

ЭФФЕКТЫ γ с-ЦИТОКИНОВ (IL-2, IL-7 И IL-15) НА СОЗРЕВАНИЕ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ CD45RO⁺CD4⁺/ CD8⁺T-ЛИМФОЦИТОВ *IN VITRO*

Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Тодосенко Н.М., Литвинова Л.С.

ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Резюме. Исследовано влияние γ с-цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на созревание и дифференцировку цитотоксических и хелперных популяций CD45RO⁺T-клеток в условиях гомеостатического культивирования *in vitro*. Выявлено, что IL-2, IL-7 и IL-15 опосредуют созревание и дифференцировку CD8⁺T-лимфоцитов центральной памяти, пополняя популяцию клеток, обладающих эффекторными функциями. Действие IL-2 на CD4⁺T-клетки центральной памяти сопровождается генерацией клеток эффекторной памяти за счет снижения числа незрелых эффекторов – CD62L⁻CD27⁺, тогда как IL-7 стимулирует образование незрелых эффекторов – CD62L⁻CD27⁺. В субпопуляции CD8⁺CD45RO⁺ лимфоцитов IL-2, IL-7 и IL-15 инициируют образование терминально-дифференцированных клеток, обеспечивающих устойчивую иммунологическую память на реинвазию патогена.

Ключевые слова: иммунная память, клетки центральной памяти, клетки эффекторной памяти, терминально-дифференцированные лимфоциты, γ с-цитокины, проточная цитофлюориметрия

EFFECTS OF γ с-CYTOKINES (IL-2, IL-7 AND IL-15) UPON *IN VITRO* MATURATION AND DIFFERENTIATION OF CD4⁺CD45RO⁺/CD8⁺CD45RO⁺ T CELLS

Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Todosenko N.M., Litvinova L.S.

Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Abstract. Effect of γ с-cytokines (IL-2, IL-7 и IL-15) upon maturation and differentiation of cytotoxic and helper CD45RO⁺ T cell population was studied in the homeostatic *in vitro* culture conditions. We have found that IL-2, IL-7 and IL-15 mediate maturation and differentiation of CD8 T cells central memory, replenishing the population of cells that exhibit effector functions. Action of IL-2 on CD4⁺ central memory T cells is associated with generation of effector memory cells by reducing the number of immature effectors (CD62L⁻CD27⁺), whereas IL-7 promotes the formation of immature (CD62L⁻CD27⁺) effectors. IL-2, IL-7 and IL-15 initiate formation of terminally-differentiated cells in a subpopulation of CD8⁺CD45RO⁺ lymphocytes, providing a stable immunological memory to a pathogen reinfestation.

Keywords: immunological memory, central memory T cells, effector memory T cells, terminally differentiated cells, γ с-cytokines, differentiation

Адрес для переписки:

Литвинова Лариса Сергеевна
ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет
имени И. Канта»
236016, Россия, г. Калининград, ул. Боткина, 3.
Тел.: 8 (4012) 59-55-95 (доб. 6631).
E-mail: larisalitvinova@yandex.ru

Address for correspondence:

Litvinova Larisa S.
Immanuel Kant Baltic Federal University
236016, Russian Federation, Kaliningrad, Botkina str., 3.
Phone: 7 (4012) 59-55-95 (acc. 6631).
E-mail: larisalitvinova@yandex.ru

Образец цитирования:

К.А. Юрова, О.Г. Хазиахматова, Н.М. Тодосенко,
Л.С. Литвинова «Эффекты γ с-цитокинов (IL-2, IL-7
и IL-15) на созревание и дифференцировку CD45RO⁺CD4⁺/
CD8⁺T-лимфоцитов *in vitro*» // Медицинская иммунология,
2018. Т. 20, № 1. С. 45-52.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-45-52

© Юрова К.А. и соавт., 2018

For citation:

K.A. Yurova, O.G. Khaziakhmatova, N.M. Todosenko,
L.S. Litvinova "Effects of γ с-cytokines (IL-2, IL-7 and IL-15)
upon *in vitro* maturation and differentiation of CD4⁺CD45RO⁺/
CD8⁺CD45RO⁺ T cells", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 1,
pp. 45-52. doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-45-52

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-1-45-52

Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности («дорожной карты») и субсидии «Организация проведения научных исследований 20.4986.2017/6.7» Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта.

Введение

Способность адаптивной иммунной системы реагировать на патогены различной природы требует постоянного присутствия Т-лимфоцитов иммунной памяти. В зависимости от рецепторного репертуара и функциональной активности, выделяют популяции Т-клеток центральной (T_{CM}), эффекторной (T_{EM}) памяти и пул терминально-дифференцированных лимфоцитов (T_{EMRA}) [5, 6, 37, 39]. T_{CM} экспрессируют на своей поверхности молекулы костимуляции CD27, CD28 и маркеры, определяющие их миграцию во вторичные лимфоидные органы – L-селектин (CD62L) и CCR7 [1, 3, 24, 32, 42]; имеют повышенный пролиферативный потенциал, способность к самообновлению и более длинные теломеры в сравнении с T_{EM} [29]. Для T_{CM} характерна высокая экспрессия антиапоптотических генов, в частности STAT5a, и более низкие уровни проапоптотического белка Vim [34]. Популяции T_{EM} являются гетерогенными по экспрессии CD62L и CD27, мигрируют преимущественно в нелимфоидные ткани и воспаленные участки [24, 32, 42] и содержат в цитоплазме большое количество перфорина, что обеспечивает их высокую цитотоксическую активность и выраженную способностью к немедленной эффекторной функции [42]. Потеря CD27 в процессе клональной экспансии и дифференцировки приводит к появлению Т-клеток с более полным набором эффекторных функций [35].

Согласно современным представлениям, T_{EM} необходимы при реинфекции для немедленной защиты от патогенной инвазии на периферии, осуществляя быструю элиминацию антигена [3], тогда как T_{CM} обеспечивают защиту от системных воздействий, активируясь дендритными клетками во вторичных лимфоидных органах, генерируя антигенспецифический клон эффекторов, способных полностью элиминировать патоген [24, 32, 34, 42]. Существуют данные, что при повторном контакте с антигеном T_{CM} могут пополнять пул T_{EMRA} – наиболее дифференцированной субпопуляции Т-лимфоцитов. T_{EMRA} инфильтрируют периферические ткани, обеспечивая клиренс патогена [1]. В современной литературе вопрос об этапности дифференцировки Т-лимфоцитов до конца не изучен. Рассматривается несколько моделей формирования клеток памяти из «наивных» предшественников [2, 7, 9, 10, 25, 31, 36]. Так, в модели независимой дифференцировки

предполагается, что T_{CM} и T_{EM} могут возникать независимо друг от друга, на основе стохастического прайминга наивных Т-лимфоцитов или в зависимости от условий их стимуляции [10]. Однако исследования Willinger T. и соавт. (2005) убедительно демонстрируют дихотомию между $CD8^+T_{CM}$ и T_{EM}/T_{EMRA} клетками на молекулярном уровне и предполагают, что T_{CM} человека представляют собой промежуточное состояние между лимфоцитами с наивным фенотипом и T_{EM}/T_{EMRA} клетками [41]. В научной периодике встречается большое количество работ, акцентированных на разнице условий для активации и клональной экспансии CD4 и CD8 Т-клеток памяти [4, 16], которые в естественных условиях (*in vivo*) находятся под жестким цитокиновым контролем [17, 38]. Однако данные, касающиеся участия цитокинов семейства I типа, имеющих общую γ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15), в процессе дифференцировки лимфоцитов иммунной памяти, ограничены и крайне противоречивы [19].

В связи с вышесказанным целью настоящего исследования стал анализ действия γ -цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) на созревание и дифференцировку $CD45RO^+CD4^+/CD45RO^+CD8^+$ Т-клеток, ассоциированных с изменением фенотипа, в гомеостатической модели культивирования *in vitro*.

Материалы и методы

Исследование проводилось согласно протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. и Хельсинской декларации ВМА 2000 г. Разрешение на проведение исследования получено в локальном этическом комитете БФУ им. И. Канта (г. Калининград) № 5 от 05.11.2013.

Материалом для исследования служили мононуклеарные клетки (МНК) периферической венозной крови 58 условно здоровых доноров (29 мужчин и 29 женщин в возрасте от 22 до 35 лет). Выделение МНК осуществляли стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографин (Pharmacia, Швеция) ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$). Для выделения фракции $CD45RO^+$ Т-клеток использовали метод иммуномагнитной сепарации, в основе которого лежит технология MACS® (Miltenyi Biotec, Германия), основанная на использовании суперпарамагнитных частиц MACS MicroBeads, конъюгированных с высокоспецифичными моноклональными антителами (МАТ).

Для сепарации были использованы МАТ $CD45RO^+$ с магнитными частицами (MicroBeads human, Miltenyi Biotec, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Отсутствие В-лимфоцитов ($CD19^+$) и моноцитов ($CD14^+$) в культурах $CD45RO^+$ клеток до и после куль-

тивирования было подтверждено с помощью проточной цитометрии с использованием МАТ, конъюгированных с FITC (CD3), PE (CD14) (Abcam, Великобритания), с конъюгатом PE с цианином (PE-Cy7) (CD45RO) или с пиридинхлорофиллом (PerCP) (CD19) (e-Bioscience, США). Анализ поверхностных маркеров был проведен на проточном цитофлюориметре MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия), согласно протоколам производителей. В работе были использованы культуры клеток, содержание в которых CD3⁺CD45RO⁺CD14⁻CD19⁻ лимфоцитов составляло в среднем 98,5±1,5%.

Для реализации поставленной цели нами была использована гомеостатическая модель культивирования, предполагающая создание *in vitro* условий гомеостатического влияния рекомбинантных форм γ -цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на CD45RO⁺T-лимфоциты.

CD45RO⁺ лимфоциты (1×10^6 кл/мл) культивировали в 48-луночных планшетах в бессывороточной среде Искова (Sigma, США), содержащей 0,5% сывороточного альбумина человека («Микроген», Россия), 5×10^{-5} М β -меркаптоэтанола (Acros Organics, США) и 30 мкг/мл гентамицина, в присутствии рекомбинантных форм цитокинов – IL-2, IL-7, IL-15 (Miltenyi Biotec, Германия) в разных концентрациях или без них (контроль) в течение 48 ч при 37 °С, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂.

Были использованы следующие варианты культивирования: 1) контрольная проба (без добавления цитокинов); 2) пробы с добавлением rIL-2 (0,1 нг/мл; 0,5 нг/мл; 1,0 нг/мл); 3) пробы с добавлением rIL-7 (0,1 нг/мл; 0,5 нг/мл; 1,0 нг/мл); 4) пробы с добавлением rIL-15 (0,1 нг/мл; 0,5 нг/мл; 1,0 нг/мл).

Регистрацию жизнеспособности и подсчет числа клеток по истечению срока инкубации в исследуемых клеточных культурах проводили методом проточной лазерной цитометрии на проточном цитометре Guava EasyCite Plus (Millipore, США) с использованием программы Guava ViaCount (Millipore, США), согласно протоколу производителя. Жизнеспособность составляла 95-98% от общего числа клеток.

Количество CD45RO⁺ лимфоцитов, экспрессирующих молекулы дифференцировки (CD3⁺, CD45RO⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD62L⁺, CD27⁺), определяли с помощью метода проточной лазерной двухцветной цитометрии с использованием коктейля МАТ, конъюгированных с аллофикицином (APC) (CD45RO), Viablue (CD3), FITC (CD4) (Miltenyi Biotec, Германия); PE (CD62L), с конъюгатом PerCP с цианином (Cy5.5) (CD8), PE-Cy7 (CD27) (Abcam, Великобритания), согласно протоколу производителя. Регистрацию

результатов проводили на проточном цитометре MACSQuant (Miltenyi Biotec, Германия).

Полученные данные оценивали с использованием пакета статистических программ IBM SPSS Statistics 2.0 (Statistical Package for the Social Sciences). Для анализа имеющихся выборок была использована гипотеза нормальности распределения (Колмогорова–Смирнова). Полученные данные не подчинялись нормальному закону распределения, для них рассчитывали медиану (М) и квартили (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Статистически значимых гендерных различий обнаружено не было. Сравнительный анализ проводился с помощью непараметрического критерия Вилкоксона для зависимых выборок. С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями был проведен корреляционный анализ Спирмена. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

После окончания времени инкубации (48 ч) число T_{CM} (CD4⁺CD62L⁺CD27⁺) в интактных культурах CD4⁺CD45RO⁺T-клеток составило 54,12 (49,02-58,66) %. Количество незрелых эффекторных клеток CD62L⁻CD27⁺ и зрелых эффекторов CD62L⁻CD27⁻ (T_{EM}) было равным 10,36 (8,07-13,26) и 18,47 (18,28-20,16) % соответственно. Также в популяции CD4⁺CD45RO⁺T-клеток нами была обнаружена минорная популяция CD62L⁺CD27⁻, которая предположительно представляет собой индуцируемую *in vitro* переходную форму между T_{CM} и T_{EM} лимфоцитами, составляющую 13,38 (11,51-15,98) % (табл. 1).

Не менее интересным было субпопуляционное распределение цитотоксических CD45RO⁺T-клеток. Количество T_{CM} (CD62L⁺CD27⁺) в интактных пробах было равным 21,19 (20,76-27,24) %, что оказалось в 2 раза меньше числа T-клеток с аналогичным фенотипом в CD4⁺CD45RO⁺ популяции; содержание зрелых эффекторных клеток CD62L⁻CD27⁻ (T_{EM}) составило 34,09 (24,51-39,48) %, а незрелых эффекторов CD62L⁻CD27⁺ – 31,90 (30,51-42,48) % (табл. 2). Как и в популяции хелперных T-клеток, нами были обнаружены T-клетки с фенотипом CD62L⁺CD27⁻.

Установлено, что T-клетки памяти в естественных условиях (*in vivo*) поддерживают свое численное постоянство за счет гомеостатической пролиферации, опосредованной действием γ -цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) [17, 27].

При этом цитокины могут проявлять разнонаправленные эффекты на T-лимфоциты, в зависимости от дифференцировки клеток и их функциональной активности [17, 19, 27]. Эти данные позволяют предположить, что для поддержания гомеостаза и функциональной активности

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ CD4⁺Т-КЛЕТОК (%) В КУЛЬТУРАХ CD45RO⁺Т-ЛИМФОЦИТОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ МЕМБРАННЫЕ МОЛЕКУЛЫ CD62L И CD27, АССОЦИИРОВАННЫЕ СО СТЕПЕНЬЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ Т-КЛЕТОК, В УСЛОВИЯХ ИНКУБАЦИИ С γ С-ЦИТОКИНАМИ (IL-2, IL-7 И IL-15) В УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO*, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})
TABLE 1. PERCENTAGE OF CD4⁺ T CELLS (%) IN CULTURES OF CD45RO⁺ T LYMPHOCYTES EXPRESSING MEMBRANE MOLECULES CD62L AND CD27 ASSOCIATED WITH THE DEGREE OF T CELL DIFFERENTIATION INDUCED BY *IN VITRO* ADDITION OF γ C-CYTOKINES (IL-2, IL-7 AND IL-15), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Варианты культивирования Variants of cultivation	CD45RO ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺			
	CD62L ⁻ CD27 ⁻	CD62L ⁻ CD27 ⁺	CD62L ⁺ CD27 ⁺	CD62L ⁺ CD27 ⁻
Контрольная проба Control samples	18,47 (18,28-20,16)	10,36 (8,07-13,26)	54,12 (49,02-58,66)	13,38 (11,51-15,98)
IL-2 (0,1 нг/мл) (0.1 ng/ml)	15,80 (13,95-21,62)	11,06 (7,25-14,87)	57,09 (48,78-64,51)	14,40 (11,49-15,69)
IL-2 (0,5 нг/мл) (0.5 ng/ml)	17,23 (14,88-21,15)	10,11 (8,12-13,40)	58,61 (48,50-63,39)	12,72 (12,29-13,85)
IL-2 (1,0 нг/мл) (1.0 ng/ml)	26,32 (21,62-28,55) p ₀ < 0,05	5,97 (3,22-6,55) p ₀ < 0,05	50,93 (48,62-51,87)	13,40 (12,43-14,81)
IL-7 (0,1 нг/мл) (0.1 ng/ml)	18,75 (17,91-19,72)	10,92 (8,42-14,36)	54,67 (48,01-60,33)	13,36 (10,09-15,20)
IL-7 (0,5 нг/мл) (0.5 ng/ml)	18,94 (16,89-19,68)	9,85 (7,07-12,82)	56,61 (50,22-62,24)	12,45 (12,30-13,78)
IL-7 (1,0 нг/мл) (1.0 ng/ml)	17,25 (15,52-18,61)	11,36 (7,45-12,14) p ₀ < 0,05	47,71 (45,08-51,50) p ₀ < 0,05	12,37 (10,50-15,29)
IL-15 (0,1 нг/мл) (0.1 ng/ml)	20,51 (18,37-21,13)	10,69 (6,94-12,95)	53,28 (48,21-58,56)	13,86 (11,73-14,53)
IL-15 (0,5 нг/мл) (0.5 ng/ml)	18,97 (16,75-20,67)	11,62 (6,54-12,12)	54,19 (48,16-61,62)	13,69 (12,23-14,74)
IL-15 (1,0 нг/мл) (1.0 ng/ml)	19,80 (15,40-20,91)	10,31 (8,37-12,74)	55,46 (49,03-62,70)	13,53 (13,31-14,14)

Примечание. p₀ – достоверность различий по сравнению с контрольной пробой.

Note. p₀, significance of differences in comparison with the control sample.

CD4⁺/CD8⁺T_{CM}⁻ и T_{EM}-лимфоцитов требуются разные стимулы [19].

IL-2 принимает участие во многих аспектах Т-клеточного гомеостаза, являясь мощным активатором пролиферации всех субпопуляций Т-клеток и способствуя дифференцировке цитотоксических лимфоцитов и регуляторных Т-клеток [4]. Полученные нами данные свидетельствуют о способности IL-2 (1,0 нг/мл) повышать число зрелых эффекторных CD4⁺CD45RO⁺/CD8⁺CD45RO⁺Т-клеток на фоне снижения числа незрелых эффекторов CD62L⁻CD27⁺ и лимфоцитов центральной памяти CD62L⁺CD27⁺ (табл. 1, 2). Аналогичное действие на цитотоксические T_{CM} лимфоциты оказывал IL-15 (1,0 нг/мл) (табл. 2).

IL-15, имея аналогичные β - (CD122) и γ - (CD132) цепи, во многом обладает биологическими функциями, свойственными IL-2. Особенности действия цитокинов обусловлены наличием специфичных α -субъединиц в составе рецепторных комплексов и гетерогенной экспрессией всех компонентов рецепторов на разных типах клеток [13]. Ма А. и коллегами (2006) были получены приоритетные данные о важности IL-15 в гомеостазе CD8⁺Т-клеток памяти, в отличие от наивных CD8⁺ лимфоцитов и CD4⁺Т-клеток памяти, что, вероятно, обусловлено высокой экспрессией β -цепи, которая имеет положительную корреляцию с чувствительностью лимфоцитов к действию IL-15 [28]. Кроме того, установлено,

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ CD8⁺Т-КЛЕТОК (%) В КУЛЬТУРАХ CD45RO⁺Т-ЛИМФОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ИНКУБАЦИИ С γ -ЦИТОКИНАМИ (IL-2, IL-7 И IL-15) В УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO*, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. PERCENTAGE OF CD8⁺ T CELLS (%) IN CULTURES OF CD45RO⁺ T LYMPHOCYTES WITH *IN VITRO* ADDED γ -CYTOKINES (IL-2, IL-7 AND IL-15), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Варианты культивирования Variants of cultivation	CD45RO ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺			
	CD62L ⁻ CD27 ⁻	CD62L ⁻ CD27 ⁺	CD62L ⁺ CD27 ⁺	CD62L ⁺ CD27 ⁻
Контрольная проба Control sample	34,09 (24,51-39,48)	31,90 (30,51-42,48)	21,19 (20,76-27,24)	13,38 (11,51-15,98)
IL-2 (0,1 нг/мл) (0.1 ng/ml)	32,64 (25,35-36,80)	29,45 (23,39-33,20)	18,60 (17,89-23,60)	12,47 (6,29-13,75)
IL-2 (0,5 нг/мл) (0.5 ng/ml)	31,77 (25,76-41,40)	27,84 (24,59-32,31)	19,56 (17,12-27,63)	11,24 (8,12-13,22)
IL-2 (1,0 нг/мл) (1.0 ng/ml)	45,63 (42,10-51,51) $p_0 < 0,05$	20,01 (16,66-28,29) $p_0 < 0,05$	17,58 (14,10-18,69) $p_0 < 0,05$	11,15 (8,23-16,73)
IL-7 (0,1 нг/мл) (0.1 ng/ml)	36,75 (28,96-44,82)	31,08 (26,27-36,28)	19,63 (14,05-29,96)	13,50 (12,57-14,12)
IL-7 (0,5 нг/мл) (0.5 ng/ml)	33,58 (31,61-41,86)	29,73 (28,00-33,85)	20,65 (18,29-28,32)	15,72 (13,86-16,57)
IL-7 (1,0 нг/мл) (1.0 ng/ml)	42,80 (36,38-50,98) $p_0 < 0,05$	22,04 (20,50-26,70) $p_0 < 0,05$	15,74 (14,55-19,64) $p_0 < 0,05$	7,97 (4,80-9,98)
IL-15 (0,1 нг/мл) (0.1 ng/ml)	35,76 (23,40-43,99)	31,80 (28,22-36,15)	18,21 (15,77-27,65)	12,97 (9,15-14,29)
IL-15 (0,5 нг/мл) (0.5 ng/ml)	31,85 (25,33-39,43)	32,98 (27,29-37,81)	19,21 (16,00-25,58)	14,83 (12,63-16,74)
IL-15 (1,0 нг/мл) (1.0 ng/ml)	44,37 (36,51-51,55) $p_0 < 0,05$	23,49 (17,26-32,37) $p_0 < 0,05$	15,84 (13,01-27,13) $p_0 < 0,05$	13,53 (10,73-17,73)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As in Table 1.

что цитотоксические Т-лимфоциты не нуждаются в экспрессии IL-15 α и могут отвечать на IL-15 только CD122⁺ и CD132⁺ [11]. Выявленные нами закономерности согласуются с данными зарубежных авторов. Исследования, проведенные Lanzavecchia A. (2002) и Vouneaud C. (2005), убедительно доказали, что в отсутствие повторного антигенного стимула T_{CM} могут дифференцироваться в T_{EM} в присутствии IL-15 для пополнения пула эффекторных клеток [10, 23].

Анализ корреляционных взаимосвязей между содержанием Т-лимфоцитов центральной памяти, а также зрелых и незрелых клеток эффекторной памяти при действии исследуемых концентраций γ -цитокинов показал, что наибольший коэффициент корреляции связывает показатели содержания CD4⁺CD62L⁻CD27⁻ (T_{EM}) лимфоци-

тов и число незрелых эффекторов – CD4⁺CD62L⁻CD27⁺ при действии IL-2 (1,0 нг/мл) ($r = -0,80$, $p < 0,05$).

В CD8⁺CD45RO⁺ популяции IL-2 и IL-15 (1,0 нг/мл) способствовали повышению числа клеток эффекторной памяти за счет снижения количества CD62L⁺CD27⁺ (T_{CM}) Т-лимфоцитов ($r = -0,70$ и $r = -0,65$, $p < 0,05$ при действии IL-2 и IL-15 (1,0 нг/мл) соответственно); а также уменьшения содержания незрелых эффекторов CD62L⁻CD27⁺ ($r = -0,56$ и $r = -0,70$, $p < 0,05$ при действии IL-2 и IL-15 [1,0 нг/мл] соответственно).

CD4⁺CD45RO⁺Т-клетки оказались нечувствительными к действию IL-15, что может быть связано с низкой поверхностной экспрессией CD122⁺ на мембране CD4⁺Т-клеток [18, 20, 33, 38]. Учитывая тот факт, что CD4⁺Т-клетки явля-

ются основными продуцентами IL-2 [4], отсутствие их ответа на экзогенный IL-15 может быть обусловлено конкуренцией между IL-2 и IL-15 за связывание с рецепторами IL-2/IL-15R β и общей γ -цепью [20].

IL-7 (1,0 нг/мл) в популяции CD4⁺CD45RO⁺T-клеток повышал содержание незрелых T_{EM} (табл. 1), тогда как в популяции CD8⁺CD45RO⁺клеток IL-7 (1,0 нг/мл) инициировал генерацию зрелых T_{EM} на фоне снижения незрелых T_{EM} и T_{CM} (табл. 2).

Существуют убедительные доказательства, что гомеостаз и выживание CD8⁺T-клеток памяти зависят от IL-7-сигналов и могут быть опосредованы через антиапоптотические молекулы Bcl-2 или MCL-1 [21, 30]. Согласно данным научной периодики, IL-7 может способствовать дифференцировке лимфоцитов центральной памяти в клетки эффекторной памяти даже в отсутствие антигенного стимула [10].

Следует отметить тот факт, что гомеостатическая пролиферация CD8⁺ лимфоцитов контролируется несколькими цитокинами: IL-15 может компенсировать отсутствие IL-7 и наоборот. Таким образом, IL-15 и IL-7 являются функционально взаимозаменяемыми и при отсутствии одного из цитокинов любой из них способен индуцировать пролиферацию CD8⁺T-лимфоцитов памяти [20, 33, 38].

Нами были получены приоритетные данные о влиянии γ с-цитокинов на образование терминально-дифференцированных эффекторов в условиях культивирования *in vitro*. Так, аппликация IL-2, IL-7 и IL-15 (1,0 нг/мл) в культуры CD8⁺CD45RO⁺T-клеток способствовала повышению содержания лимфоцитов с фенотипом T_{EMRA} CD45RO⁺CD62L⁻CD27⁻, за счет снижения количества T-клеток центральной памяти. Этот тезис был подтвержден выявленной сильной корреляционной связью CD45RO⁺CD62L⁺CD27⁺T-лимфоцитов и CD45RO⁺CD62L⁻CD27⁻ клеток ($r = -0,83$, $p < 0,05$ при действии IL-2 [1,0 нг/мл]).

Добавление IL-7 (1,0 нг/мл) в культуры CD4⁺CD45RO⁺T-лимфоцитов индуцировало образование незрелых T_{EMRA} T-хелперов CD45RO⁺CD62L⁻CD27⁺, преимущественно за счет снижения числа T-клеток с фенотипом центральной памяти, что было подтверждено корреляционной зависимостью между числом CD45RO⁺CD62L⁻CD27⁺ и CD45RO⁺CD62L⁺CD27⁺ лимфоцитов ($r = -0,58$, $p < 0,05$).

T_{EMRA} лимфоциты обладают низкой пролиферативной активностью, характеризуются потерей костимулирующих рецепторов CD28, CD27, CCR7, усиленной восприимчивостью к апоптозу, высоким цитотоксическим потенциалом, ассоциированным с повышенным уровнем экспрес-

сии FasL, перфорина и гранзима B, а также продукцией провоспалительных медиаторов (IFN γ и TNF α) [14, 15, 40].

Большинство исследователей сходятся во мнении, что T_{EMRA} клетки не могут быть получены с помощью антигенной стимуляции, клетки с фенотипом, соответствующим T_{EMRA}, генерируются преимущественно за счет субпопуляции T_{CM} при цитокиновой стимуляции [18, 37].

Ряд проведенных исследований убедительно доказали, что интенсивное и постоянное воздействие IL-2 способствует образованию CD8⁺T_{EMRA} [22]. Группой зарубежных авторов было установлено, что CD8⁺T-клетки, повторно экспрессирующие молекулу CD45RA, дифференцируются из T_{CM} – CD8⁺CD45RA⁻CCR7⁺ в присутствии IL-7 и IL-15 в отсутствие антигенного стимула, вероятно, за счет гомеостатической пролиферации CD45RA⁻CCR7⁺ прекурсоров, в связи с повышенной гибелью CD45R⁺CCR7⁻ клеток и их низкой способностью к рециркуляции в организме [18]. Вызывают интерес результаты, полученные Libri V. (2011), в которых экспериментально продемонстрировано, что IL-7 индуцирует реэкспрессию молекулы CD45RA в популяциях хелперных T-клеток с центральным фенотипом. Подобным действием на CD4⁺ лимфоциты, в меньшей степени, чем IL-7, обладали IL-2 и IL-15 [26]. Предполагают, что *in vivo* клетки ре-экспрессирующие молекулу CD45RA обеспечивают устойчивую иммунную память против антигенов, которые элиминированы из организма [8, 12]. В соответствии с этой точкой зрения, клетки, реэкспрессирующие молекулу CD45RA, представляют собой популяцию покоящихся T-клеток памяти, которые могут быть повторно активированы для выполнения эффекторных функций [14].

Таким образом, проведенное исследование позволило доказать, что γ с-цитокины (IL-2, IL-7 и IL-15) в гомеостатической модели *in vitro* опосредуют дифференцировку CD8⁺ лимфоцитов с фенотипом центральной памяти (T_{CM}) в эффекторные T-клетки (T_{EM} и T_{EMRA}). В хелперной популяции IL-2 инициирует созревание CD45RO⁺T-клеток в T-клетки эффекторной памяти за счет снижения незрелых эффекторов – CD62L⁻CD27⁺. Действие IL-7 на CD45RO⁺CD4⁺T-лимфоциты ассоциировано с генерацией незрелых эффекторов (T_{EM}) и терминально-дифференцированных клеток (T_{EMRA}) за счет T-клеток с фенотипом центральной памяти (T_{CM}). Полученные нами в условиях *in vitro* экспериментальные данные подтверждают факт линейной дифференцировки T_{CM} в T_{EM}/T_{EMRA} под действием γ с-цитокинов.

Список литературы / References

1. Иванова И.П., Савкин И.В., Селедцова Г.В., Шишков А.А., Селедцов В.И. Фенотипические характеристики и внутриклеточные цитокины Т-клеток памяти у больных рассеянным склерозом после Т-клеточной вакцинации // *Acta Biomedica Scientifica*, 2012. № 3-2 (85). С. 79-82. [Ivanova I.P., Savkin I.V., Seledtsova G.V., Shishkov A.A., Seledtsov V.I. Phenotypic characterization and intracellular cytokines of memory T-cells in multiple sclerosis patients after T-cell vaccination. *Acta Biomedica Scientifica = Acta Biomedica Scientifica*, 2012, no. 3-2 (85), pp. 79-82. (In Russ.)]
2. Кудрявцев И.В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки // *Российский иммунологический журнал*, 2014. Т. 8, № 4 (17). С. 947-964. [Kudryavtsev I.V. T cells: major populations and stages of differentiation. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8, no. 4, pp. 947-964. (In Russ.)]
3. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Копыльцова Е.А., Алешкин В.А. Возрастная динамика экспрессии изоформ CD45 Т-хелперами и Т-цитотоксическими лимфоцитами крови здоровых доноров // *Иммунология*, 2014. № 4. С. 229-232. [Toptygina A.P., Semikina E.L., Kopyltsova E.A., Alyoshkin V.A. Age-dependent dynamics of the CD45 isoforms expression on the T-helper and T-cytotoxic lymphocytes in the blood of the healthy people. *Immunologiya = Immunology*, 2014, Vol. 35, no. 4, pp. 229-232. (In Russ.)]
4. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p.
5. Ahlers J.D., Belyakov I.M. Memories that last forever: strategies for optimizing vaccine T-cell memory. *Blood*, 2010, Vol. 115, no. 9, pp. 1678-1689.
6. Alves N.L., Hooibrink B., Arosa F.A., van Lier R.A. IL-15 induces antigen-independent expansion and differentiation of human naive CD8⁺ T cells *in vitro*. *Blood*, 2003, Vol. 102, no. 7, pp. 2541-2546.
7. Appay V., Dunbar P.R., Callan M., Klenerman P., Gillespie G.M., Papagno L., Ogg G.S., King A., Lechner F., Spina C.A., Little S., Havlir D.V., Richman D.D., Gruener N., Pape G., Waters A., Easterbrook P., Salio M., Cerundolo V., McMichael A.J., Rowland-Jones S.L. Memory CD8⁺ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat. Med.*, 2002, Vol. 8, pp. 379-385.
8. Bell E.B., Sparshott S.M., Bunce C. CD4⁺ T-cell memory, CD45R subsets and the persistence of antigen – a unifying concept. *Immunol. Today*, 1998, Vol. 19, no. 2, pp. 60-64.
9. Berger C., Jensen M.C., Lansdorp P.M., Gough M., Elliott C., Riddell S.R. Adoptive transfer of effector CD8⁺ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *J. Clin. Invest.*, 2008, Vol. 118, no. 1, pp. 294-305.
10. Bouneaud C., Garcia Z., Kourilsky P., Pannetier C. Lineage relationships, homeostasis, and recall capacities of central- and effector-memory CD8 T cells *in vivo*. *J. Exp. Med.*, 2005, Vol. 201, pp. 579-590.
11. Burkett P.R., Koka R., Chien M., Chai S., Chan F., Ma A., Boone D.L. IL-15R α expression on CD8⁺ T cells is dispensable for T cell memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, Vol. 100, no. 8, pp. 4724-4729.
12. Carrasco J., Godelaine D., van Pel A., Boon T., van der Bruggen P. CD45RA on human CD8 T cells is sensitive to the time elapsed since the last antigenic stimulation. *Blood*, 2006, Vol. 108, no. 9, pp. 2897-2905.
13. Cooper M.A., Bush J.E., Fehniger T.A., van Deusen J.B., Waite R.E., Liu Y., Aguila H.L., Caligiuri M.A. In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells. *Blood*, 2002, Vol. 100, no. 10, pp. 3633-3638.
14. Dunne P.J., Faint J.M., Gudgeon N.H., Fletcher J.M., Plunkett F.J., Soares M.V., Hislop A.D., Annels N.E., Rickinson A.B., Salmon M., Akbar A.N. Epstein-Barr virus-specific CD8(+) T cells that re-express CD45RA are apoptosis-resistant memory cells that retain replicative potential. *Blood*, 2002, Vol. 100, no. 3, pp. 933-940.
15. Faint J.M., Annels N.E., Curnow S.J., Shields P., Pilling D., Hislop A.D., Wu L., Akbar A.N., Buckley C.D., Moss P.A., Adams D.H., Rickinson A.B., Salmon M. Memory T cells constitute a subset of the human CD8⁺CD45RA⁺ pool with distinct phenotypic and migratory characteristics. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, no. 1, pp. 212-220.
16. Foulds K.E., Zenewicz L.A., Shedlock D.J., Jiang J., Troy A.E., Shen H. Cutting edge: CD4 and CD8 T cells are intrinsically different in their proliferative responses. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 168, no. 4, pp. 1528-1532.
17. Geginat J., Campagnaro S., Sallusto F., Lanzavecchia A. TCR-independent proliferation and differentiation of human CD4⁺ T cell subsets induced by cytokines. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2002, Vol. 512, pp. 107-112.
18. Geginat J., Lanzavecchia A., Sallusto F. Proliferation and differentiation potential of human CD8⁺ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood*, 2003, Vol. 101, no. 11, pp. 4260-4266.
19. Geginat J., Sallusto F., Lanzavecchia A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. *J. Exp. Med.*, 2001, Vol. 194, no. 12, pp. 1711-1719.
20. Goldrath A.W., Sivakumar P.V., Glaccum M., Kennedy M.K., Bevan M.J., Benoist C., Mathis D., Butz E.A. Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8⁺ T cells. *J. Exp. Med.*, 2002, Vol. 195, no. 12, pp. 1515-1522.
21. Jiang Q., Li W.Q., Hofmeister R.R., Young H.A., Hodge D.R., Keller J.R., Khaled A.R., Durum S.K. Distinct regions of the interleukin-7 receptor regulate different Bcl2 family members. *Mol. Cell. Biol.*, 2004, Vol. 24, no. 14, pp. 6501-6513.
22. Kalia V., Sarkar S., Subramaniam S., Haining W.N., Smith K.A., Ahmed R. Prolonged interleukin-2R α expression on virus-specific CD8⁺ T cells favors terminal-effector differentiation *in vivo*. *Immunity*, 2010, Vol. 32, no. 1, pp. 91-103.
23. Lanzavecchia A., Sallusto F. Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nat. Rev. Immunol.*, 2002, Vol. 2, pp. 982-987.
24. Lefrançois L. Development, trafficking, and function of memory T-cell subsets. *Immunol. Rev.*, 2006, Vol. 211, pp. 93-103.

25. Lefrançois L., Marzo A. The descent of memory T-cell subsets. *Nat. Rev. Immunol.*, 2006, Vol. 6, pp. 618-623.
26. Libri V., Azevedo R.I., Jackson S.E., Di Mitri D., Lachmann R., Fuhrmann S., Vukmanovic-Stejić M., Yong K., Battistini L., Kern F., Soares M.V., Akbar A.N. Cytomegalovirus infection induces the accumulation of short-lived, multifunctional CD4⁺CD45RA⁺CD27⁺ T cells: the potential involvement of interleukin-7 in this process. *Immunology*, 2011, Vol. 132, no. 3, pp. 326-339.
27. Litvinova L.S., Sokhnevich N.A., Gutsol A.A., Kofanova K.A. Influence of immunoregulatory cytokines (IL-2, IL-7 and IL-15) *in vitro* upon activation, proliferation and apoptosis of immune memory T-cells. *Cell and tissue biology*, 2013, Vol. 7, no. 6, pp. 539-544.
28. Ma A., Koka R., Burkett P. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.*, 2006, Vol. 24, pp. 657-679.
29. Mahnke Y.D., Brodie T.M., Sallusto F., Roederer M., Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur. J. Immunol.*, 2013, Vol. 43, no. 11, pp. 2797-2809.
30. Marsden V.S., Strasser A. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu. Rev. Immunol.*, 2003, Vol. 21, pp. 72-105.
31. Marzo A.L., Klonowski K.D., le Bon A., Borrow P., Tough D.F., Lefrançois L. Initial T cell frequency dictates memory CD8⁺ T cell lineage commitment. *Nat. Immunol.*, 2005, Vol. 6, pp. 793-799.
32. Mora J.R., von Andrian U.H. T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. *Trends Immunol.*, 2006, Vol. 27, no. 5, pp. 235-243.
33. Prlic M., Lefrançois L., Jameson S.C. Multiple Choices: regulation of memory CD8 T cell generation and homeostasis by interleukin (IL)-7 and IL-15. *J. Exp. Med.*, 2002, Vol. 195, no. 12, F49-52.
34. Riou C., Yassine-Diab B., van Grevenynghe J., Somogyi R., Greller L.D., Gagnon D., Gimmig S., Wilkinson P., Shi Y., Cameron M.J., Campos-Gonzalez R., Balderas R.S., Kelvin D., Sekaly R.-P., Haddad E.K. Convergence of TCR and cytokine signaling leads to FOXO3a phosphorylation and drives the survival of CD4⁺ central memory T cells. *J. Exp. Med.*, 2007, Vol. 204, no. 1, pp. 79-91.
35. Romero P., Zippelius A., Kurth I., Pittet M.J., Touvrey C., Iancu E.M., Corthesy P., Devevre E., Speiser D.E., Rufer N. Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8⁺ T lymphocytes. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 7, pp. 4112-4119.
36. Saito S., Nakashima A., Shima T., Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2010, Vol. 63, no. 6, pp. 601-610.
37. Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 22, pp. 745-763.
38. Tan J.T., Ernst B., Kieper W.C., LeRoy E., Sprent J., Surh C.D. Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8⁺ cells but are not required for memory phenotype CD4⁺ cells. *J. Exp. Med.*, 2002, Vol. 195, no. 12, pp. 1523-1532.
39. Unsoeld H., Pircher H. Complex memory T-cell phenotypes revealed by coexpression of CD62L and CCR7. *J. Virol.*, 2005, Vol. 79, pp. 4510-4513.
40. van Leeuwen E.M., Gamadia L.E., Baars P.A., Remmerswaal E.B., ten Berge I.J., van Lier R.A. Proliferation requirements of cytomegalovirus-specific, effector-type human CD8⁺ T cells. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 169, no. 10, pp. 5838-5843.
41. Willinger T., Freeman T., Hasegawa H., McMichael A.J., Callan M.F. Molecular signatures distinguish human central memory from effector memory CD8 T cell subsets. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 175, no. 9, pp. 5895-5903.
42. Yang S., Liu F., Wang Q.J., Rosenberg S.A., Morgan R.A. The shedding of CD62L (L-selectin) regulates the acquisition of lytic activity in human tumor reactive T lymphocytes. *PLoS ONE*, 2011, Vol. 6, no. 7, e22560. doi: 10.1371/journal.pone.0022560.

Авторы:

Юрова К.А. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Хазиахматова О.Г. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Тодосенко Н.М. — аспирант, младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Литвинова Л.С. — д.м.н., заведующая лабораторией иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Authors:

Yurova K.A., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Khaziakhmatova O.G., PhD (Biology), Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Todosenko N.M., Junior Research Associate, Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Litvinova L.S., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Поступила 21.07.2017

Отправлена на доработку 22.09.2017

Принята к печати 25.09.2017

Received 21.07.2017

Revision received 22.09.2017

Accepted 25.09.2017