

ВЛИЯНИЕ ЦИТОКИНОВ (IL-2, IL-7 и IL-15), ИМЕЮЩИХ ОБЩУЮ γ -ЦЕПЬ РЕЦЕПТОРОВ, НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ И СОЗРЕВАНИЕ Т-КЛЕТОК CD4⁺/CD8⁺ В ПОПУЛЯЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ CD45RA IN VITRO

© К. А. Юрова, О. Г. Хазиахматова, Н. А. Дунец, Н. М. Тодосенко,
В. В. Шуплецова, Л. С. Литвинова¹

Лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского
федерального университета им. Иммануила Канта, Калининград, 236016;

¹ электронный адрес: larisalitinova@yandex.ru

Проанализировано влияние цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15), имеющих общую γ -цепь рецепторов, на созревание и дифференцировку Т-лимфоцитов CD3⁺CD45RA⁺CD4⁺/CD8⁺ в гомеостатической модели культивирования *in vitro*. Выявлено, что в желперной популяции CD45RA⁺ Т-клеток CD45RA⁺ максимальная концентрация IL-2 опосредует рост числа Т-лимфоцитов CD45RA⁺CD4⁺ с фенотипом зрелых и незрелых терминально-дифференцированных (T_{EMRA}) Т-клеток. IL-15 приводит к образованию лимфоцитов с фенотипом CD27⁺CD62L⁺ (предположительно T_{EMRA}, у которых сохраняется экспрессия CD62L). В популяциях Т-лимфоцитов CD45RA⁺CD8⁺ исследуемые цитокины (IL-2, IL-7 и IL-15) инициируют образование зрелых T_{EMRA} (E) Т-лимфоцитов и Т-клеток памяти с центральным фенотипом CD45RA⁺CD27⁺CD62L⁺ (T_{CM}).

Ключевые слова: наивные Т-лимфоциты, эффекторные клетки, терминально-дифференцированные лимфоциты, клетки центральной памяти, иммунорегуляторные цитокины, созревание, дифференцировка.

Принятые сокращения: МАТ — моноклональные антитела, CD — кластер дифференцировки, IL — интерлейкин, γ -цитокины — цитокины, имеющие общую γ -цепь рецепторов (CD132), rIL — рекомбинантная форма интерлейкина, T_{EMRA} — терминально-дифференцированные Т-клетки, TCR — Т-клеточный рецептор, TNF — фактор некроза опухоли.

Ключевым условием адаптации организма к изменяющимся условиям окружающей среды является формирование пула клеток иммунологической памяти, которые формируются посредством активации и созревания наивных Т-лимфоцитов при первичном контакте с антигеном и обеспечивают защиту от антигенного окружения (Литвинова и др., 2013). Главным критерием дифференцировки наивных Т-клеток в Т-лимфоциты памяти считают появление низкомолекулярной изоформы рецептора CD45R0⁺ на поверхности клеточной мембраны. Однако изменение фенотипа с CD45R0⁺CD45RA^{bright} на CD45R0^{bright}CD45RA⁻ не в полной мере объясняет их уникальную способность быстро реагировать на повторный контакт с антигеном (Кудрявцев, 2014). В связи с этим для обнаружения субпопуляций лимфоцитов, имеющих разную степень зрелости, целесообразно определять экспрессию стимулирующих рецепторов (CD27 и CD28) и молекул, ответственных за миграцию клеток (CD62L и CCR7) (Кудрявцев, 2014).

Дифференцировка лимфоцитов и появление Т-клеток памяти обусловлены их антигенной стимуляцией. Однако исследования последних лет позволили доказать, что цитокины семейства I типа, имеющие общую γ -цепь рецепторов (γ с или CD132), в частности IL-2, IL-7 и IL-15, могут оказывать влияние на клеточный гомеостаз Т-лимфо-

цитов, способствуя их активации и дифференцировке (Seddon et al., 2003; Boyman et al., 2007; Burchill et al., 2007; Литвинова и др., 2013; Lee, Hong, 2015).

Целью данного исследования стал анализ влияния γ -цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на созревание и дифференцировку Т-клеток CD45RA⁺CD4⁺/CD45RA⁺CD8⁺, ассоциированных с изменением фенотипа, в гомеостатической модели культивирования *in vitro*.

Материал и методика

Материалом для исследования служили Т-лимфоциты CD45RA⁺, полученные из взвеси мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови 58 условно здоровых доноров (29 мужчин и 29 женщин в возрасте от 22 до 35 лет). МНК выделяли из венозной гепаринизированной крови методом центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Urografin (Schering, Испания; Pharmacia, Швеция) ($\rho = 1.077 \text{ г/см}^3$) по стандартной методике. Получение фракций Т-клеток CD45RA⁺ из МНК проводили методом иммуномагнитной сепарации (ИМС) с использованием технологии MACS® (MidiMACS Separator, LS Columns, MiltenyiBiotec, Германия) и моноклональных антител (МАТ) к CD45RA с парамагнитными частицами

(MicroBeads human, Miltenyi Biotec, Германия) согласно протоколу фирмы-изготовителя.

Чистоту популяций CD3⁺CD45RA⁺ определяли с использованием МАТ, конъюгированных с фикоэритрином (PE) или флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) (Abcam, Cambridge, Великобритания). Процентное содержание позитивных клеток выявляли на проточном цитофлуориметре MACSQuantAnalyzer (Miltenyi Biotec, Германия). Содержание целевой фракции CD45RA⁺ в исследуемых образцах составляло не менее 95 %.

Отсутствие В-лимфоцитов (CD19⁺) и моноцитов (CD14⁺) в культурах клеток CD45RA⁺ до и после культивирования было подтверждено с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием МАТ, конъюгированных с FITC (CD3), PE (CD14) (Abcam, Великобритания), с конъюгатом PE с цианином (PE-Су7) (CD45RA) или с пиридинхлорофиллом (PerCP) (CD19) (e-Bioscience, США). Анализ поверхностных маркеров проводили на проточном цитофлуориметре MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия) согласно протоколам фирм-производителей. В работе использовали культуры клеток, содержание лимфоцитов CD3⁺CD45RA⁺CD14⁻CD19⁻ в которых составляло в среднем 98.5 ± 1.5 %.

Гомеостатическая модель культивирования предполагает создание *in vitro* условий влияния γ с-цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на Т-лимфоциты.

Клетки CD45RA⁺ ($1 \cdot 10^6$ кл./мл) культивировали в 48-луночном планшете в бессывороточной среде Искова (Sigma, США), содержащей 0.5 % сывороточного альбумина человека (Микроген, Россия), $5 \cdot 10^{-5}$ М β -меркаптоэтанол (Acros Organics, США) и 30 мкг/мл гентамицина в присутствии рекомбинантных форм цитокинов IL-2 (rIL-2), IL-7 (rIL-7) или IL-15 (rIL-15) (Miltenyi Biotec, Германия) в разных концентрациях или без них (контроль) в течение 48 ч при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5 % CO₂.

Варианты культивирования клеток в среде: 1) контроль (без добавления цитокинов); 2) в среду добавлен rIL-2, rIL-7 (3) или rIL-15 (4). γ с-Цитокины исследовали в следующих концентрациях: 0.1, 0.5 и 1.0 нг/мл. По истечении срока культивирования количество лимфоцитов CD45RA⁺, экспрессирующих молекулы дифференцировки (CD45RA⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD62L⁺ и CD27⁺), определяли с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием МАТ, конъюгированных с аллофикоцианином (APC) (CD45RA), Viabluе (CD3), FITC (CD4) (все от Miltenyi Biotec, Германия); PE (CD62L), с конъюгатом PerCP с цианином (Су5.5) (CD8), PE-Су7 (CD27) (все от Abcam, Великобритания), согласно протоколу фирмы-производителя. Результаты регистрировали на проточном цитофлуориметре MACSQuant (Miltenyi Biotec, Германия).

Анализ полученных данных осуществляли с помощью пакета статистических программ IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences). При анализе выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (Колмогорова—Смирнова). Полученные данные не подчинялись нормальному закону распределения, для них рассчитывали медиану (М) и квартили (Q1—Q3). Сравнительный анализ проводили с помощью непараметрического критерия Вилкоксона для зависимых выборок. С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный анализ Спирмена. Статистически значимыми считали различия при $P < 0.05$.

Результаты и обсуждение

Наивные Т-клетки представляют собой популяции Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов, которые покинули тимус, пройдя антигеннезависимую дифференцировку, но еще не претерпели антигензависимой дифференцировки во вторичных лимфоидных органах. Для них характерна экспрессия на клеточной мембране высокомолекулярной изоформы трансмембранного белка CD45 — CD45RA и CD62L (или L-селектина, определяющего путь миграции клеток в лимфатические узлы и пейеровы бляшки через вены с высоким эндотелием). Отличительной особенностью наивных лимфоцитов от более зрелых популяций Т-клеток является высокая экспрессия поверхностной костимулирующей молекулы CD27, которая имеет свой лиганд CD70 на антигенпрезентирующей клетке (Libregts et al., 2011; Van Montfrans et al., 2012; Coquet et al., 2013; Кудрявцев, 2014; Ribeiro et al., 2015). Использование описанного алгоритма позволяет определить субпопуляции наивных лимфоцитов (CD45RA⁺CD27⁺CD62L⁺), терминально-дифференцированных эффекторных клеток (CD45RA⁺CD62L⁻), а также клетки центральной (CD45RA⁻CD62L⁺) и эффекторной (CD45RA⁻CD62L⁻) памяти.

При оценке процентного распределения поверхностных молекул CD27 и CD62L в интактных культурах лимфоцитов CD3⁺CD45RA⁺CD4⁺ было показано, что основная клеточная субпопуляция представлена наивными Т-хелперами с фенотипом CD45RA⁺CD4⁺CD27⁺CD62L⁺, содержание которых составило 95.49 (79.79—96.28) % (табл. 1).

Были обнаружены также минорные субпопуляции зрелых хелперных эффекторных клеток (T_{EMRA}) — CD45RA⁺CD4⁺CD27⁻CD62L⁻, составляющие 2.36 (1.16—3.44) %, и незрелых ранних T_{EMRA} Т-лимфоцитов CD45RA⁺CD4⁺CD27⁺CD62L⁻, число которых было равно 0.66 (0.43—1.58) %. Кроме того, выявлена субпопуляция лимфоцитов с фенотипом CD45RA⁺CD4⁺CD27⁻CD62L⁺, численность которой была равной 1.69 (1.64—3.24) % (табл. 1). Предположительно это T_{EMRA} Т-лимфоциты, у которых резко экспрессируется молекула CD62L, индуцируемая *in vitro*.

Анализ данных относительно экспрессии молекул CD27 и CD62L внутри популяции цитотоксических клеток CD3⁺CD45RA⁺ показал, что процентное содержание наивных лимфоцитов CD45RA⁺CD8⁺CD27⁺CD62L⁺ составило 64.49 (56.60—75.08) % (табл. 2). Число зрелых эффекторных клеток (T_{EMRA}, E) CD45RA⁺CD8⁺CD27⁻CD62L⁻ было равным 23.42 (13.79—28.76) %, незрелых ранних Т-лимфоцитов (T_{EMRA}) CD45RA⁺CD8⁺CD27⁺CD62L⁻ — 4.91 (4.33—5.91) %. Также была обнаружена субпопуляция лимфоцитов CD45RA⁺CD8⁺CD27⁻CD62L⁺, доля которой составила 7.87 (6.80—10.74) % (табл. 2).

Следует отметить, что содержание клеток с фенотипом CD45RA⁺CD27⁻CD62L⁺ в контрольных пробах цитотоксических Т-лимфоцитов было в 4 раза выше, чем в популяциях Т-хелперов. Согласно данным литературы, клеток с таким фенотипом не встречается в периферической крови здоровых доноров. Вероятно, обнаруженная популяция представляет собой прямой переход от наивных Т-лимфоцитов (CD45RA⁺CD27⁺CD62L⁺) в терминально-дифференцированные (T_{EMRA}) Т-клетки (CD45RA⁺CD27⁻), на которых сохраняется поверхностная экспрессия молекулы L-селектина (Sallusto et al., 2004; Кудрявцев, 2014).

Т а б л и ц а 1

Доля Т-клеток CD4⁺ в культурах Т-лимфоцитов CD45RA⁺, экспрессирующих мембранные молекулы CD62L и CD27, при инкубации с цитокинами в гомеостатической модели культивирования *in vitro*

Цитокин, нг	Доля Т-клеток CD4 ⁺ (%) в культуре Т-клеток CD45RA ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ , экспрессирующих молекулы			
	CD62L ⁻ CD27 ⁻	CD62L ⁻ CD27 ⁺	CD62L ⁺ CD27 ⁺	CD62L ⁺ CD27 ⁻
Контроль	2.36 (1.16—3.44)	0.66 (0.43—1.58)	95.49 (79.79—96.28)	1.69 (1.64—3.24)
IL-2, 0.1	2.50 (2.06—3.02)	1.04 (0.72—1.94)	89.93 (72.51—94.37)	2.93 (1.53—3.47)
IL-2, 0.5	3.02 (2.61—3.19)	1.64 (0.34—1.73)	88.11 (69.26—94.38)	2.28 (0.83—3.06)
IL-2, 1.0	10.28 (7.32—14.57) $P_0 < 0.05$ $P_1 < 0.05$ $P_2 < 0.05$	1.92 (1.76—3.17) $P_0 < 0.05$	83.95 (81.69—94.20) $P_0 < 0.05$	2.98 (1.54—3.55)
IL-7, 0.1	3.05 (2.69—4.11)	1.48 (0.83—2.19)	93.75 (79.09—97.01)	1.95 (0.89—3.12)
IL-7, 0.5	2.75 (1.69—3.83)	1.22 (0.73—1.74)	84.14 (75.34—94.72)	2.30 (1.38—4.86)
IL-7, 1.0	3.33 (2.58—6.59)	1.17 (0.85—1.51)	82.40 (64.48—95.86)	3.22 (1.03—4.63)
IL-15, 0.1	4.03 (1.93—4.27)	0.98 (0.90—1.49)	92.26 (72.84—93.71)	1.89 (0.96—3.60)
IL-15, 0.5	3.25 (3.01—4.85)	1.30 (0.68—1.76)	92.86 (72.45—95.25)	1.83 (1.04—3.27)
IL-15, 1.0	4.80 (2.25—5.58)	1.81 (0.66—1.62)	88.82 (76.53—94.72)	3.40 (2.73—5.25) $P_0 < 0.05$ $P_1 < 0.05$ $P_2 < 0.05$

Примечание. P_0 — достоверность различий по сравнению с контролем; P_1 — достоверность различий по сравнению с присутствием IL-2, IL-7 или IL-15 в концентрации 0.1 нг/мл; P_2 — достоверность различий по сравнению с присутствием тех же цитокинов, но в концентрации 0.5 нг/мл. Здесь и в табл. 2 для каждой выборки вычисляли средневыборочные характеристики: медиану (M), первый и третий квартили (Q_1 и Q_3).

Т-лимфоциты в условиях *in vivo* поддерживают численное постоянство за счет фоновой гомеостатической пролиферации, опосредованной действием цитокинов и не требующей дополнительной антигенной стимуляции. Так, выживание и гомеостатическая пролиферация *in vivo* наивных Т-лимфоцитов, определяются наличием в микроокружении цитокинов IL-2, IL-7 и IL-15 (Ma et al., 2006).

IL-2, являясь ключевым фактором роста Т-лимфоцитов, индуцирует антигензависимую пролиферацию и способствует дифференцировке Т-лимфоцитов (Létourneau et al., 2009; Ярилин, 2010; Liao et al., 2013). IL-2-зависимые ответы Т-клеток-эффекторов *in vivo* находятся под строгим физиологическим и антигензависимым контролем (Malek et al., 2010).

Добавление в среду культивирования Т-хелперов CD45RA⁺IL-2 в максимальной концентрации (1.0 нг/мл) сопровождалось увеличением содержания Т-клеток CD45RA⁺CD27⁻CD62L⁻ и CD45RA⁺CD27⁺CD62L⁻ ($P < 0.05$) с одновременным снижением числа наивных Т-лимфоцитов CD45RA⁺CD27⁺CD62L⁺ ($P < 0.05$) (табл. 1).

В популяции цитотоксических Т-клеток CD45RA⁺IL-2 индуцировал образование зрелых T_{EMRA} (CD45RA⁺CD27⁻CD62L⁻) Т-лимфоцитов с одновременным снижением числа Т-клеток CD45RA⁺CD27⁺CD62L⁺. IL-2-опосредованные изменения в популяции CD8⁺CD45RA⁺ носили равномерный характер. В популяции цитотоксических Т-клеток IL-2 (1.0 нг/мл) также способствовал образованию Т-клеток центральной памяти (CD45RA⁻CD62L⁺CD27⁺) (табл. 2).

Выявленные нами сильные корреляционные взаимосвязи между числом зрелых Т-клеток (T_{EMRA}, CD45RA⁺CD27⁻CD62L⁻) и содержанием лимфоцитов с наивным фенотипом (T_N) ($r = -0.67$ для Т-клеток CD45RA⁺CD8⁺ при влиянии IL-2 в концентрации 0.5 нг/мл; $r = -0.70$, $P < 0.05$ для Т-клеток CD45RA⁺CD8⁺ при влиянии IL-2 в концентрации 1.0 нг/мл; $r = -0.85$, $P < 0.05$ для Т-клеток CD45RA⁺CD4⁺ при влиянии 1.0 нг/мл IL-2) позволяют предположить факт прямой дифференцировки «наивных» Т-клеток в эффекторные.

В научной периодике встречаются публикации, освещающие факт цитокин-индуцированной дифференци-

Доля Т-клеток CD8⁺ в культурах Т-лимфоцитов CD45RA⁺, экспрессирующих мембранные молекулы CD62L и CD27, при инкубации с цитокинами в гомеостатической модели культивирования *in vitro*

Цитокин, нг	Доля Т-клеток CD8 ⁺ (%) в культуре Т-клеток CD45RA ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ , экспрессирующих молекулы			
	CD62L ⁻ CD27 ⁻	CD62L ⁻ CD27 ⁺	CD62L ⁺ CD27 ⁺	CD62L ⁺ CD27 ⁻
Контроль	23.42 (13.79—28.76)	4.91 (4.33—5.91)	64.49 (56.60—75.08)	7.87 (6.80—10.74)
IL-2, 0.1	34.09 (27.69—51.02) <i>P</i> ₀ < 0.05	4.96 (4.76—5.16)	45.44 (37.03—53.90) <i>P</i> ₀ < 0.05	8.97 (6.84—12.17)
IL-2, 0.5	35.98 (25.52—47.54) <i>P</i> ₀ < 0.05	5.04 (3.89—5.68)	47.75 (32.29—53.69) <i>P</i> ₀ < 0.05	7.56 (4.95—8.81)
IL-2, 1.0	37.58 (29.17—41.48) <i>P</i> ₀ < 0.05	5.06 (4.17—6.55)	45.68 (42.72—53.36) <i>P</i> ₀ < 0.05	7.40 (6.51—13.20)
IL-7, 0.1	25.75 (23.04—31.68)	5.15 (3.70—6.13)	61.88 (52.14—70.44)	9.21 (6.62—10.29)
IL-7, 0.5	23.65 (19.39—29.26)	5.02 (3.74—6.26)	48.57 (30.69—73.58)	9.25 (4.76—10.39)
IL-7, 1.0	32.99 (29.74—48.62) <i>P</i> ₀ < 0.05	2.30 (0.40—2.73) <i>P</i> ₀ < 0.05	61.66 (28.86—74.65)	7.92 (4.71—10.88)
IL-15, 0.1	24.36 (17.89—31.55)	5.85 (4.33—6.03)	63.12 (48.34—74.63)	7.89 (6.97—10.56)
IL-15, 0.5	32.86 (26.36—40.96) <i>P</i> ₀ < 0.05	5.33 (5.08—6.49)	50.91 (44.11—75.03)	8.58 (6.93—11.90)
IL-15, 1.0	34.70 (24.30—47.25) <i>P</i> ₀ < 0.05	5.99 (4.11—6.24)	47.80 (27.96—56.12) <i>P</i> ₀ < 0.05 <i>P</i> ₁ < 0.05	10.01 (7.29—15.97) <i>P</i> ₀ < 0.05

Примечание. *P*₀ — достоверность различий по сравнению с контролем; *P*₁ — достоверность различий по сравнению с присутствием IL-2, IL-7 или IL-15 в концентрации 0.1 нг/мл.

ровки наивных Т-клеток в клетки центральной (CD45RA⁻CD45R0⁺CD62L⁺CCR7⁺CD27⁺CD28⁺) и (или) эффекторной (CD45RA⁻CD45R0⁺CD62L⁻CCR7⁻) памяти (Manjunath et al., 2001; Surh, Sprent, 2008). В частности, речь идет о прайминге *in vitro* наивных Т-лимфоцитов CD8⁺ IL-2 или IL-15 в высоких концентрациях (Cho et al., 2007; Surh, Sprent, 2008).

Низкая чувствительность хелперных Т-клеток к действию IL-2 может быть обусловлена сниженной экспрессией IL-2Rα и IL-2/15Rβ, а также специфическими механизмами, которые в условиях *in vivo* и *in vitro* сдерживают гомеостатическую пролиферацию Т-лимфоцитов (Geginat et al., 2001; Moses et al., 2003).

Влияние IL-15 на цитотоксические Т-лимфоциты CD45RA⁺ в целом было аналогичным IL-2. Добавление IL-15 в концентрации 0.5—1.0 нг/мл в культуральную среду сопровождалось увеличением содержания зрелых T_{EMRA} (CD45RA⁺CD8⁺CD27⁻CD62L⁻) Т-клеток и Т-клеток с фенотипом центральной памяти (CD45RA⁻CD8⁺CD27⁺CD62L⁺) при снижении числа лимфоцитов с наивным фенотипом (CD45RA⁺CD8⁺CD27⁺CD62L⁺) (*P* < 0.05) (табл. 2).

Т-лимфоциты CD8⁺ экспрессируют IL-2Rβ, что объясняет их реакцию на присутствие в среде культивирования IL-15, который также использует для передачи сигнала IL-2Rβ и γс (Malek et al., 2010).

Культивирование CD45RA⁺CD4⁺ с IL-15 (1.0 нг/мл) сопровождалось увеличением содержания хелперных клеток с фенотипом CD27⁻CD62L⁺ за счет снижения числа наивных лимфоцитов CD45RA⁺CD4⁺CD27⁺CD62L⁺ (*P* < 0.05) (табл. 1).

Действие IL-15 на культуры наивных Т-клеток опосредовано его биологическими эффектами. Доказано, что IL-15 может инициировать *in vitro* большинство реакций, опосредованных IL-2 (Waldmann, 2006). Рецепторы к IL-15 и IL-2 состоят из трех белковых субъединиц, две из которых общие для исследуемых цитокинов (Malek et al., 2010), однако механизм действия IL-15 существенно отличается от такового у IL-2 (Kennedy et al., 2000; Stonier et al., 2008).

Интересными являются результаты зарубежной группы исследователей, которая показала, что IL-15 имитирует не только связывание с TCR при индукции клеточной пролиферации, но и профиль экспрессии генов, а также

усиливает цитотоксическую активность Т-клеток CD8⁺ (Liu et al., 2002). Многие авторы отмечают, что действие IL-15 на наивные Т-клетки CD8⁺ трудно отличить от антигензависимого прайминга вследствие того, что оно сопровождается фенотипическими и функциональными изменениями лимфоцитов (Cho et al., 2000; Goldrath et al., 2000; Murali-Krishna et al., 2000).

Следует отметить интересный факт: реакция наивных Т-клеток на IL-15 не ограничена уровнем экспрессии IL-2/15Rβ; даже относительно небольшое количество CD122 на наивных Т-клетках человека является достаточным, чтобы инициировать активацию в ответ на IL-15 (Alves et al., 2003). Важное значение IL-15 в гомеостазе наивных Т-клеток подтверждено экспериментально на мышах. В описанных наблюдениях количество нормальных наивных Т-клеток CD8⁺ у мышей, дефицитных по IL-15Rα и IL-15, было снижено в 2 раза по сравнению с контролем (Lodolce et al., 1998; Kennedy et al., 2000).

IL-7 (наряду с IL-2 и IL-15) является одним из ключевых иммунорегуляторных цитокинов. Он не только оказывает влияние на гомеостаз Т-лимфоцитов, но и регулирует процессы апоптотической гибели и уровень фоновой пролиферации, поддерживая тем самым численное постоянство этих популяций (Schluns et al., 2000; Schluns, Lefrancois, 2003; Бойчук, Дунаев, 2008). Показано, что IL-7 играет важную роль в выживании Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺. Эффекты IL-7 наряду с IL-15 обусловлены регуляцией семейства Bcl-2: IL-7 индуцирует экспрессию антиапоптотических факторов Bcl-2 и Mcl-1 и, напротив, инактивацию факторов апоптоза Bax и Bad (Jiang et al., 2004; Cai et al., 2013). Кроме того, IL-7 является важным фактором генерации и поддержания функционального эффекторного ответа (Konrad et al., 2003; Li et al., 2003).

Проведенное исследование позволило выяснить, что IL-7 не вызвал изменений в субпопуляции Т-клеток CD4⁺CD45RA⁺ (табл. 1). Этот факт закономерен и логично вытекает из основной биологической роли исследуемого цитокина, который позиционируют чаще всего как ключевой фактор поддержания жизнеспособности лимфоцитов (Schluns et al., 2000; Schluns, Lefrancois, 2003; Бойчук, Дунаев, 2008; Surh, Sprent, 2008).

Повышение содержания зрелых (CD8⁺CD27⁺CD62L⁻) T_{EMRA} эффекторов было зарегистрировано при культивировании цитотоксических Т-лимфоцитов с максимальной концентрацией IL-7 (1.0 нг/мл) (табл. 2). Перераспределение популяционного состава Т-эффекторов CD8⁺ происходило за счет уменьшения содержания Т-клеток с незрелым эффекторным (CD8⁺CD27⁺CD62L⁻) фенотипом, не затрагивая при этом субпопуляцию наивных Т-лимфоцитов. Известно, что наивные Т-лимфоциты *in vivo* принимают сигналы низкого уровня, контактируя с молекулами главного комплекса гистосовместимости и с IL-7, что сохраняет их жизнеспособность и позволяет долгое время находиться в состоянии покоя, не подвергаясь антигензависимой дифференцировке (Sprent, Surh, 2002; Boyman et al., 2007; Ярилин, 2010; Le Campion et al., 2012). Выявленное влияние цитокина на Т-лимфоциты CD8⁺ может быть обусловлено способностью IL-7 инициировать продукцию Т-лимфоцитами IL-2, который благодаря ауто- и паракринному воздействию может активировать процессы дифференцировки и созревания Т-клеток в «эффекторы» с характерной для них потерей экспрессии молекул костимуляции и хоуминга (Бойчук, Дунаев, 2008).

Резюмируя вышесказанное, следует отметить, что γс-цитокины (IL-2, IL-7 и IL-15) способствуют образованию зрелых T_{EMRA} (E) Т-клеток и Т-клеток памяти с центральным фенотипом (T_{CM}) в популяции Т-лимфоцитов CD45RA⁺CD8⁺ на фоне снижения количества наивных клеток CD8⁺ (T_N). IL-2-опосредованный рост числа Т-хелперов с фенотипом зрелых CD27⁺CD62L⁻ и незрелых CD27⁺CD62L⁻ T_{EMRA} Т-клеток происходит за счет уменьшения содержания Т-лимфоцитов с наивным фенотипом (T_N). Цитокин IL-15 в хелперной популяции Т-клеток CD45RA⁺ способствует образованию лимфоцитов с фенотипом CD27⁺CD62L⁺.

Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности («дорожной карты») и субсидии «Организация проведения научных исследований» № 20.4986.2017/БУ Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта.

Список литературы

- Бойчук С. В., Дунаев П. Д. 2008. Роль интерлейкина-7 в патогенезе и терапии ВИЧ-инфекции. Цитокины и воспаление. 7 (1) : 3—7. (Boichuk S. V., Dunaev P. D. 2008. A role of interleukin 7 (IL-7) in the pathogenesis and treatment of HIV infection. Cytokines and Inflammation. 7 (1) : 3—7.)
- Кудрявцев И. В. 2014. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки. Рос. иммунол. журн. 8 (17) : 947—964. (Kudryavtsev I. V. 2014. Memory T cells: major populations and stages of differentiation. Russ. J. Immunol. 8 (17) : 947—964.)
- Литвинова Л. С., Сохоневич Н. А., Гуцол А. А., Кофанова К. А. 2013. Эффекты иммунорегуляторных цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на процессы активации, пролиферации и апоптотической гибели Т-клеток иммунной памяти *in vitro*. Цитология. 55 (8) : 566—571. (Litvinova L. S., Sokhnevich N. A., Gutsol A. A., Kofanova K. A. 2013. Influence of immunoregulatory cytokines (IL-2, IL-7 and IL-15) *in vitro* upon activation, proliferation and apoptosis of immune memory T-cells. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 55 (8) : 566—571.)
- Ярилин А. А. 2010. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа. 752 с. (Yarilin A. A. 2010. Immunology. Moscow: GEOTAR-Media. 752 p.)
- Alves N. L., Hooibrink B., Arosa F. A., van Lier R. A. 2003. IL-15 induces antigen-independent expansion and differentiation of human naive CD8⁺ T cells *in vitro*. Blood. 102 : 2541—2546.
- Boyman O., Purton J. F., Surh C. D., Sprent J. 2007. Cytokines and T-cell homeostasis. Curr. Opin. Immunol. 19 : 320—326.
- Burchill M. A., Yang J., Vang K. B., Farrar M. A. 2007. Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis. Immunol. Lett. 114 : 1—8.
- Cai K., Wei R. 2013. Interleukin-7 expression in tears and orbital tissues of patients with Graves' ophthalmopathy. Endocrine. 44 : 140—144.
- Cho B. K., Rao V. P., Ge Q., Eisen H. N., Chen J. 2000. Homeostasis-stimulated proliferation drives naive T cells to differentiate directly into memory T cells. J. Exp. Med. 192 : 549—556.
- Cho J. H., Boyman O., Kim H. O., Hahn B., Rubinstein M. P., Ramsey C., Kim D. M., Surh C. D., Sprent J. 2007. An intense form of homeostatic proliferation of naive CD8⁺ cells driven by IL2. J. Exp. Med. 204 : 1787—1801.
- Coquet J. M., Middendorp S., van der Horst G., Kind J., Verar E. A., Xiao Y., Jacobs H., Borst J. 2013. The CD27 and CD70 costimulatory pathway inhibits effector function of T helper 17 cells and attenuates associated autoimmunity. Immunity Volume. 38 : 53—65.
- Geginat J., Sallusto F., Lanzavecchia A. 2001. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central me-

mory, and effector memory CD4(+) T cells. *J. Exp. Med.* 194 : 1711—1719.

Goldrath A. W., Bogatzki L. Y., Bevan M. J. 2000. Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. *J. Exp. Med.* 192 : 557—564.

Jiang Q., Li W. Q., Hofmeister R. R., Young H. A., Hodge D. R., Keller J. R., Khaled A. R., Durum S. K. 2004. Distinct regions of the interleukin-7 receptor regulate different Bcl2 family members. *Mol. Cell. Biol.* 24 : 6501—6513.

Kennedy M. K., Glaccum M., Brown S. N., Butz E. A., Vinney 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.

Kondrack R. M., Harbertson J., Tan J. T., McBreen M. E., Surh C. D., Bradley L. M. 2003. Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *J. Exp. Med.* 198 : 1797—1806.

Le Campion A., Pommier A., Delpoux A., Stouvenel L., Auf-fray C., Martin B., Lucas B. 2012. IL-2 and IL-7 determine the homeostatic balance between the regulatory and conventional CD4⁺ T cell compartments during peripheral T cell reconstitution. *J. Immunol.* 189 : 3339—3346.

Lee B., Hong C. 2015. The role of soluble common gamma chain in autoimmune disease. *Anat. Cell Biol.* 48 : 10—15.

Létourneau S., Krieg C., Pantaleo G., Boyman O. 2009. IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *Allergy Clin. Immunol.* 123 : 758—762.

Li J., Huston G., Swain S. L. 2003. IL-7 promotes the transition of CD4 effectors to persistent memory cells. *J. Exp. Med.* 198 : 1807—1815.

Liao W., Lin J. X., Leonard W. J. 2013. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity.* 38 : 13—25.

Libregts S., van Offfen R. W., van der Sluijs K. F., van Lier R. A., Nolte M. A. 2011. Function of CD27 in helper T cell differentiation. *Immunol. Lett.* 136 : 177—186.

Liu K., Catalfamo M., Li Y., Henkart P. A., Weng N. P. 2002. IL-15 mimics T cell receptor crosslinking in the induction of cellular proliferation, gene expression, and cytotoxicity in CD8⁺ memory T cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 99 : 6192—6197.

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.

Ma A., Koka R., Burkett P. 2006. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* 24 : 657—679.

Malek T. R., Castro I. 2010. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity.* 33 : 153—165.

Manjunath N., Shankar P., Wan J., Weninger W., Crowley M. A., Hieshima K., Springer T. A., Fan X., Shen H., Lieberman J., von Andrian U. H. 2001. Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 108 : 871—878.

Moses C. T., Thorstenson K. M., Jameson S. C., Khoruts A. 2003. Competition for self ligands restrains homeostatic proliferation of naive CD4 T cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 100 : 1185—1190.

Murali-Krishna K., Ahmed R. 2000. Cutting edge: naive T cells masquerading as memory cells. *J. Immunol.* 165 : 1733—1737.

Ribeiro S. T., Ribot J. C., Silva-Santos B. 2015. Five layers of receptor signaling in $\gamma\delta$ T-cell differentiation and activation. *Frontiers in Immunol.* 6 : 00015. Doi: 10.3389 / fimmu.2015.00015.

Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A. 2004. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* 22 : 745—763.

Schluns K. S., Kieper W. C., Jameson S. C., Lefrançois L. 2000. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells *in vivo*. *Nat. Immunol.* 1 : 426—432.

Schluns K. S., Lefrançois L. 2003. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nature Rev. Immunol.* 3 : 269—279.

Seddon B., Tomlinson P., Zamoyska R. 2003. Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nat. Immunol.* 4 : 680—686.

Sprent J., Surh C. D. 2002. T cell memory. *Annu. Rev. Immunol.* 20 : 551—579.

Stonier S. W., Ma L. J., Castillo E. F., Schluns K. S. 2008. Dendritic cells drive memory CD8 T cell homeostasis via IL-15 trans-presentation. *Blood.* 112 : 4546—4554.

Surh C. D., Sprent J. 2008. Homeostasis of naïve and memory T cells. *Immunity.* 29 : 848—862.

Van Montfrans J. M., Hoepelman A. I., Otto S., van Gijn M., van de Corput L., de Weger R. A., Monaco-Shawver L., Banerjee P. P., Sanders E. A., Jol-van der Zijde C. M., Betts M. R., Orange J. S., Bloem A. C., Tesselaar K. 2012. CD27 deficiency is associated with combined immunodeficiency and persistent symptomatic EBV viremia. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129 : 787—793.

Waldmann T. A. 2006. The biology of interleukin-2 and interleukin-15 : implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* 6 : 595—601.

Поступила 6 II 2017

THE EFFECT OF IMMUNOREGULATORY CYTOKINES (IL-2, IL-7 AND IL-15) ON CD45RA⁺CD4⁺/CD8⁺ T-CELLS MATURATION AND DIFFERENTIATION *IN VITRO*

K. A. Yurova, O. G. Khaziakhmatova, N. A. Dunets, N. M. Todosenko, V. V. Shupletsova, L. S. Litvinova¹

Laboratory for Immunology and Cell Biotechnologies of Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, 236016;

¹ e-mail: larislitvinova@yandex.ru

This study shows the effect of γ -cytokines (IL-2, IL7 and IL-15) on CD45RA⁺CD4⁺/CD8⁺ T-cells maturation and differentiation *in vitro*. The results demonstrate that high concentrations of IL-2 in CD45RA⁺CD4⁺ subpopulation mediates the increase in the number of CD45RA⁺CD4⁺ T lymphocytes with the phenotype of mature and immature T_{EMRA} T-cells. IL-15 promotes the formation of CD27⁻CD62L⁺ lymphocytes, possible T_{EMRA}, that retained the CD62L expression. γ s-Cytokines (IL-2, IL7 and IL-15) initiate in CD45RA⁺CD8⁺ T-cell populations initiate of mature T_{EMRA} (E) T-lymphocytes and memory T-cells (T_{CM}) with central phenotype CD45RA⁻CD27⁺CD62L⁺.

Key words: naïve T-cells, effector T-cells, terminal differentiated T-cells, central memory (T_{CT}) cells, immunoregulatory cytokines, maturation, differentiation.