

ЭФФЕКТЫ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ ЦИТОКИНОВ (IL-2, IL-7 И IL-15) НА ПРОЦЕССЫ АКТИВАЦИИ, ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОТИЧЕСКОЙ ГИБЕЛИ Т-КЛЕТОК ИММУННОЙ ПАМЯТИ IN VITRO

© Л. С. Литвинова,¹ Н. А. Сохоневич, А. А. Гуцол, К. А. Кофанова

Лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий
Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта,
Калининград, Россия ¹ e-mail: larisalitvinova@yandex.ru

В экспериментальных условиях *in vitro* проведено исследование эффектов иммунорегуляторных цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на активацию, пролиферацию и апоптоз разных субпопуляций Т-клеток иммунной памяти (CD45RO⁺) у здоровых доноров. Продемонстрировано, что эффекты rIL-2 *in vitro* в равной степени затрагивают процессы активации и пролиферации CD4⁺- и CD8⁺-субпопуляций Т-клеток памяти. Показано, что высокие концентрации rIL-2 приводят к росту числа CD8⁺-клеток памяти, экспрессирующих молекулу апоптоза CD95. Выявлено разнонаправленное действие IL-7 и IL-15 на процессы активации и пролиферации цитотоксических CD8⁺-лимфоцитов памяти *in vitro*. CD4⁺-лимфоциты памяти обладают относительной резистентностью к активационному и пролиферативному действию rIL-7 и rIL-15 по сравнению с эффектами rIL-2, что может обеспечивать их относительную устойчивость к активационному апоптозу, а также создавать необходимые предпосылки для ускоренной реализации их функционального потенциала в процессе развития вторичного иммунного ответа. В целом изучение опосредованных цитокинами механизмов активации Т-клеток памяти в условиях отсутствия антигенного стимула может иметь актуальность при расшифровке механизмов формирования патологии, ассоциированной с хроническим иммунным дисбалансом.

Ключевые слова: Т-клетки памяти, цитокины, активация, пролиферация, апоптоз.

Принятые сокращения: МКАТ — моноклональные антитела, CD — кластер дифференцировки, GM-CSF — гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, IFN- γ — интерферон-гамма, IL — интерлейкин, rIL-рекомбинантные цитокины, Th — Т-лимфоциты-хелперы, TNF — фактор некроза опухоли.

Сохранение Т-клеток иммунной памяти *in vivo* в отсутствие антигенного стимула регулируется процессами их гомеостатической пролиферации и апоптотической гибели. Вместе с тем важной характерологической особенностью лимфоцитов, ответственных за иммунологическую память, является обеспечение ускоренной иммунной реакции в ответ на повторное антигенное воздействие (Luskey et al., 2006).

Роль иммунной памяти при различных заболеваниях неоднозначна и может иметь как позитивное, так и негативное значение, что определяет необходимость поиска эффективных способов ее регуляции, нацеленных в одном случае (инфекционные и опухолевые заболевания) на усиление, а в другом (аутоиммунная патология, аллергии) — на подавление иммунных процессов. В современной медицине одним из перспективных подходов в терапии широкого круга заболеваний является разработка технологий управления опосредованными цитокинами механизмами межклеточной кооперации, процессами пролиферации, дифференцировки и клеточной гибели (Romano et al., 2006).

Цитокины семейства I типа (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 и IL-21), имеющие общую γ -цепь, способны оказывать комплексное влияние на процессы клеточного гомеостаза Т-лимфоцитов иммунной памяти *in vivo* (Бой-

чук, Дунаев, 2008; Tanel et al., 2009; Van Leeuwen et al., 2009).

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния рекомбинантных форм цитокинов (rIL-2, rIL-7 и rIL-15) на процессы активации, пролиферации и апоптоза Т-клеток памяти в условиях *in vitro* в отсутствие антигенного стимула у здоровых доноров.

Материал и методика

Материалом исследования служила венозная кровь 22 условно здоровых доноров — 11 мужчин и 11 женщин в возрасте от 19 до 39 лет. Выделение мононуклеарной фракции крови осуществляли методом центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Urografin (Pharmacia, Швеция) ($P = 1.077$ г/см³). Популяцию Т-клеток иммунной памяти получали из выделенных мононуклеарных фракций крови методом иммуномагнитной сепарации (MidiMACS Separator, LS Columns, Miltenyi Biotec, Германия) с использованием МКАТ к CD45RO⁺ с парамагнитными частицами (MicroBeads human, Miltenyi Biotec, Германия) согласно протоколу фирмы-изготовителя. Содержание целевой фракции CD45RO⁺-лимфоцитов в исследуемых образцах составляло не менее 95 %.

CD45RO⁺-клетки ($1 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл) культивировали в 48-луночном планшете в бессывороточной среде Искова (Sigma, США), содержащей 0.5 % человеческого сывороточного альбумина (Микроген, Россия), $5 \cdot 10^{-5}$ М меркаптоэтанол (Acros Organics, США) и 30 мкг/мл гентамицина, в присутствии разных концентраций рекомбинантных форм цитокинов IL-2, IL-7 и IL-15 (Miltenyi Biotec, Германия) либо без них (в контроле) в течение 24 и 48 ч при 37 °C во влажной атмосфере, содержащей 5 % CO₂.

Были использованы следующие варианты культивирования: 1) интактная проба; 2) пробы с добавлением rIL-2 ($0.1 \cdot 10^{-9}$, $0.5 \cdot 10^{-9}$ и $1.0 \cdot 10^{-9}$ г/мл); 3) пробы с добавлением rIL-7 ($0.1 \cdot 10^{-9}$, $0.5 \cdot 10^{-9}$ и $1.0 \cdot 10^{-9}$ г/мл); 4) пробы с добавлением rIL-15 ($0.1 \cdot 10^{-9}$, $0.5 \cdot 10^{-9}$ и $1.0 \cdot 10^{-9}$ г/мл).

По истечении срока инкубации определяли количество Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркер ранней активации CD69 (через 24 ч), а также молекулы активации, пролиферации и апоптоза CD25, CD71 и CD95 (через 48 ч) методом проточной цитофлуориметрии на приборе MACSQuant (Miltenyi Biotec, Германия) с использованием МКАТ, меченных флуоресцентными красителями FITC, PE, APC и PerCP (e-Bioscience, США), согласно протоколам фирм-изготовителей.

Статистическую обработку полученных результатов производили с использованием пакета статистических программ SPSS 17. Рассчитывали среднее (M) и стандартное отклонение (σ). Сравнительный анализ проводили с помощью параметрического *t*-критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при уровне значимости $P < 0.05$.

Результаты

Соотношение CD4 : CD8 в культурах CD45RO⁺-Т-клеток составляло в среднем 3 : 1. Относительное количество лимфоцитов с фенотипами CD4⁺CD45RO⁺ и CD8⁺CD45RO⁺ было равным 74.23 ± 12.34 и $26.60 \pm$

± 4.56 % и оставалось неизменным в течение всего времени инкубации (48 ч) независимо от варианта культивирования (с добавлением рекомбинантных форм цитокинов rIL-2, rIL-7 и rIL-15 либо без них).

Через 24 ч после инкубации с rIL-2 регистрировалось достоверное увеличение количества лимфоцитов с фенотипом CD45RO⁺CD69⁺ (рис. 1). Выявлена положительная динамика изменения этого показателя, коррелирующая с увеличением концентрации rIL-2, как в CD4⁺, так и в CD8⁺-субпопуляциях клеток ($P < 0.05$). При культивировании Т-клеток с rIL-15 рост числа CD69⁺-лимфоцитов регистрировался только при добавлении максимальной концентрации цитокина ($1.0 \cdot 10^{-9}$ г/мл) ($P < 0.05$). Наибольшей чувствительностью к rIL-15 обладали CD8⁺-клетки памяти. rIL-7 не оказывал значимого влияния на исследуемый показатель.

Инкубация CD45RO⁺-лимфоцитов с rIL-2 (48 ч) приводила к достоверному повышению относительного содержания лимфоцитов, экспрессирующих CD25 (рис. 2) в обеих субпопуляциях Т-клеток ($P < 0.05$). rIL-7 обладал активирующим действием на CD8⁺-клетки памяти во всем спектре концентраций, на CD4⁺CD45RO⁺ — только в максимальной дозе ($1.0 \cdot 10^{-9}$ г/мл). rIL-15 не оказывал значимого влияния на исследуемый показатель.

Обнаружено достоверное увеличение числа CD71⁺-клеток (рис. 3) при инкубации CD45RO⁺-лимфоцитов (обеих субпопуляций) с rIL-2 независимо от концентрации. Добавление rIL-7 и rIL-15 приводило к росту числа CD71⁺-клеток лишь в популяции цитотоксических CD8⁺-лимфоцитов памяти. CD45RO⁺CD8⁺ -лимфоциты были чувствительны ко всему спектру используемых концентраций rIL-15, тогда как rIL-7 оказывал свое действие только в максимальной дозе.

При инкубации CD45RO⁺-лимфоцитов с rIL-2 ($0.5 \cdot 10^{-9}$ и $1.0 \cdot 10^{-9}$ г/мл) регистрировалось увеличение количества CD8⁺CD95⁺-клеток (рис. 4). rIL-2 не действовал на CD4⁺-лимфоциты. rIL-7 и rIL-15 в широком спектре концентра-

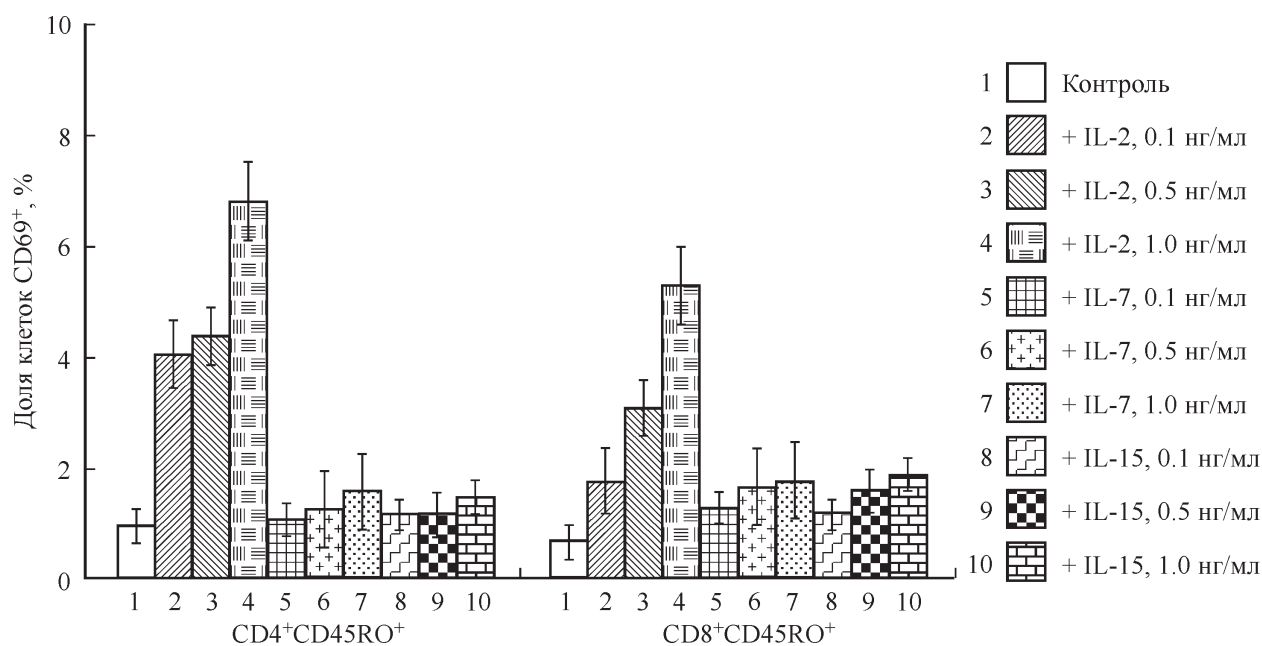


Рис. 1. Относительное количество клеток CD4⁺CD69⁺ и CD8⁺CD69⁺ (%) в культурах CD45RO⁺-лимфоцитов в условиях культивирования *in vitro* с добавлением рекомбинантных форм цитокинов в различной концентрации.

Вертикальные отрезки — стандартное отклонение.

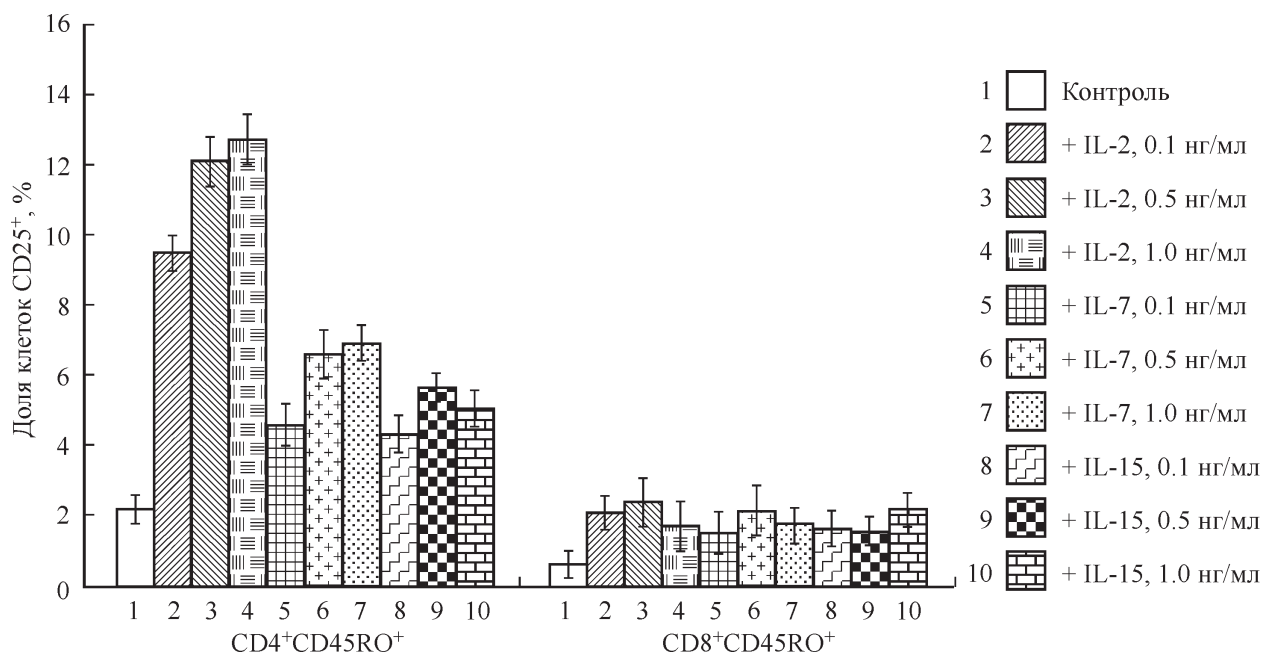


Рис. 2. Относительное количество клеток CD4⁺CD25⁺ и CD8⁺CD25⁺ (%) в культурах CD45RO⁺-лимфоцитов в условиях культивирования *in vitro* с добавлением рекомбинантных форм цитокинов в различной концентрации.

Вертикальные отрезки — стандартное отклонение.

ций не оказывали влияния на экспрессию молекулы апоптоза CD95 в обеих субпопуляциях CD45RO⁺-клеток.

Обсуждение

В экспериментальных условиях *in vitro* были оценены дозозависимые эффекты иммунорегуляторных цитокинов (IL-2, IL-7 и IL5) на процессы активации, пролиферации и апоптоза CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов в культурах

T-клеток иммунной памяти в отсутствие антигенного стимула.

Известно, что экспрессия самого «раннего» рецептора активации CD69 сопряжена с антигензависимой стимуляцией лимфоцитов через механизм, требующий участия p21^{ras} (D'Ambrosio et al., 1994). Установлено, что CD69 действует как костимуляторная молекула для T-клеточной активации и пролиферации, включая механизм увеличения концентрации внутриклеточного Ca²⁺ и синтез различных цитокинов и их рецепторов, включая

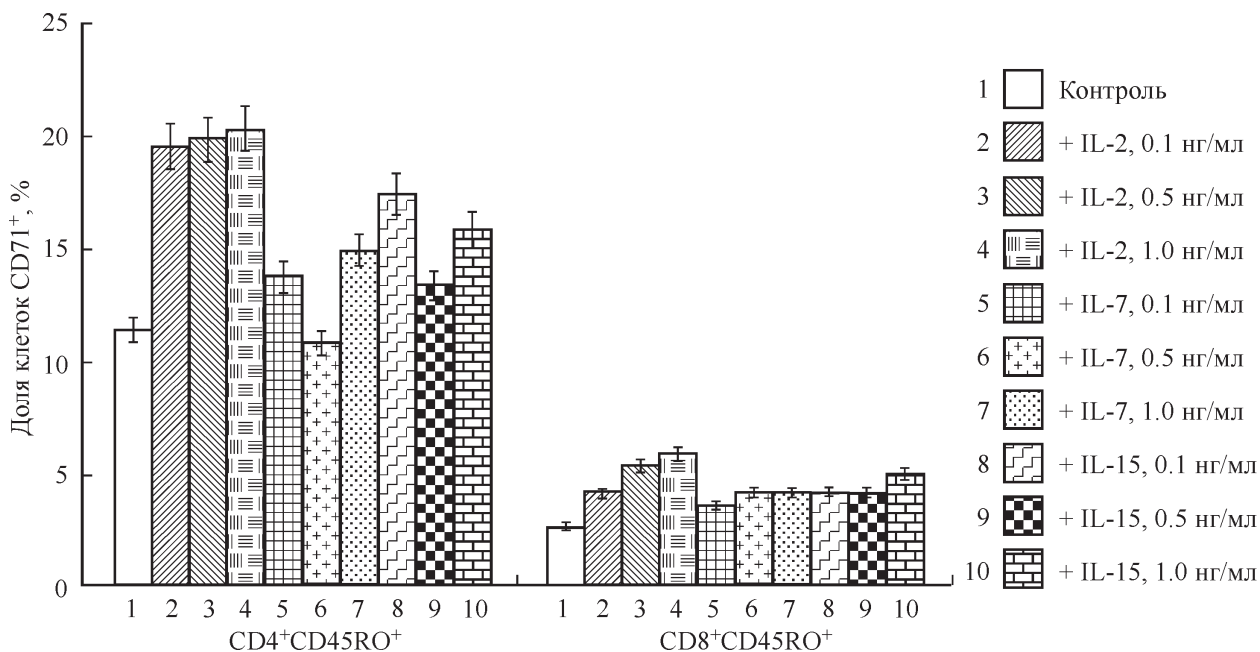


Рис. 3. Относительное количество клеток CD4⁺CD71⁺ и CD8⁺CD71⁺ (%) в культурах CD45RO⁺-лимфоцитов в условиях культивирования *in vitro* с добавлением рекомбинантных форм цитокинов в различной концентрации.

Вертикальные отрезки — стандартное отклонение.

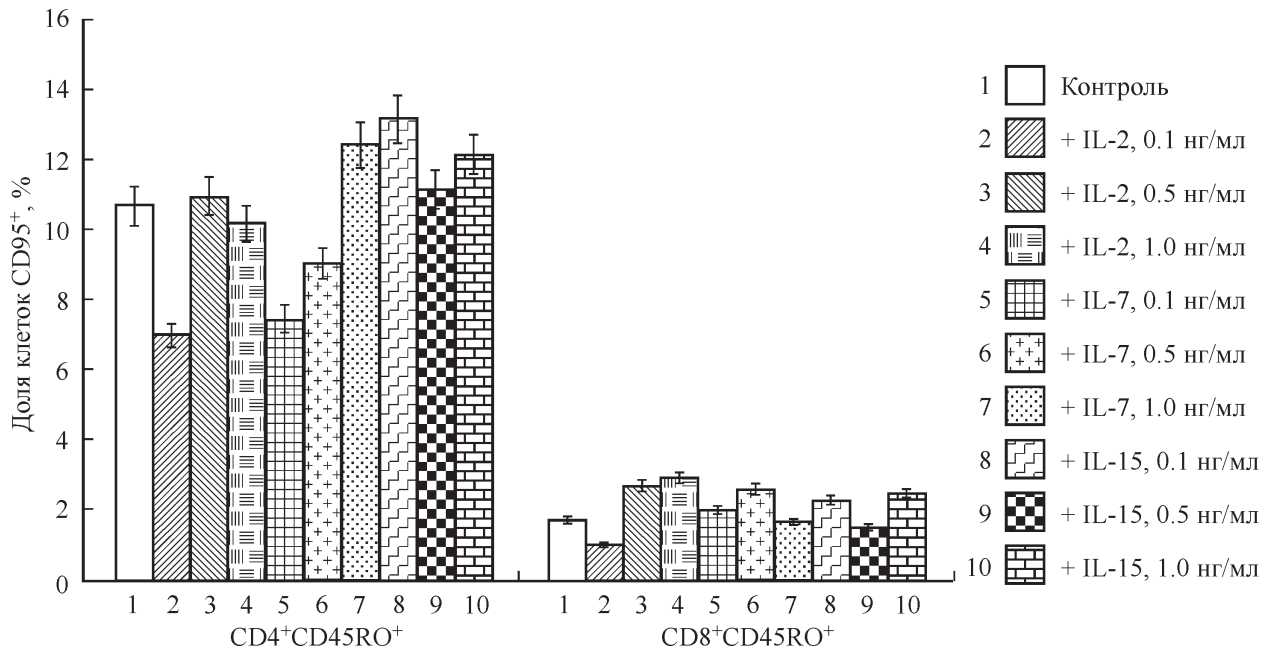


Рис. 4. Относительное количество клеток $CD4^+CD95^+$ и $CD8^+CD95^+$ (%) в культурах $CD45RO^+$ -лимфоцитов в условиях культивирования *in vitro* с добавлением рекомбинантных форм цитокинов в различной концентрации.

Вертикальные отрезки — стандартное отклонение.

IL-2 и его рецептор IL-2R α (Marzio et al., 1999; Graca, Cobbold, 2002; Clausen et al., 2003).

Выявленное нами повышение количества $CD45RO^+$ - $CD69^+$ -клеток (через 24 ч) и $CD45RO^+CD25^+$ (через 48 ч) в обеих субпопуляциях лимфоцитов, индуцированное добавлением rIL-2, может быть обусловлено его биологическими свойствами. Известно, что IL-2 проявляет себя как мощный активатор пролиферации и дифференцировки Т-лимфоцитов, принимает участие в созревании их предшественников и стволовых клеток (Ellery, Nicholls, 2002; Benczik, Gaffen, 2004). При этом действие rIL-2 на $CD4^+$ - и $CD8^+$ -субпопуляции $CD45RO^+$ -клеток имело четко выраженный дозозависимый характер.

Взаимодействие IL-2 с высокоаффинным рецептором на Т-лимфоцитах является ключевым моментом, который обеспечивает запуск сигнальных событий, непосредственно регулирующих вступление покоящихся Т-лимфоцитов в клеточный цикл (Ярилин, 1999; Leonard, Lin, 2000; Ellery, Nicholls, 2002; Benczik, Gaffen, 2004). Поскольку Т-клетки памяти находятся в G_1 -фазе клеточного цикла, это способствует их более быстрому входу в IL-2-зависимую фазу иммунного ответа (Ярилин, 1999).

В связи с вышесказанным увеличение количества $CD71^+$ -клеток в культурах $CD4^+$ - и $CD8^+$ -клеток памяти, индуцированное IL-2, было вполне прогнозируемым. Экспрессия рецептора трансферрина ($CD71$) на гемопоэтических клетках регистрируется после их активации и является косвенным критерием их пролиферации (Vaupes et al., 1994; Хаитов, 2009).

Полученные нами данные находят подтверждение в работах зарубежных авторов, свидетельствующих о том, что IL-2 в условиях *in vitro* является необходимым фактором роста для $CD4^+$ -Т-клеток памяти. В то же время сведения, касающиеся роли IL-2 в клональной экспансии примированных $CD4^+$ -Т-лимфоцитов в условиях *in vivo*, носят весьма разнородный характер (Kneitz et al., 1995; Khoruts et al., 1998; Lantz et al., 2000; Leung et al., 2000;

Schluns, Lefrançois, 2003). Некоторые авторы отрицают роль IL-2 в клональной экспансии $CD4^+$ -клеток памяти (Lantz et al., 2000), тогда как другие, напротив, указывают на участие IL-2 в этом процессе за счет индукции их апоптотической гибели (Khoruts et al., 1998; Schluns, Lefrançois, 2003).

Неоднозначны данные и в отношении влияния ростового фактора IL-2 на процессы активации и генерации цитотоксических $CD8^+$ -клеток памяти. В эксперименте на трансгенных мышах было показано, что IL-2 значительно усиливает их апоптоз (Ku et al., 2000) и подавляет пролиферацию $CD8^+$ -Т-клеток памяти *in vivo*, преимущественно за счет его опосредованного действия на другие субпопуляции клеток, включая $CD25^+CD4^+$ -Т-лимфоциты (Kamimura et al., 2004). Противоположным IL-2 действием обладает IL-15 (Ku et al., 2000; Kamimura et al., 2004). Однако оба этих цитокина — IL-2 и IL-15 — *in vivo* стимулируют пролиферацию $CD8^+$ -Т-клеток памяти (Schluns, Lefrançois, 2003). Интересно, что для $CD8^+$ -Т-клеток памяти характерен высокий уровень экспрессии β -цепи IL-2R, который имеет положительную корреляцию с чувствительностью лимфоцитов к действию IL-15 (Zhang et al., 1998).

IL-7 наряду с IL-2 и IL-15 является одним из цитокинов, оказывающих влияние на гомеостаз антиген-специфичных $CD4^+$ - и $CD8^+$ -Т-клеток памяти, регулируя процессы апоптотической гибели, а также уровень их фоновой (т. е. не связанной с антигенной стимуляцией) пролиферации, тем самым поддерживая численное постоянство этих популяций (Schluns et al., 2000; Schluns, Lefrançois, 2000; Бойчук, Дунаев, 2008).

Согласно полученным результатам, rIL-7 оказывал влияние на активацию и пролиферацию $CD8^+$ -клеток иммунной памяти, значимо увеличивая количество $CD8^+CD25^+$ - и $CD8^+CD71^+$ -клеток, при этом не влияя на экспрессию молекулы CD69. Инкубация $CD4^+$ -клеток с rIL-7 ($1.0 \cdot 10^{-9}$ г/мл) сопровождалась ростом количества

CD25⁺-позитивных лимфоцитов и не влияла на экспрессию молекул CD69 и CD71.

Выявленное нами повышение числа CD25⁺-клеток в обеих субпопуляциях CD45RO⁺-лимфоцитов может быть обусловлено способностью IL-7 повышать синтез IL-2 и экспрессию его рецептора на поверхности Т-лимфоцитов, что в свою очередь усиливает восприимчивость клеток к активационным сигналам (Бойчук, Дунаев, 2008) и как следствие приводит к повышению их пролиферативной активности. CD45RO⁺CD4⁺-клетки оказались менее чувствительны к пролиферативному эффекту IL-7. Установлено, что в сравнении с наивными Т-лимфоцитами CD4⁺-Т-клетки памяти более чувствительны именно к антигенному воздействию и их функциональная активность менее зависима от цитокиновой и мембранной стимуляции. Генерация CD4⁺-Т-клеток памяти нуждается в более длительной антигенной стимуляции, нежели CD8⁺-цитотоксические лимфоциты (Nijhuis et al., 1995; Williams, Bevan, 2004; Селедцов и др., 2010).

Добавление максимальной концентрации rIL-15 ($1.0 \cdot 10^{-9}$ г/мл) приводило к росту количества клеток, несущих на своей мембране CD69, за счет субпопуляции CD8⁺-лимфоцитов памяти и не оказывало значимого влияния на экспрессию молекулы активации CD25. Был выявлен дозозависимый эффект rIL-15 на экспрессию CD8⁺-клетками маркера пролиферации CD71. Эффекты rIL-15 не затрагивали субпопуляцию CD4⁺-клеток.

Известно, что долгоживущие CD8⁺-Т-клетки памяти в естественных условиях характеризуются низкой пролиферативной активностью, которая регулируется IL-15 (Moniuszko et al., 2004; Ramanathan et al., 2009). CD8⁺-Т-клетки памяти (CD44^{hi} или CD122^{hi}) проявляют большую чувствительность к IL-15-индуцированной пролиферации, нежели наивные CD8⁺-лимфоциты, а также CD4⁺-клетки разной степени дифференцировки. Этот факт связывают с высокой экспрессией IL-15R на цитотоксических лимфоцитах памяти (Lodolce et al., 1998; Kennedy et al., 2000). При этом IL-15 является более мощным агентом пролиферации для CD8⁺-Т-клеток памяти, чем IL-2 (Schluns, Lefrançois, 2003).

Наличие на поверхности CD45RO⁺-Т-клеток памяти фактора некроза опухоли CD95L и его рецептора CD95 является еще одним отличительным признаком, определяющим их готовность к запуску активационного апоптоза (Miller et al., 1991; Хайдуков, Литвинов, 2003; Селедцов и др., 2010). Экспрессия CD95 слабо выражена на мембранах покоящихся Т-клеток памяти, ее уровень значительно повышается при их активации (Bamberger et al., 1997).

Регистрируемое увеличение количества CD8⁺CD95⁺-клеток при инкубации с rIL-2 ($0.5 \cdot 10^{-9}$ и $1.0 \cdot 10^{-9}$ г/мл) может быть обусловлено способностью IL-2 значительно усиливать апоптоз CD8⁺-Т-клеток памяти (Ku et al., 2000; Kamimura et al., 2004). Кроме того, выявленные нами IL-2-опосредованная активация и пролиферация CD8⁺-клеток *in vitro* могут значительно повышать их чувствительность к активационному апоптозу. В ранее опубликованных экспериментах (Schluns, Lefrançois, 2003) было продемонстрировано, что активация Т-клеток сопровождается угнетением экспрессии IL-7R α на CD8⁺-клетках памяти, что может приводить к их гибели. CD4⁺-клетки оказались более резистентными к действию IL-2.

Добавление рекомбинантных форм цитокинов IL-7 и IL-15 в широком спектре их концентраций в культуры примированных лимфоцитов, не оказывало значимого влияния на экспрессию молекулы апоптоза CD95. В лите-

ратуре широко представлены данные о цитокиноопосредованной регуляции гомеостатических механизмов генерации и выживания CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток памяти *in vivo* (Marsden, Strasser, 2003; Ma et al., 2006; D'Cruz et al., 2009; Van Leeuwen et al., 2009). В частности, IL-7 и IL-15 способны усиливать в Т-клетках экспрессию антиапоптотических молекул, таких как Bcl-2 и Mcl-1 (Marsden, Strasser, 2003). Становится очевидным, что выявленная нами относительная резистентность процесса активации CD4⁺-клеток памяти к действию rIL-7 и rIL-15 по сравнению с влиянием rIL-2 может обеспечивать их устойчивость к активационному апоптозу, а также может создавать необходимые предпосылки для ускоренной реализации их функционального потенциала в процессе развития вторичного иммунного ответа.

В целом изучение цитокиноопосредованных механизмов активации Т-клеток памяти в условиях отсутствия антигенного стимула может иметь актуальность при расшифровке механизмов формирования патологии, ассоциированной с хроническим иммунным дисбалансом.

Исследование выполнено в рамках реализации Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг. (Соглашения № 14.А18.21.1121, 14.132.21.1778 и 14.132.21.1341), а также при финансовой поддержке Совета по грантам президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых — докторов наук (№ МД-4999.2012) и стипендии президента РФ молодым ученым и аспирантам (Конкурс СП-2013) СП-454.2013.4.

Список литературы

- Бойчук С. В., Дунаев П. Д. 2008. Роль интерлейкина 7 (IL-7) в патогенезе и терапии ВИЧ-инфекции. Цитокины и воспаление. 7 (1) : 3—7.
- Селедцов В. И., Литвинова Л. С., Гончаров А. Г., Шуплецова В. В., Селедцов Д. В., Гуцол А. А., Селедцова И. А. 2010. Клеточные механизмы генерации иммунологической памяти. Цитокины и воспаление. 9 (4) : 9—15.
- Хайтов Р. М. 2009. Иммунология: учебник для студентов медицинских вузов. М.: ГЭОТАР Медиа. 311 с.
- Хайдуков С. В., Литвинов И. С. 2003. Иономицин-резистентная субпопуляция CD4⁺ Т-лимфоцитов периферической крови человека. Функциональная характеристика. Биол. мембраны. 20 (4) : 333—340.
- Ярилин А. А. 1999. Основы иммунологии. М.: Медицина. 608 с.
- Bamberger A. M., Schulte H. M., Thunike I., Erdmann I., Bamberger C. M., Asa S. L. 1997. Expression of the apoptosis-inducing Fas ligand (FasL) in human first and third trimester placenta and choriocarcinoma cells. J. Clin. Endocrinol. Metab. 82 : 3173—3175.
- Baynes R. D., Skikne B. S., Cook J. D. 1994. Circulating transferrin receptors and assessment of iron status. J. Nutr. Biochem. 5 : 322—330.
- Benczik M., Gaffen S. L. 2004. The interleukin (IL)-2 family cytokines: survival and proliferation signaling pathways in T lymphocytes. Immunol. Invest. 33 : 109—142.
- Clausen J., Vergeiner B., Enk M., Petzer A. L., Gastl G., Gunsilius E. 2003. Functional significance of the activation-associated receptor CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells. Immunobiology. 207 : 85—93.
- D'Ambrosio D., Cantrell D. A., Frati L., Santoni A., Testi R. 1994. Involvement of p21^{ras} in T cell CD69 expression. Eur. J. Immunol. 24 : 616—620.
- D'Cruz L. M., Rubinstein M. P., Goldrath A. W. 2009. Surviving the crash: transitioning from effector to memory CD8⁺ T cell. Semin. Immunol. 21 : 92—98.

- Ellery J. M., Nicholls P. J. 2002. Possible mechanism for the alpha subunit of the interleukin-2 receptor (CD25) to influence interleukin-2 receptor signal transduction. *Immunol. Cell Biol.* 80 : 351—359.
- Graca L., Cobbold S. P. 2002. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J. Exp. Med.* 195 : 1641—1646.
- Kamimura D., Ueda N., Sawa Y., Hachida S., Atsumi T., Nakagawa T., Sawa S., Jin G. H., Suzuki H., Ishihara K., Murakami M., Hirano T. 2004. Evidence of a novel IL-2/15R beta-targeted cytokine involved in homeostatic proliferation of memory CD8⁺ T cells. *J. Immunol.* 173 : 6041—6049.
- Kennedy M. K., Glaccum M., Brown S. N., Butz E. A., Vinny J. L., Embers M., Matsuki N., Charrier K., Sedger L., Willis C. R., Brasel K., Morrissey P. J., Stocking K., Schuh J. C., Joyce S., Peschon J. J. 2000. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin-15-deficient mice. *J. Exp. Med.* 191 : 771—780.
- Khoruts A., Mondino A., Pape K. A., Reiner S. L., Jenkins M. K. 1998. A natural immunological adjuvant enhances T-cell clonal expansion through a CD28-dependent, interleukin (IL)-2-independent mechanism. *J. Exp. Med.* 187 : 225—236.
- Kneitz B., Herrmann T., Yonehara S., Schimpl A. 1995. Normal clonal expansion but impaired Fas-mediated cell death and anergy induction in interleukin-2 deficient mice. *Eur. J. Immunol.* 25 : 2572—2577.
- Ku C. C., Murakami M., Sakamoto A., Kappler J., Marrack P. 2000. Control of homeostasis of CD8⁺ memory T cells by opposing cytokines. *Science.* 288 : 675—678.
- Lantz O., Grandjean I., Matzinger P., Di Santo J. P. 2000. γ -chain required for naive CD4⁺ T-cell survival but not for antigen proliferation. *Nature Immunol.* 1 : 54—58.
- Leonard W. J., Lin J. X. 2000. Cytokine receptor signaling pathways. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105 : 877—888.
- Leung D. T., Morefield S., Willerford D. M. 2000. Regulation of lymphoid homeostasis by IL-2 receptor signals *in vivo*. *J. Immunol.* 164 : 3527—3534.
- Lodolce J. P., Boone D. L., Chai S., Swain R. E., Dassopoulos T., Trettin S., Ma A. 1998. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity.* 9 : 669—676.
- Luckey C. J., Bhattacharya D., Goldrath A. W., Weissman I. L., Benoist C., Mathis D. 2006. Memory T and memory B cells share a transcriptional program of self-renewal with long-term hematopoietic stem cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 103 : 3304—3309.
- Ma A., Koka R., Burkett P. 2006. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* 24 : 57—679.
- Marsden V. S., Strasser A. 2003. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu. Rev. Immunol.* 21 : 71—105.
- Marzio R., Mauël J., Betz-Corradin S. 1999. CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 21 : 565—582.
- Miller R. A., Flurkey K., Molloy M., Luby T., Staderker M. J. 1991. Differential sensitivity of virgin and memory T lymphocytes to calcium ionophores suggests a buoyant density separation method and a model for memory cell hyporesponsiveness to Con A. *J. Immunol.* 147 : 3080—3086.
- Moniuszko M., Fry T., Tsai W. P., Morre M., Assouline B., Cortez P., Lewis M. G., Cairns S., Mackall C., Franchini G. 2004. Recombinant interleukin-7 induces proliferation of naive macaque CD4⁺ and CD8⁺ T cells *in vivo*. *J. Virol.* 78 : 9740—9749.
- Nijhuis E. W., Hinloopen B., van Lier R. A., Nagelkerken L. 1995. Differential sensitivity of human naive and memory CD4⁺ T cells for dexamethasone. *Int. Immunol.* 7 : 591—595.
- Ramanathan S., Gagnon J., Dubois S., Forand-Boulerice M., Richter M. V., Ilangumaran S. 2009. Cytokine synergy in antigen-independent activation and priming of naive CD8⁺ T lymphocytes. *Crit. Rev. Immunol.* 29 : 219—239.
- Romano F., Cesana G., Caprotti R., Bovo G., Uggeri F., Piacentini M. G., Crippa S., Uggeri F. 2006. Preoperative IL-2 immunotherapy enhances tumor infiltrating lymphocytes (TILs) in gastric cancer patients. *Hepatogastroenterology.* 53 : 634—638.
- Schluns K. S., Kieper W. C., Jameson S. C., Lefrancois L. 2000. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells *in vivo*. *Nature Immunol.* 1 : 426—432.
- Schluns K. S., Lefrancois L. 2003. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Immunology.* 3 : 269—279.
- Tanel A., Fonseca S. G., Yassine-Diab B., Bordi R., Zeidan J., Shi Y., Benne C., Sekaly R. P. 2009. Cellular and molecular mechanisms of memory T-cell survival. *Expert Rev. Vaccines.* 8 : 299—312.
- Van Leeuwen E. M., Sprent J., Surh C. D. 2009. Generation and maintenance of memory CD4(+) T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 21 : 167—172.
- Williams M. A., Bevan M. J. 2004. Shortening the infectious period does not alter expansion of CD8 T cells but diminishes their capacity to differentiate into memory cells. *J. Immunol.* 173 : 6694—6702.
- Zhang X., Sun S., Hwang I., Tough D. F., Sprent J. 1988. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cell *in vivo* by IL-15. *Immunity* 8 : 591—599.

Поступила 23 IV 2013

INFLUENCE OF IMMUNOREGULATORY CYTOKINES (IL-2, IL-7 AND IL-15) *IN VITRO* UPON ACTIVATION, PROLIFERATION AND APOPTOSIS OF IMMUNE MEMORY T-CELLS

L. S. Litvinova,¹ N. A. Sokhnevich, A. A. Gutsol, K. A. Kofanova

Laboratory for Immunology and Cell Biotechnologies, Baltic Federal Institute of Immanuel Kant, Kaliningrad;
¹ e-mail: larisalitvinova@yandex.ru

Under the experimental conditions *in vitro* the effects of immunoregulatory cytokines (IL-2, IL-7 and IL-15) on the activation, proliferation and apoptosis of different subpopulations of immune memory T-cell (Cd45RO⁺) were investigated in healthy donors. It was demonstrated that the effects of rIL-2 *in vitro* equally affect the activation and proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ subpopulations of memory T cells. It has been shown that high concentrations of rIL-2 lead to an increase in the number of CD8⁺ memory cells expressing apoptotic molecule CD95. Different effect of rIL-7 and rIL-15 on the activation and proliferation of cytotoxic CD8⁺ memory cells has been revealed *in vitro*. CD4⁺ memory lymphocytes have relative resistance to the activation and proliferative effect of rIL-7 and rIL-15, if compared with the effects of rIL-2, which can provide their relative resistance to the activation apoptosis as well as create the necessary conditions for the accelerated implementation of their functional capacity in the development of a secondary immune response.

Key words: memory T cells, cytokines, activation, proliferation, apoptosis.