продукции IL-10 на фоне снижения продукции IFN- γ при действии галектина-1 описано в работах C.C. Motran et al. [2008] и S.R. Stowell et al. [2008]. Стоит отметить, что выбор условий культивирования вносит весомый вклад в результаты исследования цитокин-секретирующей активности Т-лимфоцитов при действии галектина-1. Например, в отличие от выбранных нами условий культивирования, S.R. Stowell et al. [2008] не добавляли в среду культивирования мононуклеарных клеток фоболмиристатацетат и иономицин [Stowell S.R. et al., 2008]. При этом известно, что иономицин способен индуцировать анергию, в результате чего может происходить искажение результатов исследования цитокиновой продукции [Heissmeyer V. et al., 2004]. В исследовании C.C. Motran et al. (2008) клетки были предварительно дифференцированы в направлении Th2 с помощью IL-4, IL-2 и антител к IFN- γ , в направлении Th1-лимфоцитов – с помощью IL-12, IL-2 и антител к IL-4. Было показано также увеличение продукции IL-5 и IL-4 и снижение продукции IL-2 при действии галектина-1 [Motran C.C. et al., 2008]. Напротив, van der Leij J. et al. [2007] показали, что при действии

на моноклеарные клетки, активированные с помощью антител к CD3 α без дополнительных стимулов, галектин-1 не вызывает изменения уровня IL-4 и IL-5, также как и IL-13 и IL-12p70. При этом выявленное ими снижение количества IL-2 и IFN- γ носило недостоверный характер. Интересным, на наш взгляд, является наблюдение van der Leij J. et al. [2007] о том, что повышение продукции IL-10, индуцированное галектином-1, имеет более выраженный характер при добавлении рекомбинантного белка к цельной культуре моноклеарных клеток, чем к отдельным популяциям CD4⁺-, CD8⁺-лимфоцитов и моноцитов. На основании данных результатов был сделан вывод о том, что межклеточные взаимодействия вносят значимый вклад в способность галектина-1 индуцировать секрецию IL-10 [van der Leij J. et al., 2007].

Несмотря на отсутствие в литературе данных о влиянии галектина-1 на продукцию провоспалительного цитокина Th17-клеток IL-17 (IL-17A), исходя из снижения экспрессии транскрипционного фактора дифференцировки Th17-клеток, нами была высказана гипотеза о снижении его продукции под действием галектина-1. Учитывая способность IL-17 индуцировать продукцию цитокинов (TNF, IL-1 β , IL-6, GM-CSF, G-CSF), хемокинов (CXCL1, CXCL8, CXCL10) и металлопротеиназ другими клетками, а также активировать нейтрофилы, снижение количества данного цитокина можно было бы рассматривать как механизм противовоспалительного эффекта галектина-1 [Korn T. et al., 2009]. Однако полученные нами результаты не позволяют сделать заключение о способности галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл угнетать продукцию IL-17.

При действии галектина-1 в дозе 2,0 мкг/мл было установлено снижение продукции IL-13, IL-17 и IL-10, связанное, вероятно, с запуском программированной клеточной гибели (см. рисунок 9). Так, при добавлении галектина-1 в дозе 2,5 мкг/мл регистрировалось значимое увеличение количества апоптотически измененных клеток. Данное предположение

подтвердилось снижением всех исследованных транскрипционных факторов при добавлении галектина-1 в дозе 2,0 мкг/мл. Установленное повышение секреции IFN- γ при действии галектина-1 в дозе 2,0 мкг/мл может быть обусловлено усилением продукции данного цитокина клетками, отличными от Th1, в том числе NK-клетками, при действии IL-13, что является одним из его биологических эффектов, а также регуляторными T-лимфоцитами с фенотипом Tr1.

Таким образом, было установлено увеличение продукции противовоспалительного цитокина IL-13 и экспрессии транскрипционных факторов Th2- и Treg-клеток на фоне снижения экспрессии транскрипционных факторов Th1- и Th17-клеток при действии галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл. Так как экспрессия транскрипционных факторов является более специфичным показателем дифференцировки клеток, можно сделать вывод, что галектин-1 в процессе активации смещает дифференцировку в направлении Th2- и Treg-клеток. Полученные результаты впервые описывают влияние галектина-1 на дифференцировку CD4⁺-лимфоцитов и позволяют сделать заключение о роли модуляции дифференцировки CD4⁺-лимфоцитов в механизмах иммунорегуляторного действия галектина-1.

Согласно описанным выше результатам, характеризующим способность галектина-1 обеспечивать супрессию дифференцировки CD4⁺-лимфоцитов в направлении Th1 и Th17, можно предположить, что недостаточность контроля, опосредованного галектином-1, является звеном патогенеза ревматоидного артрита, для которого характерна избыточная активность Th1- и Th17-лимфоцитов [Gaffen S.L., 2009; Sarkar S. et al., 2010; Chou E., 2012]. Данное предположение подтверждается терапевтической эффективностью галектина-1, наблюдаемой на экспериментальной модели ревматоидного артрита *in vivo* [Wang A.L. et al., 2010].

Согласно данным Центра по контролю и профилактике заболеваний США (CDC), ревматоидный артрит диагностирован приблизительно у

1,5 млн человек, являясь при этом причиной инвалидизация в 80% случаев [Singh J.A., Cameron D.R., 2012]. Исследования иммунологических основ патогенеза ревматоидного артрита привели к появлению новых препаратов, относимых к биотерапии. Примером являются препараты, нацеленные на ингибирование $TNF\alpha$, антитела к рецептору IL-6, а также антитела к В-лимфоцитам (BCDT, B cell depletion therapy), находящиеся на стадии клинических исследований [Simsek I., 2011; Ferraccioli G. et al., 2012; Navarro-Millán I. et al., 2012].

Причинами нарушения галектин-1-опосредованной регуляции баланса $CD4^+$ -лимфоцитов могут явиться генетически обусловленные или приобретенные нарушения экспрессии галектина-1, конформационные изменения белковой молекулы, а также нарушения на уровне гликопротеинов, связывающих галектин-1, и последующих сигнальных каскадов. В связи с этим следующим этапом нашей работы (клинический блок) явилось исследование, направленное на оценку экспрессии мРНК галектина-1 в мононуклеарных клетках при ревматоидном артрите.

В проведенном нами исследовании у пациентов с ревматоидным артритом было выявлено снижение экспрессии мРНК галектина-1 (рисунок 12). Учитывая важную роль галектина-1 в регуляции иммунного ответа, сниженный уровень экспрессии мРНК галектина-1 может рассматриваться в качестве патогенетического фактора развития данного аутоиммунного заболевания.

Факт снижения экспрессии галектина-1 был установлен при иных патологических процессах. Так, De la Fuente H. et al. (2012) установили снижение экспрессии галектина-1 в клетках Лангерганса, дендритных клетках кожи и $CD11c(+)$ дендритных клетках периферической крови у пациентов с псориазом [de la Fuente H. et al., 2012].

Дальнейшие исследования позволят оценить галектин-1 как маркер предрасположенности к аутоиммунным заболеваниям, а также станут

критерием целесообразности введения галектина-1 в иммунокорректирующую терапию заболеваний.

4.3 Влияние галектина-1 на дифференцированные *in vitro* регуляторные CD4⁺-лимфоциты

Описанные выше результаты отражают влияние галектина-1 на CD4⁺-лимфоциты в процессе их активации. Иммунорегуляторное действие галектина-1 может также реализовываться на этапе дифференцированных CD4⁺-лимфоцитов, при этом, в результате изменения профиля гликозилирования клеточной поверхности чувствительность клеток меняется в зависимости от субпопуляционной принадлежности, что, вероятно, лежит в основе селективности иммунорегуляторного действия галектина-1. Нами было исследовано влияние галектина-1 на дифференцированные регуляторные Т-лимфоциты (модель 2), являющиеся основными клетками, обеспечивающими «периферические» механизмы ауто толерантности.

Для создания модели дифференцированных регуляторных Т-лимфоцитов *in vitro* были подобраны условия культивирования, позволяющие получить максимальное содержание клеток с фенотипическими признаками данной субпопуляции. Анализ литературы показал, что необходимыми условиями дифференцировки Treg лимфоцитов *in vitro* являются активация антителами к CD3, CD28 и наличие в среде IL-2 и TGF-β1 [Фрейдлин И.С., 2005; Курганова Е.В. и соавт., 2008]. В результате оценки содержания лимфоцитов с фенотипами CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻ и CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, клеточности культуры и жизнеспособности клеток было установлено, что оптимальная концентрация в среде IL-2 и TGF-β1 составляет 10 и 20 нг/мл, соответственно (таблица 5). Данные условия культивирования позволяют получить максимальный выход регуляторных

Т-лимфоцитов, суммарное количество $CD4^+CD25^+$ клеток при этом достигает 95,9(89,1 – 99,9)%. Согласно данным литературы, к регуляторным $CD4^+CD25^+$ лимфоцитам относятся как $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ клетки, так и $CD4^+CD25^+FoxP3^-$ клетки, включающие Tr1 и Th3. Отличительной чертой регуляторных Т-лимфоцитов принято считать высокую экспрессию активационного маркера CD25, который также экспрессируется и на клетках других субпопуляций $CD4^+$ -лимфоцитов, однако, на низком уровне. Полученные в результате выбранных условий культивирования $CD4^+CD25^+$ клетки характеризовались высокой экспрессией CD25, т.е. фенотип клеток эксперимента был $CD4^+CD25^{high}$ (рисунок 13). Таким образом, дальнейшее исследование влияния галектина-1 на дифференцировку и функциональную активность клеток было выполнено на культуре регуляторных Т-лимфоцитов.

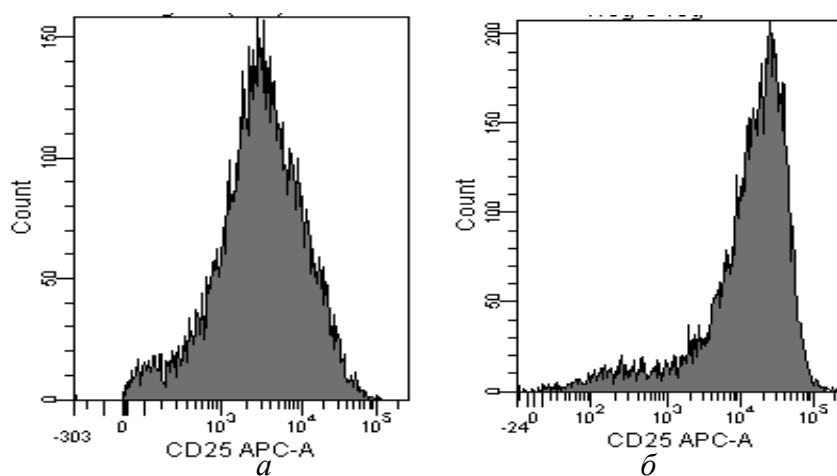


Рисунок 13. Гистограммы интенсивности свечения $CD25^+$ -клеток при флуоресцентном окрашивании: а – гистограмма, характерная для $CD25^{low}$; б – гистограмма, характерная для $CD25^{high}$, отмечается смещение пика по оси абсцисс вправо.

Влияние галектина-1 на распределение $CD4^+$ -лимфоцитов по фенотипу оказалось разнонаправленным в зависимости от времени добавления рекомбинантной формы.

Так, добавление галектина-1 в первый день культивирования как в дозе 0,5 мкг/мл, так и в дозе 1,0 мкг/мл приводило к перераспределению регуляторных Т-лимфоцитов в сторону $CD4^+CD25^+FoxP3^-$ на фоне

повышения $CD4^+CD25^-FoxP3^-$ лимфоцитов (таблица 6). Противоположные результаты были получены P. Juszczynski et al. [2007] в ходе исследования роли галектина-1 в иммуносупрессии при Ходжкинской лимфоме. Авторы показали, что добавление на 1-е сут галектина-1 в культуру Т-лимфоцитов здоровых доноров одновременно с активирующими антителами приводило к значительной экспансии $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ -клеток [Juszczynski P. et al., 2007]. При этом условия культивирования, использованные P. Juszczynski et al. [2007], отличались от выбранных нами отсутствием добавления IL-2 и TGF- β 1, в результате чего клетки сравнения в данном исследовании не были дифференцированы *in vitro* в направлении регуляторных Т-лимфоцитов, что вероятно, является причиной расхождения результатов.

В культурах с добавлением галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл на 3-й день происходило повышение содержания $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ клеток (таблица 7). Полученные результаты свидетельствуют о том, что действие галектина-1 на еще недифференцированные клетки в комбинации с IL-2 и TGF- β 1 подавляет экспрессию транскрипционного фактора FoxP3. Вероятно, через 72 ч в условиях направленной дифференцировки свойства клеток культуры меняются, в результате чего действие галектина-1 реализуется через сигнальные пути, поддерживающие экспрессию FoxP3. Таким образом, предварительно дифференцированные клетки реагируют на действие галектина-1 смещением популяционного состава культуры в сторону $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ клеток, однако, они не чувствительны к дозам галектина-1 менее 1,0 мкг/мл в отличие от клеток на начальной стадии дифференцировки.

Зарегистрированное нами увеличение количества $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ клеток при добавлении галектина-1 через 72 ч к предварительно дифференцированным клеткам (таблица 7), а также повышение экспрессии мРНК транскрипционного фактора FoxP3 при действии галектина-1 в клетках, культивированных в отсутствие рекомбинантных цитокинов

(рисунок 8), свидетельствует о способности галектина-1 направлять дифференцировку клеток по пути Treg лимфоцитов, экспрессирующих FoxP3.

Нами исследовано содержание белка транскрипционного фактора FoxP3 в клетках, культивированных в условиях направленной дифференцировки в регуляторные T-лимфоциты, при добавлении галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл. В данном исследовании галектин-1 повышал количество белка транскрипционного фактора FoxP3 в 2 раза (рисунок 11), что соответствовало результатам исследования экспрессии мРНК и относительного содержания клеток с фенотипом CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. Экспрессия FoxP3 является важным фактором иммуносупрессорного действия регуляторных T-лимфоцитов. Несмотря на наличие регуляторных свойств у Tr1- и Th3-клеток, не экспрессирующих FoxP3, основной их эффекторный механизм заключается в продукции цитокинов IL-10 и TGF-β1 [Gol-Ara M. et al., 2012]. При этом контактные механизмы супрессии активности эффекторных клеток характерны для FoxP3-экспрессирующих лимфоцитов. Значимость транскрипционного фактора FoxP3 в поддержании аутоотолерантности подтверждается данными о роли дефекта FoxP3 в развитии иммуноопосредованных заболеваний, полиэндокринопатии, энтеропатии и IPЕХ синдрома [Ziegler S.F., Buckner J.H., 2006].

Функциональную активность регуляторных лимфоцитов *in vitro* можно оценивать по выраженности ингибирования пролиферации эффекторной популяции клеток в эксперименте с сокультивированием, а также по уровню продукции эффекторных молекул. Нами было исследовано содержание перфорины в лизатах клеток, культивированных в условиях направленной дифференцировки при добавлении галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл через 72 ч. Проведенное исследование выявило увеличение содержания перфорины в клетках под действием галектина-1 (рисунок 11). Перфорин обеспечивает пермеабиллизацию мембраны клеток-мишеней с

последующим цитолизом или гранзим-индуированным апоптозом, обеспечивая тем самым контактный механизм иммуносупрессорного действия регуляторных Т-лимфоцитов [Keefe D. et al., 2005]. Установленное повышение продукции перфорина при действии галектина-1 можно рассматривать в качестве механизма реализации как защитного действия данного лектина, так и патогенетического. W.J. Grossman et al. (2004) обнаружили, что регуляторные Т-лимфоциты индуцируют гибель аутореактивных эффекторных клеток по перфорин-зависимому механизму [Grossman W.J. et al., 2004]. Вместе с тем, Cao X. et al. (2007) установили роль перфорина в ингибировании противоопухолевого иммунитета путем гибели цитотоксических Т-лимфоцитов и NKT клеток [Cao X. et al., 2007].

Первичной мишенью для галектина-1 на Treg-клетках, согласно данным литературы, является ганглиозид GM1, связывание которого галектином-1 приводит к активации канонического TRPC5 канала (canonical transient receptor potential channel) и супрессии аутоиммунного воспаления в нервной ткани [Wang J. et al., 2009].

Кроме того, галектин-1 экспрессируется самими регуляторными клетками и является молекулой их эффекторного действия. M.I. Garín et al. (2007) обнаружили, что галектин-1 экспрессируется в CD4⁺CD25⁺-лимфоцитах, при этом добавление антител к галектину-1 ингибировало антипролиферативное действие CD4⁺CD25⁺ на CD4⁺CD25⁻-клетки [Garín M.I. et al., 2007].

Выявленные на модели *in vitro* повышение количества CD4⁺CD25⁺-лимфоцитов, экспрессирующих FoxP3, увеличение количества транскрипционного фактора и продукции перфорина при действии галектина-1 на дифференцированные клетки свидетельствуют о том, что иммунорегуляторное действие данного представителя семейства лектинов включает поддержание регуляторного фенотипа уже дифференцированных CD4⁺-лимфоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее диссертационное исследование, основанное на моделях активации лимфоцитов и дифференцировки в регуляторные Т-клетки, созданных *in vitro*, было направлено на идентификацию механизмов регуляции баланса CD4⁺-лимфоцитов при действии галектина-1. Процесс галектин-1-опосредованной кооперации клеток может иметь место на этапах селекции лимфоцитов в тимусе и распознавания антигена на дендритных клетках и макрофагах, а также в очаге опухолевого роста.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что, действуя на CD4⁺-лимфоциты в процессе активации через CD3 и CD28, галектин-1 индуцирует митохондриальный путь реализации апоптоза и направляет дифференцировку клеток по пути Th2- и Treg-лимфоцитов (рисунок 14). Выявленные изменения направлений дифференцировки CD4⁺-лимфоцитов при действии галектина-1 позволяют рассматривать эффекты данного белка не только с точки зрения иммуносупрессии. Так, на основании полученных *in vitro* результатов можно ожидать эффекторные реакции Th2-типа, т.е. запуск гуморального иммунного ответа, а также реципрокное подавление реакций Th1-типа в случае влияния галектина-1 на CD4⁺-лимфоциты в процессе распознавания антигена. Особое значение имеет выявленное потенцирующее влияние галектина-1 на регуляторное звено иммунного ответа, заключающееся в экспансии функционально активных экспрессирующих FoxP3 регуляторных CD4⁺-лимфоцитов, обеспечивающих поддержание аутоотолерантности.

Установленные в данной диссертационной работе особенности влияния галектина-1 на апоптоз и дифференцировку CD4⁺-лимфоцитов могут иметь как физиологическое, так и патогенетическое значение. С одной стороны, индуцируя апоптоз и направляя дифференцировку CD4⁺-лимфоцитов по пути Th2- и Treg-клеток, галектин-1 может обеспечивать

ауторегуляцию, направленную на предотвращение избыточной активации иммунных реакций и защиту здоровых тканей от иммуно-опосредованного повреждения. Следуя данной логике, нарушения галектин-1-опосредованной регуляции баланса CD4⁺-лимфоцитов могут представлять собой звено патогенеза аутоиммунных заболеваний. Причиной такой дисрегуляции может служить снижение экспрессии мРНК галектина-1, выявленное нами на примере ревматоидного артрита. Данное предположение подтверждается терапевтическим эффектом галектина-1, показанным на различных экспериментальных моделях заболеваний, имеющих аутоиммунный генез (миастения Гравис, энцефаломиелит, артрит, гепатит, болезнь трансплантат против хозяина, увеит и диабет). В связи с этим, генная или белковая, например в рекомбинантной форме, доставка галектина-1, а также использование его в культуральных условиях для получения регуляторных Т-лимфоцитов *in vitro* может рассматриваться в качестве основы для разработки новых подходов терапии аутоиммунных заболеваний.

С другой стороны, гибель CD4⁺-лимфоцитов, а также экспансия регуляторных Т-лимфоцитов при действии галектина-1, секретируемого опухолевыми клетками и клетками опухолевого микроокружения, может способствовать опухолевой прогрессии в результате иммуносупрессии. Учитывая описанную в литературе способность опухолевых клеток различного происхождения (Ходжкинской лимфомы, гепатоцеллюлярной карциномы, рака молочной железы, желудка, легких и новообразований других локализаций) секретировать галектин-1, данный лектин может рассматриваться в качестве терапевтической мишени. В этом случае угнетение функции галектина-1, например, с помощью антител или специфических ингибиторов, позволит предотвратить гибель CD4⁺-лимфоцитов, что является необходимым компонентом противоопухолевой терапии.

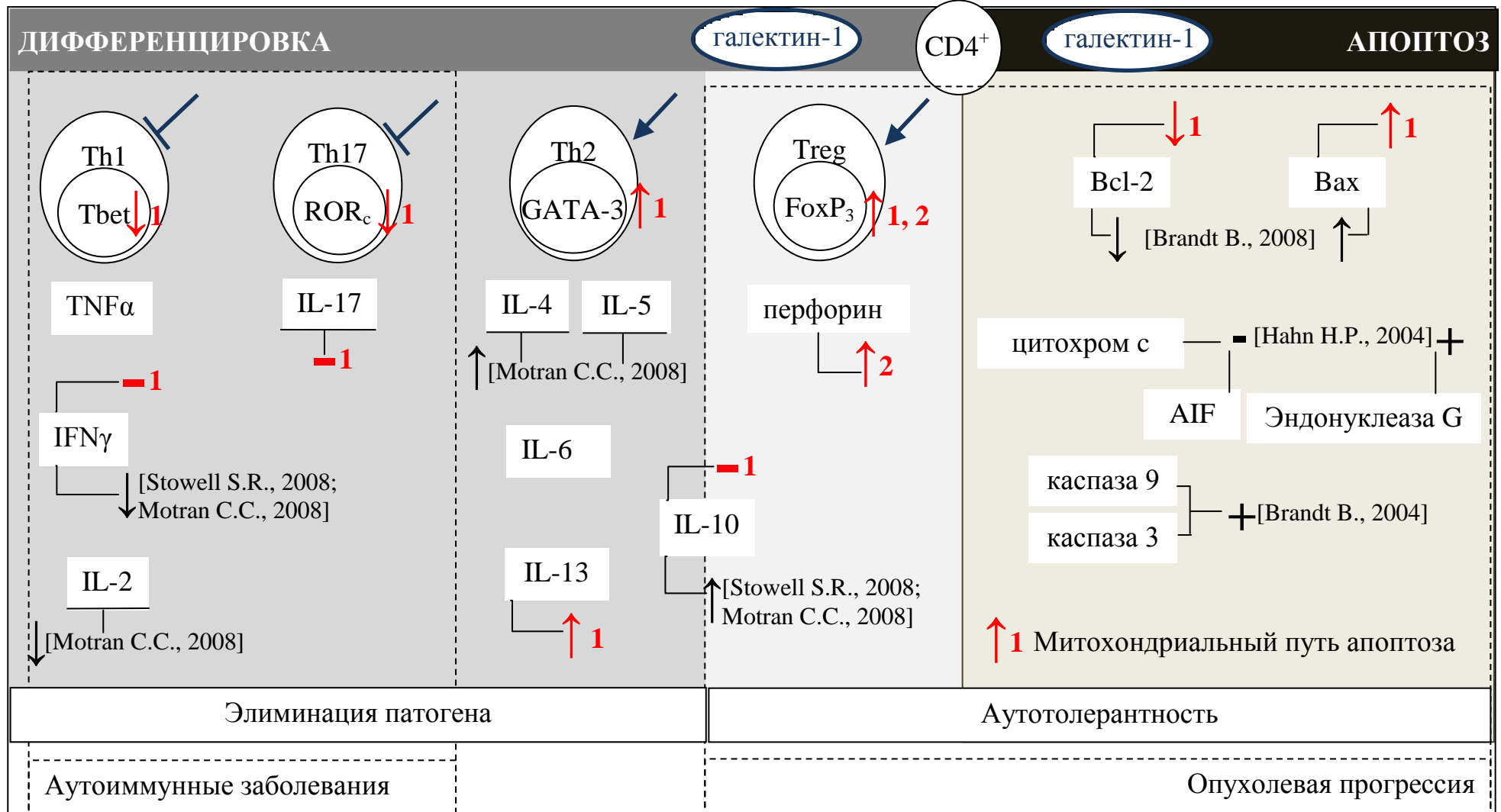


Рисунок 14. Влияние галактина-1 на дифференцировку и апоптоз CD4⁺-лимфоцитов по результатам собственных исследований (выделено красным цветом: 1 – результаты, полученные на модели активации лимфоцитов, 2 – результаты, полученные на модели клеток, дифференцированных в направлении регуляторных Т-лимфоцитов), а также по данным литературы.

ВЫВОДЫ:

1. Галектин-1 оказывает дозозависимое действие на CD3/CD28-активированные лимфоциты, повышая содержание апоптотически измененных CD4⁺-лимфоцитов при добавлении в культуральную среду в концентрациях от 2,5 до 4,0 мкг/мл.

2. Апоптоз активированных лимфоцитов, индуцированный галектином-1, реализуется через запуск митохондриального пути: действие рекомбинантного галектина-1 в проапоптотических дозах сопровождается деполяризацией митохондриальной мембраны, снижением количества антиапоптотического белка Bcl-2 и увеличением содержания проапоптотического белка Bax.

3. Галектин-1 при действии *in vitro* в дозе 1,0 мкг/мл на активированные CD4⁺-лимфоциты направляет дифференцировку клеток по пути Th2- и Treg-лимфоцитов, что проявляется повышением экспрессии мРНК транскрипционных факторов GATA-3 и FoxP3 и увеличением продукции IL-13 на фоне снижения содержания мРНК Tbet и RORc.

4. При патологии, характеризующейся дисрегуляцией дифференцировки CD4⁺-лимфоцитов (на примере ревматоидного артрита), имеет место сниженная экспрессия мРНК галектина-1.

5. Действие *in vitro* галектина-1 в дозе 1,0 мкг/мл на дифференцированные регуляторные T-лимфоциты приводит к экспансии клеток с фенотипом CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, а также увеличению внутриклеточного содержания фактора FoxP3 и цитолитического белка перфорина, определяющих иммуносупрессорные свойства данной субпопуляции клеток.

Список использованных сокращений

7ААД – 7-аминоактиномицина D;

АГ – антиген;

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота;

ФМА – 4-форбол-12-миристан-13-ацетата;

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат;

ЯМР – томография - магнитно-резонансная томография;

АРС – аллофикоцианин;

BCR – В-клеточный рецептор;

CD – кластер дифференцировки (cluster of differentiation);

FITC – флуоресцеин изотиоцианат;

GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа;

IFN γ – интерферон-гамма;

IL – интерлейкин;

JC-1 – 5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолилкарбоцианин
йодид;

MHC – главный комплекс гистосовместимости;

PE – фикоэритрин;

RT-PCR – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией;

TCR – Т-клеточный рецептор;

TGB – трис-глициновый буфер;

TGF- β 1 – трансформирующий ростовой фактор, бета-1;

Th – Т-хелпер;

TNF α – фактор некроза опухоли альфа;

Treg – регуляторные Т-лимфоциты;

TTBS – раствор Трис буфера с Твин 20

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акинфиева, О.В. Роль субпопуляции естественных регуляторных CD4+CD25+ Т-клеток в норме и при патологии / О.В. Акинфиева, Л.Н. Бубнова // Медицинский академический журнал. – 2010. – Т. 10, № 2. – С. 5-16.
2. Бережная, Н.М. Биологические эффекты интерлейкина-2 и перспективы его использования в иммунотерапии злокачественных новообразований / Н.М. Бережная, Б.А. Горецкий // Эксперим. онкология. – 1989. – Т. 11, № 6. – С. 38-44.
3. Быковская, С.Н. Анализ Т-регуляторных клеток CD4+CD25+FoxP3+ при аутоиммунных заболеваниях // С.Н. Быковская, А.В. Карасев, А.В. Лохонина и соавт. // Молекулярная медицина. – 2013. – № 3. – С.20-28.
4. Гольдберг, Е.Д. Методы культуры тканей в гематологии / Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, В.П. Шахов // Томск: Изд-во Том. ун-та, 1992. - 272 с.
5. Донецкова, А.Д. Экспрессия генов транскрипционных факторов, контролирующих дифференцировку адаптивных субпопуляций CD4+ Т-лимфоцитов, в покоящихся и активированных лимфоцитах у здоровых людей / А.Д. Донецкова, М. Ф. Никонова, А. А. Ярилин // Иммунология. – 2011. - № 4. - С.184-188
6. Клиническая ревматология (руководство для врачей) / под ред. В.И. Мазурова. — 2-е изд., перераб. и доп. — СПб.: ООО "Издательство ФОЛИАНТ", 2005. — 520 с.
7. Кологривова, И.В. Молекулярные аспекты функционирования Т-хелперов 17-го типа. И.В. Кологривова, Е.Н. Кологривова, Т.Е. Суслова // Бюлл. сибирской медицины. – 2011. – Т. 10, №4. – С. 93-98.
8. Кудрявцев, И.В. Современные методы и подходы к изучению апоптоза в экспериментальной биологии / И.В. Кудрявцев, А.С. Головкин,

- А.В. Зурочка и соавт. // Медицинская иммунология.- 2012.- Т.14, № 60. – С. 461-482.
9. Куклина, Е.М. Молекулярные механизмы Т-клеточной анергии / Е.М. Куклина // Биохимия. – 2013. – Т. 78, № 2. – С. 204-219.
10. Курганова, Е.В. Генерация в культуре *in vitro* и характеристика регуляторных Т-клеток человека / Е.В. Курганова, Е.Я. Шевела, М.А. Тихонова // Медицинская иммунология. – 2008. – Т. 10, № 2-3. – С. 173-180.
11. Лунев, Д.А. Роль апоптоза в поддержании гомеостаза живых систем // Д.А. Лунев, Л.В. Заклякова, Е.Г. Овсянникова и соавт. // Астраханский медицинский журнал. – 2010. – Т. 5, № 1. – С. 11-20.
12. Натвиг, Дж.Б. Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика / Дж.Б. Натвиг, П. Перлманн, Х. Визгель. – М.: Медицина, 1980. – 280 с.
13. Потапнев, М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами / М.П. Потапнев // Иммунология. – 2002. – № 4. – С. 237.
14. Симбирцев, А.С. Цитокины: классификация и биологические функции / А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2004. – Т.3, №2. – С. 16-21.
15. Фрейдлин, И.С. Регуляторные Т-клетки: происхождение и функции / И.С. Фрейдлин // Медицинская иммунология. – 2005. – Т. 7, № 4. – С. 347-354.
16. Хайдуков, С. В. Подходы к стандартизации метода проточной цитометрии для иммунофенотипирования. Настройка цитометров и подготовка протоколов для анализа / С. В. Хайдуков // Медицинская иммунология . — 2007 . — Т. 9, № 6 . — С. 569-574 .
17. Чердынцева, Н.В. Цитокины в патогенезе злокачественных новообразований / Н.В. Чердынцева // Цитокины и воспаление – 2005. – Т4., №2. – С. 103-106.

18. Черешнев, В.А. Фармакологическое регулирование программированной гибели клеток: монография / В.А. Черешнев. – СПб.: Наука, 2011. – 255 с.
19. Ярилин, А.А. Транскрипционные регуляторы дифференцировки Т-хелперов / А.А. Ярилин // Иммунология. – 2010. – № 3. – С. 153-168.
20. Acosta-Rodriguez, E.V. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells / E.V. Acosta-Rodriguez, L. Rivino, J. Geginat et al. // Nat. Immunol. – 2007. – Vol. 8, № 6. – P. 639-646.
21. Adeegbe, D.O. Natural and induced T regulatory cells in cancer [Electronic resource] / D.O. Adeegbe, H. Nishikawa // Front Immunol. – 2013. – Vol. 4, № 190. – Access mode: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3708155/>.
22. Aggarwal, S. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family / S. Aggarwal, A.L. Gurney // J. Leukoc. Biol. – 2002. – Vol. 71, № 1. – P. 1-8.
23. Almkvist, J. Activation of the neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase by galectin-1 / J. Almkvist, C. Dahlgren, H. Leffler et al. // J. Immunol. – 2002. – Vol. 168, № 8. – P. 4034-4041.
24. Alvarado-Sanchez, B. Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus / B. Alvarado-Sanchez, B. Hernandez-Castro, D. Portales-Perez et al. // J Autoimmun. – 2006. – Vol. 27, № 2. – P 110-118.
25. Amano, M. The ST6Gal I sialyltransferase selectively modifies N-glycans on CD45 to negatively regulate galectin-1-induced CD45 clustering, phosphatase modulation, and T cell death / M. Amano, M. Galvan, J. He et al. // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278, № 9. – P. 7469-7475.
26. Ando, D.G. Encephalitogenic T cells in the B10.PL model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) are of the Th-1 lymphokine subtype / D.G. Ando, J. Clayton, D. Kono et al. // Cell Immunol. – 1989. – Vol. 124, № 1. – P. 132-143.

27. Anginot, A. Galectin 1 modulates plasma cell homeostasis and regulates the humoral immune response / A. Anginot, M. Espeli, L. Chasson et al. // *J. Immunol.* – 2013. – Vol. 190, № 11. – P. 5526-5533.
28. Angkasekwinai, P. Regulation of IL-9 expression by IL-25 signaling / P. Angkasekwinai, S.H. Chang, M. Thapa et al. // *Nat Immunol.* – 2010. – Vol. 11, № 3. – P. 250-256.
29. Auvynet, C. Galectin-1 promotes human neutrophil migration / C. Auvynet, S. Moreno, E. Melchy et al. // *Glycobiology.* – 2013. – Vol. 23, № 1. – P. 32-42.
30. Awasthi, A. Cutting edge: IL-23 receptor gfp reporter mice reveal distinct populations of IL-17-producing cells / A. Awasthi, L. Riol-Blanco, A. Jäger et al. // *J Immunol.* – 2009. – Vol. 182, № 10. – P. 5904-5908.
31. Bai, F. Chimeric anti-IL-17 full-length monoclonal antibody is a novel potential candidate for the treatment of rheumatoid arthritis / F. Bai, H. Tian, Z. Niu et al. // *Int. J. Mol. Med.* – 2014. – Vol. 33, № 3. – P. 711-721.
32. Barrionuevo, P. A novel function for galectin-1 at the crossroad of innate and adaptive immunity: galectin-1 regulates monocyte/macrophage physiology through a nonapoptotic ERK-dependent pathway / P. Barrionuevo, M. Beigier-Bompadre, J.M. Ilarregui et al. // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 178, № 1. – P.436-445.
33. Batten, M. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells / M. Batten, J. Li, S. Yi et al. // *Nat Immunol.* – 2006. – Vol. 7, № 9. – P. 929-936.
34. Baum, L.G. Amelioration of graft versus host disease by galectin-1 / L.G. Baum, D.P. Blackall, S. Arias-Magallano et al. // *Clin. Immunol.* – 2003. – Vol. 109, № 3. – P. 295-307.
35. Bennett, C.L. IPEX is a unique X-linked syndrome characterized by immune dysfunction, polyendocrinopathy, enteropathy, and a variety of

autoimmune phenomena / C.L. Bennett, H.D. Ochs // *Curr Opin Pediatr.* – 2001. – Vol. 13, № 6. – P. 533-538.

36. Bettelli, E. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells / E. Bettelli, Y. Carrier, W. Gao et al. // *Nature.* – 2006. – Vol. 441, № 7090. – P. 235-238.

37. Bettelli, E. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity / E. Bettelli, M. Oukka, V.K. Kuchroo // *Nat. Immunol.* – 2007. Vol. 8, № 4. – P. 345-350.

38. Blois, S.M. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance / S.M. Blois, J.M. Ibarregui, M. Tometten et al. // *Nat. Med.* – 2007. – Vol. 13, № 12. – P.1450-1457.

39. Bodor, J. Cyclic AMP underpins suppression by regulatory T cells / J. Bodor, T. Bopp, M. Vaeth et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2012. – Vol. 42, № 6. – P. 1375-1384.

40. Bopp, T. Inhibition of cAMP degradation improves regulatory T cell-mediated suppression / T. Bopp, N. Dehzad, S. Reuter et al. // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 182, № 7. – P. 4017-4024.

41. Brandt, B. Role of the JNK/c-Jun/AP-1 signaling pathway in galectin-1-induced T-cell death [Electronic resource] / B. Brandt, E.F. Abou-Eladab, M. Tiedge et al. // *Cell Death and Disease.* – 2010. – Vol. 1. – Access mode: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3032336/>.

42. Bratton, S.B. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome / S.B. Bratton, G.S. Salvesen // *J. Cell. Sci.* – 2010. – Vol. 123, № 19. – P. 3209-3214.

43. Brunkow, M.E. Disruption of a new forkhead / winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse / M.E. Brunkow, E.W. Jeffery, K.A. Hjerrild et al. // *Nat. Genet.* – 2001. – Vol. 27, № 1. – P. 68-73.

44. Call, M.E. Common themes in the assembly and architecture of activating immune receptors / M.E. Call, K.W. Wucherpfennig // *Nat. Rev. Immunol.* – 2007. – Vol. 7, № 11. – P. 841-850.
45. Cao, X. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance / X. Cao, S.F. Cai, T.A. Fehniger et al. // *Immunity.* – 2007. – Vol. 27, № 4. – P. 635-646.
46. Cao, X. Regulatory T cells and immune tolerance to tumors / X. Cao // *Immunol. Res.* – 2010. – Vol. 46, № 1-3. – P. 79-93.
47. Cardilo-Reis, L. Interleukin-13 protects from atherosclerosis and modulates plaque composition by skewing the macrophage phenotype / L. Cardilo-Reis, S. Gruber, S.M. Schreier et al. // *EMBO Mol. Med.* – 2012. Vol. 4, № 10. – P. 1072–1086.
48. Carrier, Y. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice / Y. Carrier, J. Yuan, V.K. Kuchroo et al. // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 178, № 1. – P. 179-185.
49. Chen, Y.C. Serum levels of interleukin (IL)-18, IL-23 and IL-17 in Chinese patients with multiple sclerosis / Y.C. Chen, S.D. Chen, L. Miao et al. // *J. Neuroimmunol.* – 2012. – Vol. 243, № 1-2. – P. 56-60.
50. Chiricozzi, A. IL-17 targeted therapies for psoriasis / A. Chiricozzi, J.G. Krueger // *Expert. Opin. Investig. Drugs.* – 2013. – Vol. 22, № 8. – P. 993-1005.
51. Chitnis, T. Defining Th1 and Th2 immune responses in a reciprocal cytokine environment in vivo / T. Chitnis, A.D. Salama, M.J. Grusby et al. // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 172, № 7. – P. 4260-4265.
52. Choudhuri, K. Signaling microdomains in T cells / K. Choudhuri, M.L. Dustin // *FEBS Lett.* – 2010. – Vol.584, № 24. – P. 4823-4831.
53. Chowdhury, D. Death by a Thousand Cuts: Granzyme Pathways of Programmed Cell Death / D. Chowdhury, J. Lieberman // *Annu Rev Immunol.* – 2008. – Vol. 26. – P. 389–420.

54. Choy, E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [Electronic resource] / E. Choy // *Rheumatology* (Oxford). – 2012. – Vol. 51. – Access mode: http://rheumatology.oxfordjournals.org/content/51/suppl_5/v3.long.
55. Chung, C.D. Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction / C.D. Chung, V.P. Patel, M. Moran et al. // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 165, № 7. – P. 3722-3729.
56. Clark, M.C. T cells modulate glycans on CD43 and CD45 during development and activation, signal regulation, and survival // M.C. Clark, L.G. Baum / *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2012. – Vol. 1253. – P. 58-67.
57. Coffman, R.L. Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice / R.L. Coffman, B.W. Seymour, S. Hudak et al. // *Science.* – 1989. – Vol. 245, № 4915. – P. 308-310.
58. Compagno, D. Delineating the "galectin signature" of the tumor microenvironment [Electronic resource] / D. Compagno, D.J. Laderach, L. Gentilini et al. // *Oncoimmunology.* – 2013. – Vol. 2, № 4. – Access mode: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3654582/>.
59. Cooper, D. Novel insights into the inhibitory effects of Galectin-1 on neutrophil recruitment under flow / D. Cooper, L.V. Norling, M. Perretti // *J. Leukoc. Biol.* – 2008. – Vol. 83. – P. 1459-1466.
60. Correa, S.G. Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory, and activated macrophages / S.G. Correa, C.E. Sotomayor, M.P. Aoki et al. // *Glycobiology.* – 2003. – Vol. 13, № 2. – P. 119-128.
61. Cottet-Rousselle, C. Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes / C. Cottet-Rousselle, X. Ronot, X. Leverve et al. // *Cytometry A.* – 2011. – Vol. 79, № 6. – P. 405-425.
62. Cowden, J.M. The histamine H4 receptor mediates inflammation and Th17 responses in preclinical models of arthritis [Electronic resource] / J.M.

Cowden, F. Yu, H. Banie et al. // *Ann. Rheum. Dis.* – 2013. – Access mode: <http://ard.bmj.com/content/73/3/600.long>.

63. Cua, D.J. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain / D.J. Cua, J. Sherlock, Y. Chen et al. // *Nature.* – 2003. – Vol. 421, № 6924. – P. 744-748.

64. Da Silva-Ferrada, E. Role of monoubiquitylation on the control of I κ B α degradation and NF- κ B activity [Electronic resource] / E. Da Silva-Ferrada, M. Torres-Ramos, F. Aillet et al. // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6, № 10. – Access mode: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3192046/>.

65. Dardalhon, V. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells / V. Dardalhon, A. Awasthi, H. Kwon et al. // *Nat. Immunol.* – 2008. – Vol. 9, № 12. – P. 1347–1355.

66. Dardalhon, V. Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity / V. Dardalhon, T. Korn, V.K. Kuchroo et al. // *J. Autoimmun.* – 2008. – Vol. 31, № 3. – P. 252-256.

67. Das, M.P. Autopathogenic T helper cell type 1 (Th1) and protective Th2 clones differ in their recognition of the autoantigenic peptide of myelin proteolipid protein / M.P. Das, L.B. Nicholson, J.M. Greer et al. // *J. Exp. Med.* – 1997. – Vol. 186, № 6. – P. 867-876.

68. de la Fuente, H. Psoriasis in humans is associated with down-regulation of galectins in dendritic cells / H. de la Fuente, S. Perez-Gala, P. Bonay et al. // *J. Pathol.* – 2012. – Vol. 228, № 2. – P. 193-203.

69. Deaglio, S. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression / S. Deaglio, K.M. Dwyer, W. Gao et al. // *J. Exp. Med.* – 2007. – Vol. 204, № 6. – P. 1257-1265.

70. Denzer, K. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device / K. Denzer, M.J. Kleijmeer, H.F. Heijnen et al. // *J. Cell Sci.* – 2000. – Vol. 113, № 19. – P. 3365-3374.

71. Dhirapong, A. The immunological potential of galectin-1 and -3 / A. Dhirapong, A. Lleo, P. Leung et al. // *Autoimmun Rev.* – 2009. – Vol. 8, № 5. – P. 360-363.
72. Dieckmann, D. Activated CD4⁺ CD25⁺ T cells suppress antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells but induce a suppressive phenotype only in CD4⁺ T cells / D. Dieckmann, H. Plöttner, S. Dotterweich et al. // *Immunology.* – 2005. – Vol. 115, № 3. – P. 305-314.
73. 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.
74. Earl, L.A. N- and O-glycans modulate galectin-1 binding, CD45 signaling, and T cell death / L.A. Earl, S. Bi, L.G. Baum // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285, № 4. – P. 2232-2244.
75. Elantak, L. Structural basis for galectin-1-dependent pre-B cell receptor (pre-BCR) activation / L. Elantak, M. Espeli, A. Boned et al. // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287, № 53. – P. 44703-44713.
76. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death / S. Elmore // *Toxicol Pathol.* – 2007. – Vol. 35, № 4. – P. 495–516.
77. Elyaman, W. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3⁺ natural regulatory T cells / W. Elyaman, E.M. Bradshaw, C. Uyttenhove et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – Vol. 106, № 31. – P. 12885–12890.
78. Espeli, M. Impaired B-cell development at the pre-BII-cell stage in galectin-1-deficient mice due to inefficient pre-BII/stromal cell interactions / M. Espeli, S.J. Mancini, C. Breton et al. // *Blood.* – 2009. – Vol. 113, № 23. – P. 5878-5886.
79. Ferraccioli, G. Biomarkers of good EULAR response to the B cell depletion therapy in all seropositive rheumatoid arthritis patients: clues for the pathogenesis [Electronic resource] / G. Ferraccioli, B. Tulusso, F. Bobbio-

Pallavicini et al. // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, №7. - Access mode: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3408482/>.

80. Feunou, P. Foxp3+CD25+ T regulatory cells stimulate IFN-gamma-independent CD152-mediated activation of tryptophan catabolism that provides dendritic cells with immune regulatory activity in mice unresponsive to staphylococcal enterotoxin B / P. Feunou, S. Vanwetswinkel, F. Gaudray et al. // J. Immunol. 2007. – Vol. 179, № 2. – P. 910-917.

81. Fitzgerald, D.C. Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells / D.C. Fitzgerald, G.X. Zhang, M. El-Behi et al. // Nat. Immunol. – 2007. – Vol. 8, № 12. – P. 1372-1379.

82. Fontaine, R.H. IL-9 / IL-9 receptor signaling selectively protects cortical neurons against developmental apoptosis / R.H. Fontaine, O. Cases, V. Lelievre et al. // Cell Death. Differ. – 2008. – Vol. 15, № 10. – P. 1542-1552.

83. Fort, M.M. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo / M.M. Fort, J. Cheung, D. Yen, et al. // Immunity – 2001. – Vol. 15, № 6. – P. 985-995.

84. Fulcher, J.A. et al. Galectin-1-matured human monocyte-derived dendritic cells have enhanced migration through extracellular matrix / J.A. Fulcher, S.T. Hashimi, E.L. Levroney et al. // J. Immunol. – 2006. – Vol. 177, № 1. – P. 216–226.

85. 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.

86. Gagliani, N. Antigen-specific dependence of Tr1-cell therapy in preclinical models of islet transplant / N. Gagliani, T. Jofra, A. Stabilini et al. // Diabetes. – 2010. – Vol. 59, № 2. – P. 433-439.

87. Gandhi, M.K. Galectin-1 mediated suppression of Epstein-Barr virus specific T-cell immunity in classic Hodgkin lymphoma / M.K. Gandhi, G. Moll, C. Smith et al. // *Blood*. – 2007. – Vol. 110, № 4. – P. 1326-1329.
88. Garín, M.I. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells / M.I. Garín, C.C. Chu, D. Golshayan et al. // *Blood*. – 2007. – Vol. 109, № 5. – P. 2058-2065.
89. Garner, O.B. Galectin-glycan lattices regulate cell-surface glycoprotein organization and signalling / O.B. Garner, L.G. Baum // *Biochem. Soc. Trans.* – 2008. – Vol. 36, № 6. – P. 1472-1477.
90. Giovannetti, A. Apoptosis in the homeostasis of the immune system and in human immune mediated diseases / A. Giovannetti, M. Pierdominici, A. Di Iorio et al. // *Curr. Pharm. Des.* – 2008. – Vol. 14, № 3. – P. 253-268.
91. Gol-Ara, M. The role of different subsets of regulatory T cells in immunopathogenesis of rheumatoid arthritis [Electronic resource] / M. Gol-Ara, F. Jadidi-Niaragh, R. Sadria et al. // *Arthritis*. – 2012. - Access mode: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3486158/>.
92. Graber, T.E. Distinct roles for the cellular inhibitors of apoptosis proteins 1 and 2 [Electronic resource] / T.E. Graber, M. Holcik // *Cell Death Dis.* – 2011. – Access mode: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3101816/>.
93. Gratchev, A. The receptor for interleukin-17E is induced by Th2 cytokines in antigen-presenting cells / A. Gratchev, J. Kzhyshkowska, K. Duperrier et al. // *Scand. J. Immunol.* – 2004. – Vol. 60, № 3. – P. 233-237
94. Greene, W.C. The human interleukin-2 receptor: normal and abnormal expression in T cells and in leukemias induced by the human T-lymphotropic retroviruses / W.C. Greene, W.J. Leonard, J.M. Depper et al. // *Ann Intern Med.* – 1986. – Vol. 105, № 4. – P. 560-572.
95. Grigorian, A. T-cell growth, cell surface organization, and the galectin-glycoprotein lattice / A. Grigorian, S. Torossian, M. Demetriou // *Immunol. Rev.* – 2009. – Vol. 230, № 1. – P. 232-46.

96. Grossman, W.J. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death / W.J. Grossman, J.W. Verbsky, W. Barchet et al. // *Immunity*. – 2004. – Vol. 21, № 4. – P. 589–601.
97. Hahn, H.P. Galectin-1 induces nuclear translocation of endonuclease G in caspase- and cytochrome c-independent T cell death / H.P. Hahn, M. Pang, J. He et al. // *Cell Death Differ.* – 2004. – Vol. 11, № 12. – P. 1277-1286.
98. Hall, L.R. An Essential Role for Interleukin-5 and Eosinophils in Helminth-Induced Airway Hyperresponsiveness / L.R. Hall, R.K. Mehlotra, A.W. Higgins et al. // *Infect Immun.* – 1998. – Vol. 66, № 9. – P. 4425–4430.
99. Harrington, L.E. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages / L.E. Harrington, R.D. Hatton, P.R. Mangan et al. // *Nat. Immunol.* – 2005. – Vol. 6, № 11. – P. 1123-1132.
100. He, J. Endothelial cell expression of galectin-1 induced by prostate cancer cells inhibits T-cell transendothelial migration / J. He, L.G. Baum // *Lab. Invest.* – 2006. – Vol. 86, № 6. – P. 578–590.
101. Heissmeyer, V. Calcineurin imposes T cell unresponsiveness through targeted proteolysis of signaling proteins / V. Heissmeyer, F. Macián, S.H. Im et al. // *Nat. Immunol.* – 2004. – Vol. 5, № 3. – P. 255-265.
102. Hernandez, J.D. Galectin-1 binds different CD43 glycoforms to cluster CD43 and regulate T cell death / J.D. Hernandez, J.T. Nguyen, J. He et al. // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 177, № 8. – P. 5328-5336.
103. Ho, I.C. Transcription: tantalizing times for T cells / I.C. Ho, L.H. Glimcher // *Cell*. – 2002. – Vol. 109, № 1. – P. 109-120.
104. Hoffenbach, A. Deficit of interleukin 2 production associated with impaired T-cell proliferative responses in *Mycobacterium lepraemurium* infection / A. Hoffenbach, P.H. Lagrange, M.A. Bach // *Infect Immun.* – 1983. – Vol. 39, № 1. – P. 109-116.

105. Hofstetter, H.H. Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis / H.H. Hofstetter, S.M. Ibrahim, D. Koczan et al. // *Cell Immunol.* – 2005. – Vol. 237, № 2. – P. 123–130.
106. Hoover, D.M. The structure of human macrophage inflammatory protein-3 α /CCL20. Linking antimicrobial and CC chemokine receptor-6- binding activities with human β -defensins / D.M. Hoover, C. Boulegue, D. Yang et al. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, № 40. – P. 37647-37654
107. Huang, C.T. Role of LAG-3 in regulatory T cells / C.T. Huang, C.J. Workman, D. Flies et al. // *Immunity.* – 2004. – Vol. 21, № 4. – P. 503-513.
108. Huang, W. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice / W. Huang, L. Na, P.L. Fidel et al. // *J. Infect. Dis.* – 2004. – Vol. 190, № 3. – P. 624–31
109. Huang, Y.J. Multivalent structure of galectin-1-nanogold complex serves as potential therapeutics for rheumatoid arthritis by enhancing receptor clustering / Y.J. Huang, A.L. Shiau, S.Y. Chen et al. // *Eur. Cell. Mater.* – 2012. – Vol. 23. – P. 170-181.
110. Hughes, R.C. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins / R.C. Hughes // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1999. – Vol. 1473, № 1. – P. 172-185.
111. Ilarregui, J.M. Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10 / J.M. Ilarregui, D.O. Croci, G.A. Bianco et al. // *Nat. Immunol.* – 2009. – Vol. 10, № 9. – P. 981-991.
112. Ion ,G. Role of p56lck and ZAP70-mediated tyrosine phosphorylation in galectin-1-induced cell death / G. Ion, R. Fajka-Boja, G.K. Tóth et al. // *Cell Death Differ.* – 2005. – Vol. 12, № 8. – P. 1145-1147.
113. Ishigame, H. Differential roles of interleukin- 17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses / H.

- Ishigame, S. Kakuta, T. Nagai et al. // *Immunity*. – 2009. – Vol. 30, № 1. – P. 108–119.
114. Itakura, E. IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to vertical growth phase and development of metastatic competence / E. Itakura, R.R. Huang, D.R. Wen // *Mod Pathol*. – 2011. – Vol. 24, № 6. – P. 801-809.
115. Jäger, A. Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation / A. Jäger, V.K. Kuchroo // *Scand. J. Immunol.* – 2010. – Vol. 72, № 3. – P. 173-184.
116. Jäger, A. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes / A. Jäger, V. Dardalhon, R.A. Sobel et al. // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 183, № 11. – P. 7169-7177.
117. Jones, L.S. IFN-gamma-deficient mice develop experimental autoimmune uveitis in the context of a deviant effector response / L.S. Jones, L.V. Rizzo, R.K. Agarwal et al. // *J. Immunol.* – 1997. – Vol. 158, № 12. – P. 5997-6005.
118. Jovanovic, D.V. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL- β and TNF- α , by human macrophages / D.V. Jovanovic, J.A. Di Battista, J. Martel-Pelletier et al. // *J. Immunol.* – 1998. – Vol. 160, № 7. – P. 3513-3521
119. Juszczynski, P. The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma / P. Juszczynski, J. Ouyang, S. Monti et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2007. – Vol. 104, № 32. – P. 13134–13139.
120. Jyothi, M.D. Interleukin-2-induced nitric oxide synthase and nuclear factor-kappaB activity in activated natural killer cells and the production of interferon-gamma / M.D. Jyothi, A. Khar // *Scand. J. Immunol.* – 2000. – Vol. 52, № 2. – P. 148-155.

121. Kagami, S. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis / S. Kagami, H.L. Rizzo, J.J. Lee et al. // *J. Invest. Dermatol.* – 2010. – Vol. 130, № 5. – P. 1373-1383.
122. Kanhere, A. T-bet and GATA3 orchestrate Th1 and Th2 differentiation through lineage-specific targeting of distal regulatory elements [Electronic resource] / A. Kanhere, A. Hertweck, U. Bhatia et al. // *Nat. Commun.* – 2012. – Vol. 3. - Access mode: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3535338/>.
123. Kawaguchi, M. IL-17 cytokine family / M. Kawaguchi, M. Adachi, N. Oda et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2004. – Vol. 114, № 6. – P. 1265-1273.
124. Keefe, D. Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis / D. Keefe, L. Shi, S. Feske et al. // *Immunity.* – 2005. – Vol. 23, № 3. – P. 249–262.
125. Kelly, M.N. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection / M.N. Kelly, J.K. Kolls, K. Happel et al. // *Infect. Immun.* – 2005. – Vol. 73, № 1. – P. 617-621.
126. Kolls, J.K. Interleukin-17 family members and inflammation / J.K. Kolls, A. Linden // *Immunity.* – 2004. – Vol. 21, № 4. – P. 467-476.
127. Kopcow, H.D. T cell apoptosis at the maternal-fetal interface in early human pregnancy, involvement of galectin-1 / H.D. Kopcow, F. Rosetti, Y. Leung et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2008. – Vol. 105, № 47. – P. 18472–18477.
128. Kopf, M. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses / M. Kopf, G. Le Gros, M. Bachmann et al. // *Nature.* – 1993. – Vol. 362, № 6417. – P. 245-248.
129. Korn, T. IL-17 and Th17 Cells / T. Korn, E. Bettelli, M. Oukka et al. // *Annu Rev Immunol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 485-517.
130. Korn, T. Immunological basis for the development of tissue inflammation and organ-specific autoimmunity in animal models of multiple sclerosis / T.

Korn, M. Mitsdoerffer, V.K. Kuchroo // *Results Probl. Cell. Differ.* – 2010. – Vol. 51. – P. 43-74.

131. Kuchroo, V.K. Cytokines and adhesion molecules contribute to the ability of myelin proteolipid protein-specific T cell clones to mediate experimental allergic encephalomyelitis / V.K. Kuchroo, C.A. Martin, J.M. Greer et al. // *J. Immunol.* – 1993. – Vol. 151, № 8. – P. 4371-4382.

132. Kuo, P.L. Lung cancer-derived galectin-1 mediates dendritic cell anergy through inhibitor of DNA binding 3/IL-10 signaling pathway / P.L. Kuo, J.Y. Hung, S.K. Huang et al. // *J. Immunol.* – 2011. – Vol. 186, № 3. – P. 1521-1530.

133. La, M. A novel biological activity for galectin-1: inhibition of leukocyte-endothelial cell interactions in experimental inflammation / M. La, T.V. Cao, G. Cerchiaro et al. // *Am. J. Pathol.* – 2003. – Vol. 163, № 4. – P. 1505–1515.

134. Langrish, C.L. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation / C.L. Langrish, Y. Chen, W.M. Blumenschein et al. // *J. Exp. Med.* – 2005. – Vol. 201, № 2. – P. 233–40.

135. Leung, S. The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease / S. Leung, X. Liu, L. Fang et al. // *Cell. Mol. Immunol.* – 2010. – Vol. 7, № 3. – P. 182–189.

136. Levi, G. Prevention and therapy with electrolectin of experimental autoimmune myasthenia gravis in rabbits / G. Levi, R. Tarrab-Hazdai, V.I. Teichberg // *Eur. J. Immunol.* – 1983. – Vol. 13, № 6. – P.500-507.

137. Liang, B. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II / B. Liang, C. Workman, J. Lee et al. // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 180, № 9. – P. 5916-5926.

138. Lieberman, J. Granzyme A activates another way to die / J. Lieberman // *Immunol Rev.* – 2010. – Vol. 235, № 1. – P. 93–104

139. Lin, C.H. New Insights into an autoimmune mechanism, pharmacological treatment and relationship between multiple sclerosis and inflammatory bowel

- disease / C.H. Lin, S. Kadakia, M. Frieri // *Autoimmun Rev.* – 2013. – Vol. 13, № 2. – P. 114-116.
140. Linsley, P.S. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen / P.S. Linsley, J.A. Ledbetter // *Annu. Rev. Immunol.* – 1993. – Vol. 11. – P. 191-212.
141. Liu, F.T. Intracellular functions of galectins / F.T. Liu, R.J. Patterson, J.L. Wang // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2002. Vol. 1572, № 2-3. – P. 263-273.
142. Liu, S.D. Endogenous galectin-1 enforces class I-restricted TCR functional fate decisions in thymocytes / S.D. Liu, C.C. Whiting, T. Tomassian et al. // *Blood.* – 2008. – Vol. 112, № 1. – P. 120-130.
143. Liu, S.J. Induction of a distinct CD8 Tnc17 subset by transforming growth factor- β and interleukin-6 / S.J. Liu, J.P. Tsai, C.R. Shen et al. // *J. Leukoc. Biol.* – 2007. – Vol. 82, № 2. – P. 354-360.
144. Lochner, M. In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+ RORgamma t+ T cells / M. Lochner, L. Peduto, M. Cherrier et al. // *J. Exp. Med.* – 2008. – Vol. 205, № 6. – P. 1381–93.
145. Lockhart, E. IL-17 production is dominated by $\gamma\delta$ T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection / E. Lockhart, A.M. Green, J.L. Flynn // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 177, № 7. – P. 4662–69
146. Longphre, M. Allergen-induced IL-9 directly stimulates mucin transcription in respiratory epithelial cells / M. Longphre, D. Li, M. Gallup et al. // *J. Clin. Invest.* – 1999. – Vol. 104, № 10. – P. 1375-1382.
147. Mandapathil, M. Targeting human inducible regulatory T cells (Tr1) in patients with cancer: blocking of adenosine-prostaglandin E2 cooperation / M. Mandapathil, T.L. Whiteside // *Expert. Opin. Biol. Ther.* – 2011. – Vol. 11, № 9. – P. 1203-1214.
148. Mangan, P.R. Transforming growth factor-b induces development of Th17 lineage / P.R. Mangan, L.E. Harrington, D.B. O'Quinn et al. // *Nature.* – 2006. – Vol. 441, № 7090. – P. 231-234.

149. Martinez-Nunez, R.T. The interleukin 13 (IL-13) pathway in human macrophages is modulated by microRNA-155 via direct targeting of interleukin 13 receptor alpha1 (IL13Ralpha1) / R.T. Martinez-Nunez, F. Louafi, T. Sanchez-Elsner // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286, № 3. – P. 1786-1794.
150. Martinou, J.C. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics / J.C. Martinou, R.J. Youle // *Dev. Cell.* – 2011. – Vol. 21, № 1. – P. 92-101.
151. Matarrese, P. Galectin-1 sensitizes resting human T lymphocytes to Fas (CD95)-mediated cell death via mitochondrial hyperpolarization, budding, and fission / P. Matarrese, A. Tinari, E. Mormone et al. // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280, № 8. – P. 6969-6985.
152. Matthys, P. Anti-IL-12 antibody prevents the development and progression of collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice / P. Matthys, K. Vermeire, T. Mitera et al. // *Eur. J. Immunol.* – 1998. – Vol. 28, № 7. – P. 2143-2151.
153. Mayack, S.R. Cutting edge: An alternative pathway of CD4+T cell differentiation is induced following activation in the absence of gamma-chain-dependent cytokine signals / S.R. Mayack, L.J. Berg // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 176, № 4. – P. 2059-2063.
154. McGeachy, M.J. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo / M.J. McGeachy, Y. Chen, C.M. Tato et al. // *Nat. Immunol.* – 2009. – Vol. 10, № 3. – P. 314-324.
155. Mellor, A.L. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism / A.L. Mellor, D.H. Munn // *Nat. Rev. Immunol.* – 2004. – Vol. 4, № 10. – P. 762-774.
156. Mercier, S. Galectin-1 promotes HIV-1 infectivity in macrophages through stabilization of viral adsorption / S. Mercier, C. St-Pierre, I. Pelletier et al. // *Virology.* – 2008. – Vol. 371, № 1. – P. 121-129.

157. Metkar, S.S. Granzyme B activates procaspase-3 which signals a mitochondrial amplification loop for maximal apoptosis // S.S. Metkar, B. Wang, M.L. Ebbs et al. // *J Cell Biol.* – 2003. – Vol. 160, № 6. – P. 875–885.
158. Miller, S.A. Molecular mechanisms by which T-bet regulates T-helper cell commitment / S.A. Miller, A.S. Weinmann // *Immunol. Rev.* – 2010. – Vol. 238, № 1. – P. 233-246.
159. Mitchell, J. IL-13 and the IL-13 receptor as therapeutic targets for asthma and allergic disease / J. Mitchell, V. Dimov, R.G. Townley // *Curr. Opin. Investig. Drugs.* – 2010. – Vol. 11, № 5. – P. 527-534.
160. Mobergslien, A. Galectin-1 and -3 gene silencing in immature and mature dendritic cells enhances T cell activation and interferon- γ production / A. Mobergslien, M. Sioud // *J. Leukoc. Biol.* – 2012. – Vol. 91, № 3. – P. 461-467.
161. Moon, S.J. In vivo action of IL-27: reciprocal regulation of Th17 and Treg cells in collagen-induced arthritis [Electronic resource] / S.J. Moon, J.S. Park, Y.J. Heo et al. // *Exp. Mol. Med.* – 2013. – Access mode: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3809362/>.
162. Moore, K.W. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor / K.W. Moore, R. de Waal Malefyt, R.L. Coffman et al. // *Annu. Rev. Immunol.* – 2001. – Vol. 19. – P. 683–765.
163. Moreau, A. Absence of Galectin-1 accelerates CD8⁺ T cell-mediated graft rejection / A. Moreau, A. Noble, K. Ratnasothy et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2012. – Vol. 42, № 11. – P. 2881-2888.
164. Moseley, T.A. Interleukin-17 family and IL-17 receptors / T.A. Moseley, D.R. Haudenschild, L. Rose et al. // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2003. – Vol. 14, № 2. – P. 155-174.
165. Mosmann, T.R. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties / T.R. Mosmann, R.L. Coffman // *Annu. Rev. Immunol.* – 1989. – Vol. 7. – P. 145-173.

166. Motran, C.C. Galectin-1 functions as a Th2 cytokine that selectively induces Th1 apoptosis and promotes Th2 function / C.C. Motran, K.M. Molinder, S.D. Liu et al. // *Eur J Immunol.* – 2008. – Vol. 38, № 11. – P. 3015-3027.
167. Mrabet, D. Synovial fluid and serum levels of IL-17, IL-23, and CCL-20 in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis: a Tunisian cross-sectional study / D. Mrabet, L. Laadhar, H. Sahli et al. // *Rheumatol. Int.* – 2013. – Vol. 33, № 1. – P. 265-266.
168. Murphy, K.M. The lineage decisions of helper T cells / K.M. Murphy, S.L. Reiner // *Nat. Rev. Immunol.* – 2002. – Vol. 2, № 12. – P. 933-944.
169. Nakae, S. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice / S. Nakae, A. Nambu, K. Sudo et al. // *J. Immunol.* – 2003. – Vol. 171, № 11. – P. 6173–6177.
170. Navarro-Millán, I. Systematic review of tocilizumab for rheumatoid arthritis: a new biologic agent targeting the interleukin-6 receptor / I. Navarro-Millán, J.A. Singh, J.R. Curtis // *Clin. Ther.* – 2012. – Vol. 34, № 4. – P. 788-802.
171. Nishikawa, H. Definition of target antigens for naturally occurring CD4(+) CD25(+) regulatory T cells / H. Nishikawa, T. Kato, I. Tawara et al. // *J. Exp. Med.* – 2005. – Vol. 201, № 5. – P. 681-686.
172. Nishikawa, H. Regulatory T cells in tumor immunity / H. Nishikawa, S. Sakaguchi // *Int. J. Cancer.* – 2010. – Vol. 127, № 4. – P. 759-767.
173. Norling, L.V. Inhibitory control of endothelial galectin-1 on in vitro and in vivo lymphocyte trafficking / L.V. Norling, A.L. Sampaio, D. Cooper et al. // *FASEB J.* – 2008. – Vol. 22, № 3. – P. 682-690.
174. Offner, H. Recombinant human beta-galactoside binding lectin suppresses clinical and histological signs of experimental autoimmune encephalomyelitis / H. Offner, B. Celnik, T.S. Bringman et al. // *J. Neuroimmunol.* – 1990. – Vol. 28, № 2. – P.177–184.

175. Oppmann, B. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12 / B. Oppmann, R. Lesley, B. Blom et al. // *Immunity*. – 2000. – Vol. 13, № 5. – P. 715–25.
176. Ozaki, T. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers / T. Ozaki, A. Nakagawara // *Cancers (Basel)*. – 2011. – Vol. 3, № 1. – P. 994-1013.
177. Paclik, D. Galectins distinctively regulate central monocyte and macrophage function / D. Paclik, L. Werner, O. Guckelberger et al. // *Cell Immunol.* – 2011. – Vol. 271, № 1. – P. 97-103.
178. Panitch, H.S. Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system / H.S. Panitch, R.L. Hirsch, J. Schindler et al. // *Neurology*. – 1987. – Vol. 37, № 7. – P. 1097–1102.
179. Parham, C. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R / C. Parham, M. Chirica, J. Timans et al. // *J. Immunol.* – 2002. – Vol. 168, № 11. – P. 5699-5708.
180. Park, H. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17 / H. Park, Z. Li, X.O. Yang et al. // *Nat. Immunol.* – 2005. – Vol. 6, № 11. – P. 1133-41.
181. Penninger, J.M. Mitochondria, AIF and caspases--rivaling for cell death execution / J.M. Penninger, G. Kroemer // *Nat. Cell Biol.* – 2003. – Vol. 5, № 2. – P. 97-99.
182. Perone, M.J. Dendritic cells expressing transgenic galectin-1 delay onset of autoimmune diabetes in mice / M.J. Perone, S. Bertera, Z.S. Tawadrous et al. // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 177, № 8. – P. 5278-5289.
183. Perone, M.J. Suppression of autoimmune diabetes by soluble galectin-1 / M.J. Perone, S. Bertera, W.J. Shufesky et al. // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 182, № 5. – P. 2641-2653.
184. Perone, M.J. Transgenic galectin-1 induces maturation of dendritic cells that elicit contrasting responses in naive and activated T cells / M.J. Perone, A.T.

Larregina, W.J. Shufesky et al. // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 176, № 12. – P. 7207-20.

185. Perry, S.W. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide / S.W. Perry, J.P. Norman, J. Barbieri et al. // *Biotechniques.* – 2011. – Vol. 50, № 2. – P. 98-115.

186. Peterson, R.A. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression / R.A. Peterson // *Toxicol. Pathol.* – 2012. – Vol. 40, № 2. – P. 186-204.

187. Piccirillo, C.A. Regulatory T cells in health and disease / C.A. Piccirillo // *Cytokine.* – 2008. – Vol. 43, № 3. – P. 395-401.

188. Pitt, J.M. Blockade of IL-10 signaling during bacillus Calmette-Guérin vaccination enhances and sustains Th1, Th17, and innate lymphoid IFN- γ and IL-17 responses and increases protection to *Mycobacterium tuberculosis* infection [Electronic resource] / J.M. Pitt, E. Stavropoulos, P.S. Redford et al. // *J. Immunol.* – 2012. – Vol. 189, № 8. – P. 4079-4087. – Access mode: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3467194/>.

189. Poirier, N. A more selective costimulatory blockade of the CD28-B7 pathway / N. Poirier, G. Blancho, B. Vanhove // *Transpl. Int.* – 2011. – Vol. 24, № 1. – P. 2-11.

190. Pöllinger, B. IL-17 producing T cells in mouse models of multiple sclerosis and rheumatoid arthritis / B. Pöllinger // *J. Mol. Med. (Berl).* – 2012. – Vol. 90, № 6. – P. 613-624

191. Pop, C. The apoptosome activates caspase-9 by dimerization / C. Pop, J. Timmer, S. Sperandio et al. // *Mol. Cell.* – 2006. – Vol. 22, № 2. – P. 269-75.

192. Pot, C. Cutting edge: IL-27 induces the transcription factor c-Maf, cytokine IL-21, and the costimulatory receptor ICOS that coordinately act together to promote differentiation of IL-10-producing Tr1 cells / C. Pot, H. Jin, A. Awasthi et al. // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 183, № 2. – P. 797-801.

193. Qu, N. Pivotal roles of T-helper 17-related cytokines, IL-17, IL-22, and IL-23, in inflammatory diseases [Electronic resource] / N. Qu, M. Xu, I. Mizoguchi et al. // Clin. Dev. Immunol. – 2013. – Access mode: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3728507/>.
194. Rabinovich, G. Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis / G. Rabinovich, G. Daly, H. Dreja et al. // J. Exp. Med. – 1999. – Vol. 190, № 3. – P. 385-397.
195. Rabinovich, G.A. Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation / G.A. Rabinovich, C.E. Sotomayor, C.M. Riera et al. // Eur J. Immunol. 2000. – Vol. 30, № 5. – P. 1331–1339.
196. Rabinovich, G.A. Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1 / G.A. Rabinovich, A. Ariel, R. Hershkovich et al. // Immunology. – 1999. – Vol. 97, № 1. – P. 100-106.
197. Rabinovich, G.A. Induction of allogenic T-cell hyporesponsiveness by galectin-1-mediated apoptotic and non-apoptotic mechanisms / G.A. Rabinovich, R.E. Ramhorst, N. Rubinstein // Cell. Death. Differ. – 2002. – Vol. 9, № 6. – P. 661-670.
198. Rabinovich, G.A. Molecular mechanisms implicated in galectin-1-induced apoptosis: activation of the AP-1 transcription factor and downregulation of Bcl-2 / G.A. Rabinovich, C.R. Alonso, C.E. Sotomayor et al. // Cell. Death. Differ. – 2000. – Vol.7, № 8. – P. 747-753.
199. Rickel, E.A. Identification of functional roles for both IL-17RB and IL-17RA in mediating IL-25-induced activities / E.A. Rickel, L.A. Siegel, B-R. Park Yoon et al. // J. Immunol. 2008. – Vol. 181, № 6. – P. 4299–4310
200. Rodig, S.J. AP1-dependent galectin-1 expression delineates classical hodgkin and anaplastic large cell lymphomas from other lymphoid malignancies with shared molecular features / S.J. Rodig, J. Ouyang, P. Juszczynski et al. // Clin. Cancer. Res. – 2008. – Vol. 14, № 11. – P. 3338-3344.

201. Rossi, B. Clustering of pre-B cell integrins induces galectin-1-dependent pre-B cell receptor relocalization and activation / B. Rossi, M. Espeli, C. Schiff et al. // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 177, № 2. – P. 796-803.
202. Roşu, A. IL-17 patterns in synovium, serum and synovial fluid from treatment-naïve, early rheumatoid arthritis patients / A. Roşu, C. Mărgăritescu, A. Stepan et al. // *Rom. J. Morphol. Embryol.* – 2012. – Vol. 53, № 1. – P. 73-80.
203. Rubinstein, N. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege / N. Rubinstein, M. Alvarez, N.W. Zwirner et al. // *Cancer Cell.* – 2004. – Vol. 5, № 3. – P. 241–251.
204. Rudd, C.E. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction / C.E. Rudd, A. Taylor, H. Schneider // *Immunol. Rev.* – 2009. – Vol. 229, № 1. – P. 12-26.
205. Ryazantseva, N.V. Molecular mechanisms of the effect of interleukin-2 on apoptosis of blood lymphocytes / N.V. Ryazantseva, V.V. Novitskii, O.B. Zhukova et al. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* – 2010. – Vol. 149, № 4. – P. 547-550.
206. Sakaguchi, S. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system / S. Sakaguchi, M. Miyara, C.M. Costantino et al. // *Nat. Rev. Immunol.* – 2010. – Vol.10, № 7. – P. 490-500.
207. Salatino, M. Galectin-1 as a potential therapeutic target in autoimmune disorders and cancer / M. Salatino, D.O. Croci, G.A. Bianco et al. // *Expert. Opin. Biol. Ther.* – 2008. – Vol. 8, № 1. – P. 45-57.
208. Santucci, L. Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice / L. Santucci, S. Fiorucci, F. Cammilleri et al. // *Hepatology.* – 2000. – Vol. 31, № 2. – P. 399–406.
209. Santucci, L. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice / L. Santucci, S. Fiorucci, N. Rubinstein et al. // *Gastroenterology.* – 2003. – Vol. 124, № 5. – P. 1381–1394.

210. Sarkar, S. Targeting IL-17 and Th17 cells in rheumatoid arthritis / S. Sarkar, D.A. Fox // *Rheum. Dis. Clin. North Am.* – 2010. – Vol. 36, № 2. – P. 345-366.
211. Saveleva, O.E. The role of transcription factors in cytokine-mediated apoptosis of lymphocytes / O.E. Saveleva, L.S. Litvinova, E.S. Anishchenko et al. // *International Journal of Biology.* – 2012. – V.4, № 1. – P. 129-137.
212. Schlegel, P.M. B cells contribute to heterogeneity of IL-17 producing cells in rheumatoid arthritis and healthy controls [Electronic resource] / P.M. Schlegel, I. Steiert, I. Kötter et al. // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, № 12. - Access mode: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0082580>.
213. Seelenmeyer, C. Cell surface counter receptors are essential components of the unconventional export machinery of galectin-1 / C. Seelenmeyer, S. Wegehingel, I. Tews et al. // *J. Cell. Biol.* – 2005. – Vol. 171, № 2. – P. 373-381.
214. Simeoni, L. Adaptors and linkers in T and B cells / L. Simeoni, S. Kliche, J. Lindquist et al. // *Curr. Opin. Immunol.* – 2004. – Vol. 16, № 3. – P. 304-313.
215. Simsek, I. TNF inhibitors for rheumatoid arthritis - a year in review / I. Simsek // *Bull. NYU Hosp. Jt. Dis.* – 2011. – Vol. – 69, № 3. – P. 220-224.
216. Singh, J.A. Summary of AHRQ's comparative effectiveness review of drug therapy for rheumatoid arthritis (RA) in adults-an update / J.A. Singh, D.R. Cameron // *J. Manag. Care. Pharm.* – 2012. – Vol. 18, № 4. – P.1-18.
217. Singh, R.A. Th1 and Th2 deviation of myelin-autoreactive T cells by altered peptide ligands is associated with reciprocal regulation of Lck, Fyn, and ZAP-70 / R.A. Singh, Y.C. Zang, A. Shrivastava et al. // *J. Immunol.* – 1999. – Vol. 163, № 12. – P. 6393-4402.
218. Singh, R.R. IL-4 and many roads to lupuslike autoimmunity / R.R. Singh // *Clin. Immunol.* – 2003. – Vol. 108, № 2. – P. 73–79.
219. Smeets, R.L. Molecular pathway profiling of T lymphocyte signal transduction pathways; Th1 and Th2 genomic fingerprints are defined by TCR

- and CD28-mediated signaling [Electronic resource] / R.L. Smeets, W.W. Fleuren, X. He et al. // *BMC Immunol.* – 2012. – Vol. 13, № 12. – Access mode: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3355027/>
220. Smith KA. The structure of IL2 bound to the three chains of the IL2 receptor and how signaling occurs / K.A. Smith // *Med. Immunol.* – 2006. – Vol. 5, № 3. – P. 1-5.
221. Sohn, S.J. Apoptosis during negative selection of autoreactive thymocytes / S.J. Sohn, J. Thompson, A. Winoto // *Curr. Opin. Immunol.* – 2007. – Vol. 19, № 5. – P. 510-515.
222. Soroosh, P. Th9 and allergic disease / P. Soroosh, T.A. Doherty // *Immunology.* – 2009. – Vol. 127, № 4. – P. 450-458.
223. Starossom, S.C. Galectin-1 deactivates classically activated microglia and protects from inflammation-induced neurodegeneration / S.C. Starossom, I.D. Mascalfroni, J. Imitola et al. // *Immunity.* – 2012. – Vol. 37, № 2. – P. 249-63.
224. Starr, T.K. Positive and negative selection of T cells / T.K. Starr, S.C. Jameson, K.A. Hogquist // *Annu Rev Immunol.* 2003. – Vol. 21. – P. 139-76.
225. Stillman, B.N. Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death / B.N. Stillman, et al. // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 176, № 2. – P. 778–789.
226. Stowell, S.R. Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion / S.R. Stowell, Y. Qian, S. Karmakar // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 180, № 5. – P. 3091-3102.
227. Stowell, S.R. Galectin-1 induces reversible phosphatidylserine exposure at the plasma membrane / S.R. Stowell, S. Karmakar, C.M. Arthur et al. // *Mol. Biol. Cell.* – 2009. – Vol. 20, № 5. – P. 1408-1418.
228. Stumhofer, J.S. Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10 / J.S. Stumhofer, J.S. Silver, A. Laurence et al. // *Nat. Immunol.* – 2007. – Vol. 8, № 12. – P. 1363-1371.

229. Suzuki, Y. Galectin-3 but not galectin-1 induces mast cell death by oxidative stress and mitochondrial permeability transition / Y. Suzuki, T. Inoue, T. Yoshimaru et al. // *Biochim. Biophys.* – 2008. – Vol. 1783, № 5. – P. 924–934.
230. Swain, S.L. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors / S.L. Swain, A.D. Weinberg, M. English et al. // *J. Immunol.* – 1990. – Vol. 145, № 11. – P. 3796–3806.
231. Tabrizi, S.J. T cell leukemia/lymphoma 1 and galectin-1 regulate survival/cell death pathways in human naive and IgM+ memory B cells through altering balances in Bcl-2 family proteins / S.J. Tabrizi, H. Niir, M. Masui et al. // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 182, № 3. – P. 1490-1499.
232. Takatsu, K. Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases / K. Takatsu // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* – 2011. – Vol. 87, № 8. – P. 463–485.
233. Tang, C. A novel role of CD30L/CD30 signaling by T-T cell interaction in Th1 response against mycobacterial infection / C. Tang, H. Yamada, K. Shibata et al. // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 181, № 9. – P. 6316-6327.
234. Teodorczyk-Injeyan, J.A. Interleukin 2-regulated in vitro antibody production following a single spinal manipulative treatment in normal subjects [Electronic resource] / J.A. Teodorczyk-Injeyan, M. McGregor, R. Ruegg et al. // *Chiropr. Osteopat.* – 2010. – Vol. 18, № 26. – Access mode: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2945351/>.
235. Torchinsky M.B. T helper 17 cells: discovery, function, and physiological trigger / M.B. Torchinsky, J.M. Blander // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2010. – Vol. 67, № 9. – P. 1407-1421.
236. Toscano, M.A. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death / M.A. Toscano, G.A. Bianco, J.M. Ilarregui et al. // *Nat. Immunol.* – 2007. – Vol. 8, № 8. – P. 825-834.

237. Toscano, M.A. Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses / M.A. Toscano, A.G. Commodaro, J.M. Ilarregui et al. // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 176, № 10. – P. 6323–6332.
238. Traugott, U. Multiple sclerosis: involvement of interferons in lesion pathogenesis / U. Traugott, P. Lebon // *Ann. Neurol.* – 1988. – Vol. 24, № 2. – P. 243-251.
239. Tsai, C.M. Galectin-1 promotes immunoglobulin production during plasma cell differentiation / C.M. Tsai, Y.K. Chiu, T.L. Hsu et al. // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 181, № 7. – P. 4570-4579.
240. Tsai, C.M. Phosphoproteomic analyses reveal that galectin-1 augments the dynamics of B-cell receptor signaling / C.M. Tsai, H.Y. Wu, T.H. Su et al. // *J. Proteomics.* – 2014. – Vol. 103. – P. 241-253.
241. Valenzuela, H.F. O-glycosylation regulates LNCaP prostate cancer cell susceptibility to apoptosis induced by galectin-1 / H.F. Valenzuela, K.E. Pace, P.V. Cabrera et al. // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67, № 13. – P. 6155- 6162.
242. Van der Leij, J. Strongly enhanced IL-10 production using stable galectin-1 homodimers / J. van der Leij, A. van den Berg, G. Harms et al. // *Mol. Immunol.* – 2007. – Vol. 44, № 4. – P. 506-513.
243. Van Dyken, S.J. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease / S.J. Van Dyken, R.M. Locksley // *Annu. Rev. Immunol.* – 2013. – Vol. 31. – P. 317-343.
244. Veldhoen, M. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells / M. Veldhoen, R.J. Hocking, C.J. Atkins et al. // *Immunity.* – 2006. – Vol. 24, № 2. – P. 179-189.
245. Veldhoen, M. Transforming growth factor-beta ‘reprograms’ the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset / M. Veldhoen, C. Uyttenhove, J. van Snick et al. // *Nat. Immunol.* – 2008. – Vol. 9, № 12. – P. 1341-1346.

246. Verhoven, B. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes / B. Verhoven, R.A. Schlegel, P. Williamson // *J. Exp. Med.* – 1995. – Vol. 182, № 5. – P. 1597-1601.
247. Vieira, P.L. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells / P.L. Vieira, J.R. Christensen, S. Minaee et al. // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 172, № 10. – P. 5986-5993.
248. Vignali, D.A. How regulatory T cells work / D.A. Vignali, L.W. Collison, C.J. Workman // *Nat. Rev. Immunol.* – 2008. – Vol. 8, № 7. – P. 523-532.
249. Voo, K.S. Identification of IL-17-producing FOXP3⁺ regulatory T cells in humans / K.S. Voo, Y.H. Wang, F.R. Santori et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – Vol. 106, № 12. – P. 4793-4798.
250. Vyakarnam, A. Evidence for a role for galectin-1 in pre-mRNA splicing / A. Vyakarnam, S.F. Dagher, J.L. Wang et al. // *Mol. Cell. Biol.* – 1997. – Vol. 17, № 8. – P. 4730-4737.
251. Wajant, H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm / H. Wajant // *Science.* – 2002. – Vol. 296, № 5573. – P. 1635-6.
252. Waldmann, T.A. Expression of interleukin 2 receptors on activated human B cells / T.A. Waldmann, C.K. Goldman, R.J. Robb et al. // *J. Exp. Med.* – 1984. – Vol. 160, № 5. – P. 1450-66.
253. Wang C.R. Intra-articular lentivirus-mediated delivery of galectin-3 shRNA and galectin-1 gene ameliorates collagen-induced arthritis / C.R. Wang, A.L. Shiau, S.Y. Chen et al. // *Gene Ther.* – 2010. Vol. 17, № 10. – P. 1225-33.
254. Wang, H. Differences in the induction of induced human CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾FoxP3⁽⁺⁾ T-regulatory cells and CD3⁽⁺⁾CD8⁽⁺⁾CD28⁽⁻⁾ T-suppressor cells subset phenotypes in vitro: comparison of phorbol12-myristate13-acetate/ionomycin and phytohemagglutinin stimulation / H. Wang, V. Daniel, M. Sadeghi et al. // *Transplant Proc.* – 2013. – Vol. 45, № 5. – P. 1822-1831.

255. Wang, J. Cross-linking of GM1 ganglioside by galectin-1 mediates regulatory T cell activity involving TRPC5 channel activation: possible role in suppressing experimental autoimmune encephalomyelitis / J. Wang, Z.H. Lu, H.J. Gabius et al. // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 182, № 7. – P. 4036-4045.
256. Weiss A. T cell antigen receptor signal transduction: a tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases / A. Weiss // *Cell.* – 1993. – Vol. 73, № 2. – P. 209–212.
257. Williamson, P. Phospholipid scramblase activation pathways in lymphocytes / P. Williamson, A. Christie, T. Kohlin et al. // *Biochemistry.* – 2001. – Vol. 40, № 27. – P. 8065-8072.
258. Wilson, N.J. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells / N.J. Wilson, K. Boniface, J.R. Chan et al. // *Nat. Immunol.* – 2007. – Vol. 8, № 9. – P. 950-957.
259. Wlodkowic, D. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death / D. Wlodkowic, W. Telford, J. Skommer et al. // *Methods Cell Biol.* – 2011. – Vol. 103. – P. 55-98.
260. Wu, G. Ganglioside GM1 deficiency in effector T cells from NOD mice induces resistance to regulatory T-cell suppression // G. Wu, Z.H. Lu, H.J. Gabius et al. // *Diabetes.* – 2011. – Vol. 60, № 9. – P. 2341-2349.
261. Wynn, T.A. IL-13 effector functions / T.A. Wynn // *Annu. Rev. Immunol.* – 2003. – Vol. 21. – P. 425-456.
262. Yahagi, A. Suppressed induction of mycobacterial antigen-specific Th1-type CD4⁺ T cells in the lung after pulmonary mycobacterial infection [Electronic resource] / A. Yahagi, M. Umemura, T. Tamura et al. // *Int. Immunol.* – 2010. – Vol. 22, № 4. – Access mode: <http://intimm.oxfordjournals.org/content/22/4/307.long>.
263. Yamamoto, K. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M / K. Yamamoto,

- H. Ichijo, S.J. Korsmeyer // *Mol. Cell. Biol.* – 1999. – Vol. 19, № 2. – P. 8469–8478.
264. Yang, J. Induction of interferon-gamma production in Th1 CD4+ T cells: evidence for two distinct pathways for promoter activation / J. Yang, T.L. Murphy, W. Ouyang et al. // *Eur. J. Immunol.* – 1999. – Vol. 29, № 2. – P. 548–555.
265. Yang, R.Y. Galectins: structure, function and therapeutic potential [Electronic resource] / R.Y. Yang, G.A. Rabinovich, F.T. Liu // *Expert. Rev. Mol. Med.* – 2008. Vol. 13, №10. – Access mode: http://journals.cambridge.org/abstract_S1462399408000719
266. 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.* – 2008. – Vol. 29, № 1. – P. 44–56.
267. Yang, X.O. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells / X.O. Yang, A.D. Panopoulos, R. Nurieva et al. // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282, № 13. – P. 9358–9363.
268. Yang, X.O. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma / X.O. Yang, B.P. Pappu, R. Nurieva et al. // *Immunity.* – 2008. – Vol. 28, № 1. – P. 29–39.
269. Yao, Z. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor / Z. Yao, W.C. Fanslow, M.F. Seldin et al. // *J. Immunol.* – 2011. – Vol. 187, № 9. – P. 4392–4402.
270. Yilmaz, S.B. Serum and tissue levels of IL-17 in different clinical subtypes of psoriasis / S.B. Yilmaz, N. Cicek, M. Coskun et al. // *Arch. Dermatol. Res.* – 2012. – Vol. 304, № 6. – P. 465–469.
271. Yu, J.J. An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals / J.J. Yu, M.J. Ruddy, G.C. Wong et al. // *Blood.* – 2007. – Vol. 109, № 9. – P. 3794–3802.

272. Yu, X. Interaction of the B cell-specific transcriptional coactivator OCA-B and galectin-1 and a possible role in regulating BCR-mediated B cell proliferation / X. Yu, R. Siegel, R.G. Roeder // *J. Biol. Chem.* – 2006. – 281, № 22. – P. 15505-15516.
273. Zaiss, D.M. Amphiregulin, a TH2 cytokine enhancing resistance to nematodes [Electronic resource] / D.M. Zaiss, L. Yang, P.R. Shah et al. // *Science.* – 2006. – Vol. 314, № 5806. – Access mode: <http://www.sciencemag.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=17170297>
274. Zamoyska, R. Signalling in T-lymphocyte development: integration of signalling pathways is the key / R. Zamoyska, M. Lovatt // *Curr. Opin. Immunol.* – 2004. – Vol. 16, № 2. – P. 191-196.
275. Zarek, P.E. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells / P.E. Zarek, C.T. Huang, E.R. Lutz et al. // *Blood.* – 2008. – Vol. 111, № 1. – P. 251-259.
276. Zhang, L. The regulation of Foxp3 expression in regulatory CD4(+)CD25(+)T cells: multiple pathways on the road / L. Zhang, Y. Zhao // *J. Cell. Physiol.* – 2007. – Vol. 211, № 3. – P. 590-597.
277. Zhang, L. Transforming growth factor-beta: an important role in CD4+CD25+ regulatory T cells and immune tolerance / L. Zhang, H. Yi, X.P. Xia et al. // *Autoimmunity.* – 2006. – Vol. 39, № 4. – P. 269–276.
278. Zhou, L. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing ROR γ function / L. Zhou, J.E. Lopes, M.M. Chong et al. // *Nature.* – 2008. – Vol. 453, № 7192. – P. 236-240.
279. Zhou, L. Transcriptional regulatory networks in Th17 cell differentiation / L. Zhou, D.R. Littman // *Curr. Opin. Immunol.* – 2009. – Vol. 21, № 2. – P. 146-152.
280. Zhou, M. The function role of GATA-3 in Th1 and Th2 differentiation / M. Zhou, W. Ouyang // *Immunol. Res.* – 2003. – Vol. 28, № 1. – P. 25-37.

281. Zhou, Q. Cytokine profiling of macrophages exposed to *Porphyromonas gingivalis*, its lipopolysaccharide, or its FimA protein / Q. Zhou, T. Desta, M. Fenton et al. // *Infect. Immun.* – 2005. – Vol. 73, № 2. – P. 935-943
282. Zhou, Y. Amphiregulin, an epidermal growth factor receptor ligand, plays an essential role in the pathogenesis of transforming growth factor- β -induced pulmonary fibrosis / Y. Zhou, J.Y. Lee, C.M. Lee et al. // *Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287, № 50. – P. 41991-2000.
283. Zhu, J. CD4 T cells: fates, functions, and faults / J. Zhu, W.E. Paul // *Blood.* – 2008. – Vol. 112, № 5. – P. 1557-69.
284. Zhu, J. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors / J. Zhu, H. Yamane, J. Cote-Sierra et al. // *Cell. Res.* – 2006. – Vol. 16, № 1. – P. 3-10.
285. Zhuo, Y. Emerging role of alpha2,6-sialic acid as a negative regulator of galectin binding and function / Y. Zhuo, S.L. Bellis // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286, № 8. – P. 5935-5941.
286. Ziegler, S.F. Influence of FOXP3 on CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells / S.F. Ziegler, J.H. Buckner // *Expert. Rev. Clin. Immunol.* – 2006. – Vol. 2, № 4. – P. 639-447.
287. Zorn, E. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells through a STAT dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo / E. Zorn, E.A. Nelson, M. Mohseni et al. // *Blood.* – 2006. – Vol. 108, № 5. – P. 1571–1579.
288. Zúñiga, E. Regulated expression and effect of galectin-1 on *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages: modulation of microbicidal activity and survival / E. Zúñiga, A. Gruppi, J. Hirabayashi et al. // *Infect. Immun.* – 2001. – Vol. 69, № 11. – P. 6804-6812.