

На правах рукописи

Сохоневич Наталия Александровна

**РОЛЬ ЦИТОКИНОВ, ИМЕЮЩИХ ОБЩУЮ γ -ЦЕПЬ
РЕЦЕПТОРОВ (IL-2, IL-7, IL-15), В РЕГУЛЯЦИИ
ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ Т-ЛИМФОЦИТОВ**

03.03.01 - физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Томск – 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего профессионального образования "Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта"

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Литвинова Лариса Сергеевна

Официальные оппоненты:

Колобовникова Юлия
Владимировна

доктор медицинских наук, профессор кафедры
патологической физиологии ГБОУ ВПО
«Сибирский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения РФ

Хайдуков Сергей
Владимирович

доктор биологических наук, старший научный
сотрудник отдела «Научно-инновационный центр
Технопарк» ФГБУН «Институт биоорганической
химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова» РАН

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Институт экспериментальной медицины" (г. Санкт-Петербург)

Защита состоится __ _____ 2015г. в ___ч на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, г. Томск, Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России и на сайте <http://www.ssmu.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Петрова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Современные исследования, посвященные ключевым вопросам физиологических механизмов иммунного контроля, сосредоточены, в основном, на изучении молекулярных и клеточных аспектов регуляции иммунной памяти (Radbruch A., Thiel A., 2004; Селедцов В.И. и др., 2010; Mahnke Y.D. et al., 2013; Gong C. et al., 2014). Клеточной основой иммунологической памяти являются селективная экспансия и дифференцировка клонов антиген-специфических В- и Т-лимфоцитов. Исследование структурно-функциональных свойств Т-клеток и анализ экспрессии их поверхностных маркеров позволяют выделять «наивные» лимфоциты, Т-клетки иммунной памяти и эффекторы (Sprent J., Surh C.D., 2001; Селедцов В.И. и др., 2010; Литвинова Л.С. и др., 2013). Наивные Т-лимфоциты проходят антиген-независимую дифференцировку (позитивная и негативная селекция) в тимусе, после которой появляются в периферическом кровотоке как зрелые наивные клетки. После антигенной стимуляции наивные Т-лимфоциты дифференцируются в периферических лимфоидных органах в эффекторные Т-клетки, а затем некоторые из них становятся Т-клетками памяти. Т-лимфоциты памяти долговечны и способны к дальнейшей дифференциации и пролиферации, чтобы стать эффекторными клетками при повторном контакте с антигеном (Sprent J., Surh C.D., 2001; Mahnke Y.D. et al., 2013; Gong C. et al., 2014).

Степень проработанности темы. В настоящее время признано существование четырех основных событий во время *иммунного ответа*: инициация, клональная экспансия, контракция/сжатие и образование пула Т-клеток памяти с дальнейшим поддержанием их численности за счет гомеостатических механизмов (Boyman O. et al. 2007; Rochman Y. et al., 2009; Mahnke Y.D. et al., 2013; Gong C. et al., 2014). Иммунная система, на основе гомеостатических механизмов, адаптируется к изменяющимся требованиям, возникающим в ходе стационарного существования и, особенно, при активации агентами инфекционной и неинфекционной природы (Ярилин А.А., 2010). Важными характерологическими особенностями лимфоцитов, ответственных за иммунную память, являются: 1) сохранение численного постоянства пула Т-клеток иммунной памяти *in vivo* (путем регуляции баланса процессов генерации, поддержания жизнеспособности и их гибели в организме в отсутствие антигенного стимула); 2) обеспечение ускоренной иммунной реакции на повторное антигенное воздействие (Geginat J. et al., 2002; Schluns K.S., Lefrançois L., 2003; Luckey C.J. et al., 2006; Boyman O. et al. 2007; Rochman Y. et al., 2009; Mahnke Y.D. et al., 2013; Gong C. et al., 2014).

Сущность ответной иммунной реакции организма на различные агенты инфекционной и неинфекционной природы определяется процессами пролиферации, дифференцировки и *программированной гибели*, которым подвергаются лимфоциты, как основные участники иммунного ответа. В ходе активационного (дифференцировочного) процесса на поверхности лимфоцитов последовательно экспрессируются молекулы активации (ранней и поздней), пролиферации, дифференцировки и апоптоза (Кудрявцев И.В., 2014; Литвинова Л.С. и др., 2014; Chang J.T. et al., 2014; Farber D.L. et al., 2014). Одним из перспективных направлений в изучении физиологических основ иммунного ответа является поиск, оценка и последующее определение роли наиболее значимых поверхностных антигенов, экспрессирующихся на иммунокомпетентных клетках, в реализации нормального иммунного ответа и при патологии.

Цитокины семейства I типа (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 и IL-21), имеющие общую γ -цепь, способны оказывать комплексное воздействие на клеточный гомеостаз Т-лимфоцитов разной степени дифференцировки (Литвинова Л.С. и др., 2013; Yamane H., Paul W.E., 2013; Farber D.L. et al., 2014; Lee B., Hong C., 2015; Schmitt N., Ueno H.,

2015). Весьма вероятно, что действие некоторых цитокинов на Т-клетки носит дозозависимый характер, определяется типом клеток-мишеней и их функциональным статусом (степенью дифференцировки, функциональной активностью, состоянием рецепторного аппарата клетки). Учитывая это обстоятельство, одни и те же цитокины могут проявлять разнонаправленные эффекты на «наивные» клетки-предшественницы и Т-клетки иммунной памяти (Литвинова Л.С. и др., 2013; Tkach K.E. et al., 2014; Schmitt N., Ueno H., 2015).

В связи с вышесказанным, целью настоящего исследования явилась комплексная оценка эффектов цитокинов, имеющих общую γ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7 и IL-15), на функциональную активность Т-клеток, ассоциированную с изменением репертуара поверхностных молекул, отражающих процессы активации, пролиферации, дифференцировки, созревания и апоптоза, в разных условиях культивирования *in vitro*

Задачи исследования:

1. Изучить влияние цитокинов, имеющих общую γ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7 и IL-15), на процессы дифференцировки CD4⁺ и CD8⁺ популяций CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-клеток, в условиях гомеостатической и активационной моделей культивирования *in vitro*.

2. Оценить эффекты γ -цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на процессы активации и пролиферации CD4⁺ и CD8⁺ популяций CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-клеток, в условиях гомеостатической и активационной моделей культивирования *in vitro*.

3. Исследовать действие цитокинов, имеющих общую γ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7 и IL-15), на позднюю активацию и апоптоз CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в CD45RA- и CD45RO- культурах, в условиях гомеостатической и активационной моделей культивирования *in vitro*.

4. Установить общие закономерности и особенности влияния цитокинов, имеющих общую γ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7 и IL-15), на функциональную активность Т-клеток, в зависимости от степени их дифференцировки и условий культивирования *in vitro*.

Научная новизна. Впервые показано, что влияние *in vitro* цитокинов, имеющих общую γ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7 и IL-15), на гомеостаз Т-клеток определяется степенью их дифференцировки (наивные лимфоциты, Т-клетки памяти, эффекторные клетки) и функциональным состоянием, фенотипически выражающимся изменением спектра поверхностных молекул активации, пролиферации, дифференцировки, созревания и апоптоза. Приоритетными являются данные, свидетельствующие, что в гомеостатической и активационной моделях культивирования *in vitro* γ -цитокины (IL-2, IL-7 и IL-15), в разной степени, способствуют дифференцировке CD4⁺ и CD8⁺ наивных клеток (T_N) и CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток с фенотипом центральной памяти (T_{CM}) в эффекторные клетки разной степени зрелости. Впервые установлено, что эффекты γ -цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на процессы активации CD45RA⁺CD4⁺ и CD45RA⁺CD8⁺ Т-клеток (ассоциированные с экспрессией молекул - CD69 и CD25), в гомеостатической модели культивирования и на фоне TCR-стимуляции *in vitro*, имеют однонаправленный характер, но разную степень выраженности. Выявлено, что CD45RA⁺CD4⁺ Т-лимфоциты, в сравнении с CD45RA⁺CD8⁺ Т-клетками, менее чувствительны к пролиферативному действию γ -цитокинов. Приоритетными являются данные, что в гомеостатической модели культивирования *in vitro* CD45RO⁺CD4⁺ Т-лимфоциты обладают относительной резистентностью к активационному и пролиферативному действию цитокинов, в сравнении с CD45RO⁺CD8⁺ Т-клетками. В активационной модели *in vitro*, напротив, CD45RO⁺CD8⁺ Т-клетки демонстрируют меньшую чувствительность к активирующим и пролиферативным эффектам γ -цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15). Впервые выявлено, что эффекты γ -цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на экспрессию

молекулы CD95 (Fas/APO-1) CD4⁺ и CD8⁺ популяциями CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-клеток имеют разную направленность и разную степень выраженности. В гомеостатической и активационной моделях культивирования *in vitro*, γ -цитокины способствуют росту числа CD3⁺CD8⁺CD95⁺ Т-клеток в популяциях наивных лимфоцитов (T_N) и Т-клеток с фенотипом центральной памяти (T_{CM}), тогда как экспрессия молекулы CD95 эффекторными CD8⁺ Т-клетками (CD62L⁻) а также CD4⁺ Т-клетками разной степени зрелости, не изменяется. Показано, что в CD4⁺ и CD8⁺ популяциях эффекторных (CD62L⁻) CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-клеток, более 99% лимфоцитов с фенотипом - CD3⁺HLA-DR⁺, экспрессируют маркер CD95. Однако не все CD95-позитивные Т-лимфоциты несут на своей поверхности маркер «поздней активации» HLA-DR⁺. Опосредованное влиянием цитокинов повышение содержания CD3⁺HLA-DR⁺CD95⁺ клеток в CD4⁺ и CD8⁺ популяциях эффекторных (CD62L⁻ негативных) CD45RA⁻ и CD45RO⁻ Т-лимфоцитов, может свидетельствовать о процессах терминальной дифференцировки и созревания клеток под действием γ -цитокинов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разнонаправленное влияние цитокинов, имеющих общую γ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7 и IL-15), на гомеостаз CD4⁺ и CD8⁺ популяций Т-клеток определяется степенью их зрелости (наивные, Т-клетки памяти, эффекторные клетки) и условиями культивирования *in vitro* (гомеостатическая и активационная модели), что фенотипически выражается изменением спектра поверхностных молекул активации, пролиферации, дифференцировки, созревания и апоптоза.

2. Цитокины, имеющие общую γ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7 и IL-15), в гомеостатической и активационной моделях *in vitro* культивирования, способствуют дифференцировке наивных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток (T_N) и CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток с фенотипом центральной памяти (T_{CM}) в незрелые и/или зрелые эффекторные Т-клетки (T_{EM}, T_{EMRA}).

3. Эффекты γ -цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на процессы активации и пролиферации CD4⁺ и CD8⁺ популяций Т-клеток носят разнонаправленный характер, который определяется стадией их дифференцировки (наивные, Т-клетки памяти, эффекторные клетки) и условиями *in vitro* культивирования.

4. Экспрессия молекул HLA-DR и CD95 эффекторными популяциями (CD3⁺CD4⁺/CD8⁺CD62L⁻) CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-клеток является фенотипическим признаком терминальной фазы дифференцировки и созревания Т-лимфоцитов. CD4⁺ и CD8⁺ эффекторные клетки (CD62L⁻), а также CD8⁺ Т-клетки центральной памяти (T_{CM}), конститутивно экспрессируют молекулу CD95 на своей мембране.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные данные фундаментального характера раскрывают новые аспекты влияния цитокинов, имеющих общую γ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7 и IL-15), на функциональную активность Т-клеток, ассоциированную с изменением репертуара поверхностных молекул, отражающих процессы активации, пролиферации, дифференцировки, созревания и апоптоз, лежащие в основе формирования первичных и вторичных иммунных реакций. Практическая значимость полученных данных о цитокиноопосредованном контроле функциональной активности Т-клеток, в условиях гомеостатической и антигеннезависимой (TCR) - стимуляции, может представлять интерес для расшифровки фундаментальных иммунных механизмов генерации иммунной памяти, с одной стороны - как основного звена формирования и поддержания протективной противоинойфекционной и противоопухолевой защиты, с другой – реализации аутоиммунной патологии. Результаты настоящего исследования могут быть положены в основу разработки технологии управления процессами клеточного гомеостаза и функциональным состоянием Т-клеточного звена с применением биомолекул (цитокинов).

Результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе на кафедрах фундаментальной медицины медицинского института БФУ им. И. Канта и кафедре молекулярной физиологии и биофизики химико-биологического института БФУ им. И. Канта г. Калининграда.

Методология и методы исследования. Согласно поставленным задачам выбраны высокоинформативные методы исследования, которые выполнялись на базе современной научно-исследовательской лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий Инновационного парка БФУ им. И. Канта. В качестве материала исследования использовали первичные культуры $CD3^+CD45RA^+$ и $CD3^+CD45RO^+$ Т-лимфоцитов, полученные из взвеси мононуклеарных клеток периферической венозной крови здоровых доноров.

Основные методы исследования:

1. Иммуномагнитная сепарация (получение монокультур $CD3^+CD45RA^+$ и $CD3^+CD45RO^+$ Т-лимфоцитов из взвеси мононуклеарных клеток здоровых доноров);
2. Культуральные методы исследования *in vitro*;
3. Оценка жизнеспособности $CD3^+CD45RA^+$ и $CD3^+CD45RO^+$ Т-клеточных культур и определение поверхностных маркеров (CD45RA; CD45RO; CD3; CD4; CD8; CD69; CD25; CD71; CD95; HLA-DR; CD62L и CD27) на Т-клетках, методом проточной цитофлуориметрии;
4. Статистический анализ результатов.

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

Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на межгородской научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (г. Санкт-Петербург, 2011, 2012, 2013 гг.); международной заочной научно-практической конференции «Научная дискуссия: вопросы медицины» (г. Москва, 2013, 2015 гг.); III-ей Международной конференции «Фундаментальные и прикладные исследования в биологии» (Fundamental and applied research in biology 3rd international scientific conference) (Украина, г. Донецк, 2014 г.); Международной научно-практической конференции «Перспективы развития науки и образования» (г. Москва, 2013, 2015 гг.); объединенном иммунологическом форуме (г. Нижний Новгород, 2013 г.); международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (г. Москва, 2015 г.); XII конференции иммунологов Урала (г. Пермь, 2015); XV всероссийском научном форуме с международным участием им. Акад. В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (г. Санкт-Петербург, 2015), а также на научно-образовательных семинарах на базе Лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского Федерального Университета им. И. Канта (г. Калининград, 2012-2015). В работе приводятся результаты научно-исследовательских работ «Исследование молекулярно-биологических механизмов модуляции иммунологической памяти в норме и при аутоиммунной патологии» (ГК №П1252 от 27 августа 2009 г.); «Стероидная регуляция иммунной памяти» (Грант Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых - докторов наук (МД-4999.2012.7); «Разработка технологии дозозависимого управления процессами клеточного гомеостаза и функциональным состоянием Т-клеток памяти с применением биомолекул (цитокинов)» (Соглашение 14.132.21.1778 от 01.10.12 г.); «Исследование влияния иммунорегуляторных цитокинов на регуляцию процессов активации, дифференцировки и самоподдержания Т-клеток иммунной памяти» (СП-454.2013.4 2013-2015гг. от 28.02.2013).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 20 печатных работ, из них 8 статей в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, определенных ВАК РФ и 12 статей и тезисов в материалах конференций и симпозиумов.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 200 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 33 рисунками и 17 таблицами. Библиографический указатель включает 432 источника (44 - отечественных и 388 - иностранных). **Личное участие автора.** Автор принимал непосредственное участие в разработке дизайна и планировании исследования. Результаты получены, проанализированы и обобщены в выводах и положениях автором лично.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

В основу работы положены результаты комплексного исследования 58 здоровых доноров (29 мужчин и 29 женщин в возрасте от 22 до 35 лет). *Критериями исключения* из исследования являлись: возраст моложе 18 и старше 35 лет; период обострения хронических воспалительных заболеваний; инфекционные, онкологические, аутоиммунные, наследственные и психические болезни; алкогольная и наркотическая зависимости. Материалом для исследования служила венозная кровь (20 мл), взятая из локтевой вены с помощью стандартных вакуумных систем "BD VACUTAINER TM" («Greiner-bio-one», Австрия), стабилизированная К₃ЭДТА. Разрешение на проведение исследования получено в локальном этическом комитете (№ 5 от 5 ноября 2013 г.). Все экспериментальные исследования проводились на базе лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий Инновационного парка БФУ им. И.Канта (зав. лабораторией – д-р мед. наук, Л.С. Литвинова).

В соответствии с поставленной целью и задачами исследования, нами были использованы разные *модели in vitro* культивирования: *гомеостатическая* и *активационная*. Последняя отражает процесс взаимодействия Т-лимфоцитов разной степени дифференцировки с антиген-презентирующими клетками (активация Т-клеток через CD2, CD3 и CD28).

Выделение мононуклеарных лейкоцитов из периферической крови осуществляли стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографин («Pharmacia», Швеция) ($\rho=1,077$ г/см³). Полученную взвесь мононуклеарных клеток доводили фосфатно-солевым буфером (с 0,5% BSA «Miltenyi Biotec», Германия) до 1 мл и в дальнейшем использовали для выделения фракций CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-лимфоцитов методом иммуномагнитной сепарации (ИМС), в основе которого лежит технология MACS® («Miltenyi Biotec» Германия). Подсчёт клеточности в культурах Т-клеток разной степени дифференцировки проводили с помощью автоматического счётчика клеток (Countess™ Automated Cell Counter, «Invitrogen», США) с использованием красителя Trypan blue 0,4% («Invitrogen», США). Жизнеспособность составляла не менее 95-98% от общего числа клеток. В эксперименте использовали клеточные культуры, содержание CD3⁺CD45RA⁺CD14⁻CD19⁻ и CD3⁺CD45RO⁺CD14⁻CD19⁻ клеток в которых, составляло, в среднем $97,5 \pm 2,12\%$. Полученные культуры клеток с фенотипом - CD45RA⁺ и CD45RO⁺ ($1,0 \times 10^6$ кл/мл) культивировали в 48-луночных планшетах в бессывороточной среде Искова («Sigma-Aldrich», США), содержащей 0.5% сывороточного альбумина человека («Микроген», Россия), 5×10^{-5} М β -меркаптоэтанола («Acros Organics», США) и 30 мкг/мл гентамицина в течение 24 и 48 ч при 37⁰С, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. В эксперименте были использованы разные концентрации рекомбинантных форм цитокинов – IL-2, IL-7, IL-15 и клеточный активатор («Miltenyi Biotec», Германия). В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали реагент T-Cell Activation/Expansion Kit human (Ac/Exp)

(«Miltenyi Biotec», Германия) - антибиотиновые частицы MACSiBead™ с биотинилированными антителами против CD2⁺, CD3⁺, CD28⁺ человека.

Для выполнения исследования были использованы следующие варианты культивирования: для *гомеостатической модели*: интактная проба; пробы с добавлением разных концентраций цитокинов: rIL-2/rIL-7 или rIL-15 (0,1 - 0,5 - 1,0 нг/мл); для *активационной модели*: интактная проба; проба с добавлением Т-клеточного активатора - Ac/Exp; пробы с добавлением разных концентраций цитокинов: rIL-2/rIL-7 или rIL-15 (0,1 - 0,5 - 1,0 нг/мл) и Т-клеточного активатора.

Регистрацию жизнеспособности и подсчет числа клеток в исследуемых клеточных культурах проводили с использованием реагента «GuavaViaCount» (Millipore, США) и одноименной программы, методом проточной лазерной цитометрии на проточном цитометре «GuavaEasyCite Plus» (Millipore, США), согласно протоколу производителя. Определение поверхностных маркеров: CD4, CD8, CD69, CD25, CD71, CD95, HLA-DR, CD62L, CD27 на CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-клетках осуществляли методом проточной цитометрии с использованием коктейлей моноклональных антител («eBioscience», США; «Abcam», Великобритания; «Miltenyi Biotec», Германия), приготовленных *ex temporo*:

- ❖ CD45RA или CD45RO-APC/CD3-Viablue/CD4-FITC/CD8-PerCp.Cy5.5/CD62L-PE/CD27-PE.Cy7;
- ❖ CD45RA или CD45RO-APC/CD3-Viablue/CD4-FITC/CD8-PerCp.Cy5.5/CD69-PE;
- ❖ CD45RA или CD45RO-APC/CD3-Viablue/CD4-PE.Cy7/CD8-PE/CD25-FITC;
- ❖ CD45RA или CD45RO-APC/CD3-Viablue/CD4-PE.Cy7/CD8-PE/CD71-FITC;
- ❖ CD45RA или CD45RO-APC/CD3-Viablue/CD4-PE.Cy7/CD8-PerCp.Cy5.5/HLA-DR-FITC/CD62L-PE;
- ❖ CD45RA или CD45RO-APC/CD3-Viablue/CD4-PE.Cy7/CD8-PerCp.Cy5.5/CD95-FITC/CD62L-PE;
- ❖ CD45RA или CD45RO-APC/CD3-Viablue/CD4-PE.Cy7/CD8-PerCp.Cy5.5/HLA-DR-FITC/CD62L-PE/CD95-APC-Vio770.

Регистрацию результатов проводили на проточном цитофлуориметре MACS Quant («Miltenyi Biotec», Германия). Данные цитометрического анализа были проанализированы с помощью программы «KALUZA Analysis Software» (Beckman Coulter, США).

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences). Оценку полученных результатов проводили методами статистического описания и проверки статистических гипотез (Кремер Н.Ш., 2004). При анализе имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (Колмогорова-Смирнова). Для каждой выборки вычисляли средневывборочные характеристики: для нормально распределенных выборок вычисляли среднее арифметическое (\bar{X}), ошибку среднего (m); для выборок, распределение которых отличалось от нормального: медиану (M), первый и третий квартили (Q_1 , Q_3). Для оценки достоверности различий выборок, использовали параметрический (t-критерий Стьюдента) или непараметрический (Вилкоксона) для зависимых выборок. С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный и регрессионный анализы. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ (Кремер Н.Ш., 2004).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка влияния цитокинов, имеющих общую γ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7 и IL-15) на процессы дифференцировки CD4 и CD8 Т-клеток в CD45RA и CD45RO культурах, в условиях гомеостатической и активационной моделей культивирования *in vitro*

В контрольных образцах CD45RA⁺-культур распределение по основным популяциям было следующим: число Т-клеток с «наивным» фенотипом (T_N) - CD4⁺/CD8⁺CD27⁺CD62L⁺ - было равным 95,49 (79,79 – 96,28) и 64,49 (36,60 – 75,08)%; содержание зрелых эффекторных клеток (T_{EMRA}, E) - CD4⁺/CD8⁺ CD45RA⁺CD27⁻CD62L⁻ составило - 2,36 (1,16 – 3,44) и 23,42 (13,79 – 45,76)%, соответственно; число Т-клеток с фенотипом незрелых «ранних» T_{EMRA} Т-лимфоцитов (CD8⁺/CD4⁺CD45RA⁺CD27⁺CD62L⁻) составило 0,66 (0,43-1,58) и 4,91(4,33-5,91)%, соответственно, что, в целом, не противоречит данным литературы (Rufer N. et al., 2003; Sallusto F. et al., 2004; Di Mitri D. et al., 2011; Кудрявцев И.В., 2014; Chang J.T. et al., 2014). Число CD45RA⁺CD27⁻CD62L⁻ клеток в контрольных пробах CD4⁺ Т-клеток было в 4 раза ниже, чем в CD8⁺CD45RA⁺-популяциях Т-клеток. Предполагают, что эта популяция представляет собой прямой переход от наивных (CD45RA⁺CD27⁺CD62L⁺) Т-клеток в терминально-дифференцированные эффекторы (CD45RA⁺CD27⁻) (T_{EMRA}), на которых, однако, сохраняется экспрессия молекулы CD62L.

IL-2 - плейотропный цитокин, играет важную и сложную роль в регуляции функций иммунокомпетентных клеток (Stittrich A.V. et al., 2010). Выступая в качестве основного фактора роста Т-лимфоцитов, IL-2 поддерживает антигензависимую дифференцировку и пролиферацию разных клеточных субпопуляций, а также является регулятором апоптотической гибели клеток, опосредованной активацией, ограничивая, тем самым, чрезмерные иммунные реакции (Létourneau S. et al., 2009; Liao W. et al., 2011, 2013). Добавление rIL-2 (1,0 нг/мл) в CD45RA⁺ - культуры приводило к повышению числа незрелых (CD45RA⁺CD27⁺CD62L⁻) и зрелых (CD45RA⁺CD27⁻CD62L⁻) T_{EMRA} Т-клеток в CD4⁺ популяциях, в целом, за счет снижения содержания Т-лимфоцитов с наивным фенотипом CD4⁺CD45RA⁺CD27⁺CD62L⁺. Действие rIL-2 (0,1-1,0 нг/мл) на CD8⁺ популяцию сопровождалось равномерным увеличением числа только зрелых эффекторных T_{EMRA} Т-клеток. rIL-2 (1,0 нг/мл) индуцировал образование цитотоксических Т-клеток центральной памяти (CD45RA⁻CD62L⁺CD27⁺, T_{CM}) (рисунок 1).

Выявленное нами, IL-2-опосредованное повышение числа CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁻CD27⁻ (E) в культурах CD45RA⁺ Т-клеток, на фоне снижения содержания лимфоцитов с наивным фенотипом, позволяет предположить факт прямой дифференцировки наивных Т-клеток в эффекторные. Этот тезис подтвержден наличием взаимосвязей между содержанием зрелых T_{EMRA} (CD45RA⁺CD62L⁻CD27⁻) Т-клеток и числом лимфоцитов с наивным фенотипом (T_N) (r = - 0,67, r = - 0,70, p < 0,05 для CD45RA⁺CD8⁺ Т-клеток при действии IL-2 (0,5-1,0 нг/мл) и r = - 0,856 p < 0,05 для CD45RA⁺CD4⁺ Т-клеток при действии IL-2 (1,0 нг/мл), соответственно).

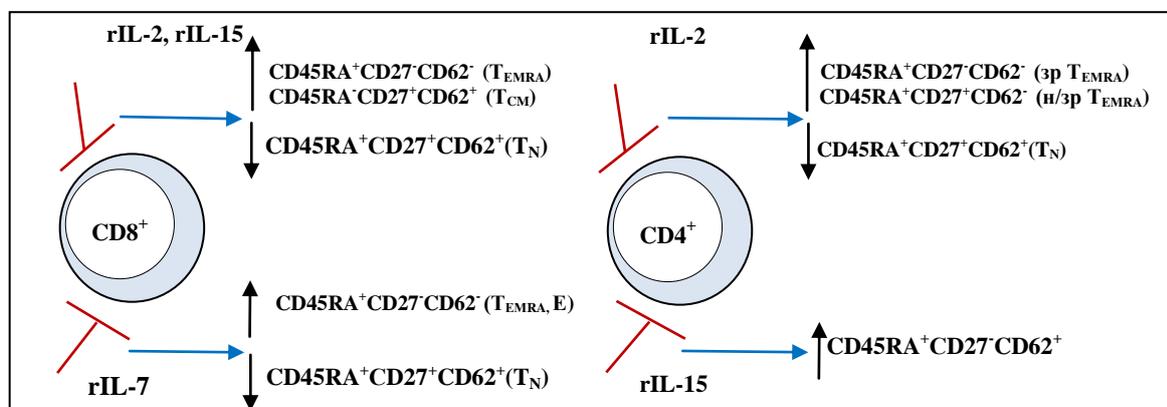


Рисунок 1 - Влияние γ -цитокинов (rIL-2, rIL-7 и rIL-15) на дифференцировку и созревание CD4⁺/CD8⁺ Т-клеток в популяции CD45RA⁺ Т-лимфоцитов в гомеостатической модели культивирования *in vitro*

IL-7 и IL-15, наряду с IL-2, принадлежит важная роль в процессах врожденного и адаптивного иммунитета (Nishimura H. et al., 2000; Fehniger T.A., Caligiuri M.A., 2001; Chen J. et al., 2013; Lee N. et al., 2014; Marçais A. et al., 2014).

Увеличение числа зрелых ($CD8^+CD27^-CD62L^-$) T_{EMRA} эффекторов регистрировалось только при добавлении максимальной концентрации rIL-7 (1,0 нг/мл). Перераспределение субпопуляционного состава эффекторных $CD8^+$ Т-клеток регистрировалось на фоне снижения числа Т-лимфоцитов с незрелым эффекторным ($CD8^+CD27^+CD62L^-$) фенотипом и не затрагивало наивные Т-клетки. Возможно, что действие цитокина на $CD8^+$ Т-лимфоциты может быть обусловлено способностью IL-7 активировать продукцию IL-2 Т-клетками, который, действуя аутокринно и паракринно, может способствовать дифференцировке и созреванию Т-клеток в «эффекторы», для которых характерна потеря экспрессии молекул хоуминга и костимуляции (Бойчук С.В., Дунаев П.Д., 2008; Bayer A.L. et al., 2013). $CD4^+$ субпопуляция $CD45RA^+$ Т-клеток была нечувствительна к действию rIL-7. *In vivo*, наивные покоящиеся Т-клетки получают сигналы низкого уровня через контакт с IL-7 и молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС), которые позволяют клеткам выживать в течение длительного времени в состоянии покоя, не подвергаясь антигеннезависимой дифференцировке (Sprent J., Surh C.D., 2002; Boyman O. et al. 2007; Ярлин А.А., 2010; Le Campion A. et al., 2012).

Действие IL-15 на $CD8^+CD45RA^+$ Т-клетки, в целом, было схожим с rIL-2. Добавление rIL-15 (0,5-1,0 нг/мл) в среду культивирования приводило к повышению числа $CD45RA^+CD8^+CD27^-CD62L^-$ и $CD45RA^-CD8^+CD27^+CD62L^+$ Т-клеток на фоне снижения $CD45RA^+CD8^+CD27^+CD62L^+$. rIL-15 (1,0 нг/мл) индуцировал повышение числа $CD4^+CD27^-CD62L^+$ Т-клеток (рисунок 1). Данные научной периодики в отношении действия IL-15 на дифференцировку Т-клеток, крайне противоречивы (Alves N.L. et al., 2003; Wallace D.L. et al., 2006). Liu K. и др. (2002) было установлено, что IL-15 имитируя связывание с TCR, приводит к индукции клеточной пролиферации и повышению цитотоксической активности $CD8^+$ Т-клеток (Liu K. et al., 2002).

Добавление активатора в культуры $CD45RA^+$ Т-клеток сопровождалось ростом числа T_{EM} в популяциях $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток за счет снижения содержания наивных Т-лимфоцитов. Активация приводила к резкому снижению числа $CD8^+$ T_{EMRA} эффекторов (в среднем, на 30%), что может быть обусловлено их гибелью, опосредованной крайней чувствительностью к дисбалансу иницирующих сигналов (Di Mitri D. et al., 2011; Libri V. et al., 2011), и, напротив, к росту содержания $CD27^-CD62L^+$ Т-клеток в $CD4^+$ и $CD8^+$ популяциях $CD45RA^+$ Т-клеток.

Инкубация $CD45RA^+$ Т-клеток с rIL-2 (1,0 нг/мл) и rIL-15 (0,5 нг/мл), сопровождалась увеличением (по сравнению с пробой только с добавлением активатора) зрелых цитотоксических T_{EMRA} эффекторов ($p < 0,05$) (рисунок 2).

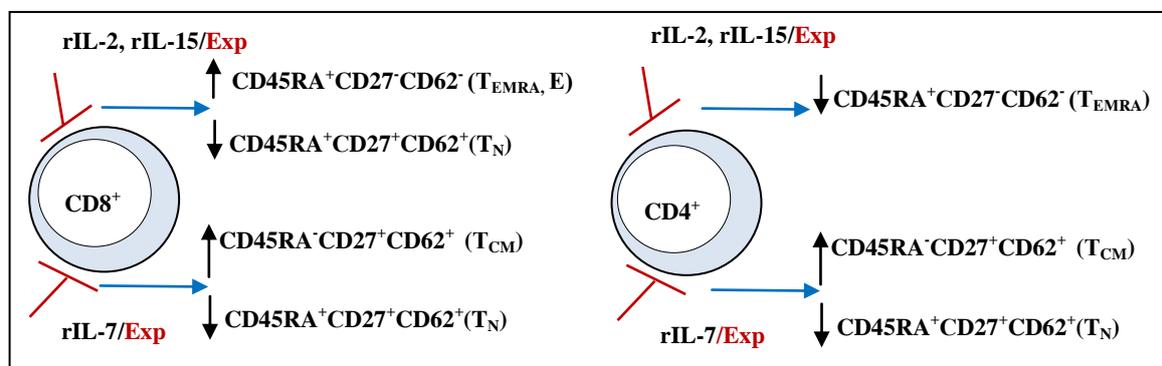


Рисунок 2 - Влияние γ -цитокинов (rIL-2, rIL-7 и rIL-15) на дифференцировку и созревание $CD4^+/CD8^+$ Т-клеток в популяции $CD45RA^+$ Т-лимфоцитов, в активационной модели культивирования *in vitro*

Обнаруженная нами взаимосвязь между содержанием зрелых T_{EMRA} эффекторов и наивных $CD8^+$ Т-клеток может свидетельствовать об цитокин-опосредованной

дифференцировке TCR-активированных клеток ($r=0,60$, $p<0,05$ при действии IL-2 (1,0 нг/мл) и $r= - 0,72$ $p<0,05$ при действии IL-15 (0,5 нг/мл), соответственно). В субпопуляции TCR-активированных CD4⁺ Т-клеток, эффекты rIL-2 и rIL-15 (1,0 нг/мл), напротив, были направлены на снижение числа CD45RA⁺CD4⁺CD27⁻CD62L⁻ Т-клеток, что может быть связано с их повышенной гибелью (Sallusto F. et al., 2004; Кудрявцев И.И., 2014). Сочетанное действие активатора и rIL-7 (1,0 нг/мл) сопровождалось появлением в CD4⁺/CD8⁺CD45RA⁺ популяциях T_{CM} лимфоцитов, за счет снижения числа Т-клеток с наивным фенотипом, что подтверждают обнаруженные нами корреляционные взаимосвязи между содержанием T_{CM} и T_N ($r= - 0,55$ и $r= - 0,60$, $p<0,05$ для CD45RA⁺ CD4⁺/CD8⁺ Т-клеток при действии 1,0 нг/мл rIL-7).

На момент окончания срока инкубации (48ч), число центральных Т-клеток памяти с фенотипом CD3⁺CD4⁺/CD8⁺CD62L⁺CD27⁺ (T_{CM}) в интактных популяциях CD45RO⁺ Т-клеток составило 54,12 (49,02 – 58,66) и 21,19 (20,76 – 27,24)%; незрелых эффекторных клеток CD3⁺ CD4⁺/CD8⁺CD62L⁻CD27⁻ (для CD45RO⁺CD8⁺ лимфоцитов: T_{EM}: Em1; Em2) – 10,36 (8,07 – 13,26) и 31,90 (28,51 – 42,48)%, а зрелых эффекторов - CD3⁺CD4⁺/CD8⁺CD62L⁻CD27⁻ (для CD45RO⁺CD8⁺ лимфоцитов T_{EM}: Em3; Em4) - 18,47 (18,28-20,16) и 34,90 (32,51 – 39,48)%. Также в популяциях CD4⁺/CD8⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов нами были обнаружены клетки с фенотипом - CD3⁺CD8⁺CD62L⁺CD27⁻ (предположительно – эти клетки могут рассматриваться в качестве переходной формы между T_{CM} и T_{EM}, индуцируемые *in vitro*). Эффекты rIL-2, rIL-7 и rIL-15 (1,0 нг/мл) *in vitro* на культуры CD45RO⁺ CD8⁺ Т-клеток были ассоциированы с увеличением числа зрелых эффекторных Т-лимфоцитов с фенотипом - CD62L⁻CD27⁻ (T_{EM}: Em3 и Em4) и CD45RO⁺CD62L⁻CD27⁻ Т-клеток (T_{EMRA}, E). Все изменения регистрировались на фоне снижения содержания T_{CM} и T_{EM} (Em1 и Em2) Т-клеток (рисунок 3).

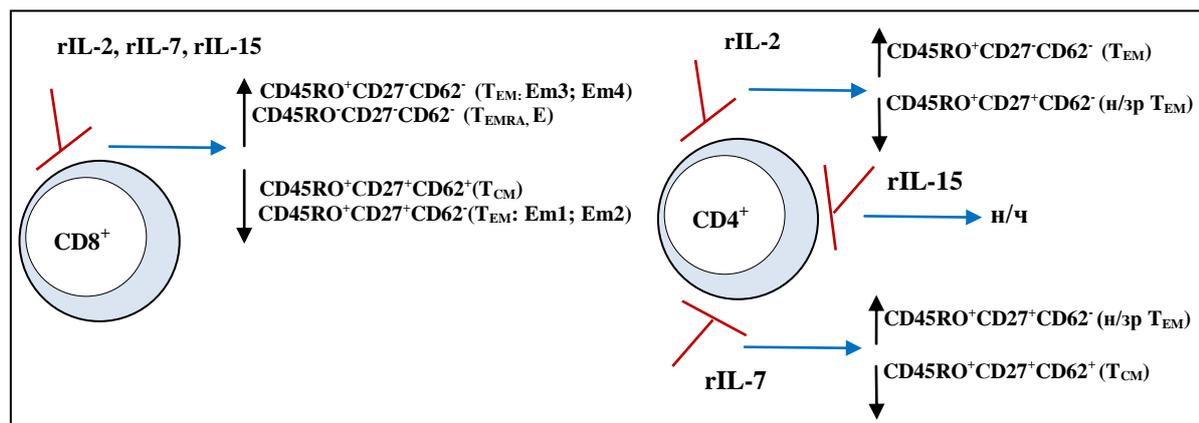


Рисунок 3 - Влияние γ -цитокинов (rIL-2, rIL-7 и rIL-15) на дифференцировку и созревание CD4⁺/CD8⁺ Т-клеток в популяции CD45RO⁺ Т-лимфоцитов в гомеостатической модели культивирования *in vitro*

Нами были выявлены отрицательные ассоциации между числом CD8⁺CD62L⁺CD27⁺ Т-клеток и содержанием CD8⁺CD62L⁻CD27⁻ (T_{EM}: Em3 и Em4) Т-лимфоцитов ($r= - 0,70$ и $r= - 0,65$, $p<0,05$ при действии rIL-2 и rIL-15 (1,0 нг/мл), соответственно); между содержанием CD8⁺CD62L⁺CD27⁺ Т-клеток и CD45RO⁺CD8⁺CD62L⁻CD27⁻ ($r= - 0,83$, $p<0,05$ при действии rIL-2 (1,0 нг/мл), соответственно); а также между количеством CD8⁺CD62L⁻CD27⁺ Т-клеток содержанием CD8⁺CD62L⁻CD27⁻ лимфоцитов ($r= - 0,56$ и $r= - 0,70$, $p<0,05$ при действии rIL-2 и rIL-15 (1,0 нг/мл), соответственно). В CD45RO⁺CD4⁺ - популяции, IL-2 (1,0 нг/мл) способствовал повышению числа CD45RO⁺CD62L⁻CD27⁻ Т-клеток на фоне снижения содержания незрелых эффекторов - CD45RO⁺CD4⁺CD62L⁻CD27⁻ ($r= - 0,80$, $p<0,05$). Интересно, что действие rIL-7 (1,0 нг/мл) на CD4⁺CD45RO⁺ Т-клетки индуцировало образование популяции незрелых T_{EMRA} Т-клеток, в целом, за счет снижения содержания T_{CM} ($r= - 0,58$, $p<0,05$). CD45RO⁺CD4⁺ Т-клетки были нечувствительны к действию rIL-15

(рисунок 3). Феномен дифференцировки *in vivo* Т-лимфоцитов памяти в эффекторные Т-клетки памяти и терминально-дифференцированные CD45RA-позитивные Т-клетки (T_{EMRA}), под действием цитокинов, широко представлен в мировой литературе (Silva de Azevedo R.I., 2011; Кудрявцев И.В., 2014).

Добавление TCR-активатора в CD45RO⁺ - культуры, сопровождалось ростом содержания зрелых цитотоксических эффекторных Т-клеток (CD62L⁻CD27⁻) и T_{EMRA} (CD45RO⁺CD62L⁻CD27⁻) Т-лимфоцитов на фоне снижения числа CD62L⁺CD27⁺ (T_{CM}) Т-клеток. Выявленные взаимосвязи между содержанием CD62L⁻CD27⁻ (T_{EM}) и CD45RO⁺CD62L⁻CD27⁻ (E) Т-клеток и числом CD62L⁺CD27⁺ Т-лимфоцитов (r = - 0,60 и r = - 0,70, p < 0,05, соответственно) может свидетельствовать о дифференцировке центральных цитотоксических Т-клеток памяти в эффекторные лимфоциты. В популяции CD45RO⁺CD4⁺ Т-клеток, добавление *in vitro* активатора, напротив, приводило к повышению содержания незрелых эффекторных Т-клеток (рисунок 4).

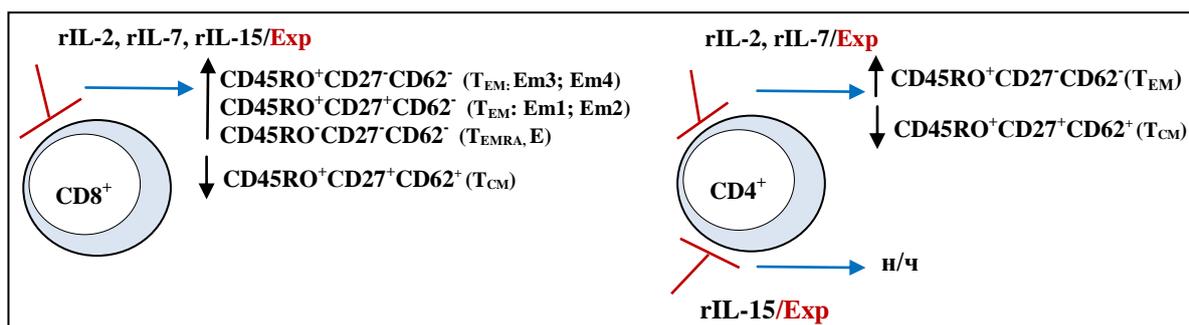


Рисунок 4 - Влияние γ -цитокинов (rIL-2, rIL-7 и rIL-15) на дифференцировку и созревание CD4⁺/CD8⁺ Т-клеток в популяции CD45RO⁺ Т-лимфоцитов, в активационной модели культивирования *in vitro*

Инкубация TCR-активированных CD8⁺CD45RO⁺ Т-клеток с rIL-2 и rIL-15 (0,5 - 1,0 нг/мл) а также с rIL-7 (1,0 нг/мл) приводила к дифференцировке и созреванию цитотоксических Т-лимфоцитов в эффекторные Т-клетки, фоне снижения содержания T_{CM} (рисунок 4). Нами были выявлены отрицательные корреляции между содержанием CD8⁺CD62L⁻CD27⁻ Т-клеток и числом CD8⁺CD62L⁺CD27⁺ Т-лимфоцитов (r = - 0,50, r = - 0,70, r = - 0,62, p < 0,05 при действии rIL-2, rIL-15 и rIL-7 (1,0 нг/мл), соответственно), а также между содержанием CD8⁺CD62L⁻CD27⁻ лимфоцитов и количеством CD8⁺CD62L⁺CD27⁺ Т-клеток (r = - 0,70, p < 0,05 при действии rIL-2 (1,0 нг/мл), соответственно). На фоне TCR-активации, добавление в среду культивирования CD45RO⁺ Т-клеток rIL-2 (1,0 нг/мл) и rIL-15 (0,5 нг/мл), сопровождалось достоверным (по сравнению с пробами только с добавлением активатора), увеличением числа CD45RO⁺CD62L⁻CD27⁻ Т-клеток (рисунок 4). Инкубация TCR-активированных CD45RO⁺CD4⁺ Т-клеток с rIL-2 и rIL-7 (1,0 нг/мл) приводила к дифференцировке T_{CM} клеток в лимфоциты с фенотипом зрелых эффекторов (r = - 0,59, r = - 0,70, p < 0,05 при действии rIL-2 и rIL-7 (1,0 нг/мл) соответственно). CD45RO⁺CD4⁺ Т-клетки были нечувствительны к действию rIL-15 (рисунок 4).

Оценка влияния цитокинов, имеющих общую γ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7 и IL-15), на процессы активации и пролиферации CD4 и CD8 Т-клеток в CD45RA и CD45RO культурах, в условиях гомеостатической и активационной моделей культивирования *in vitro*

Одним из первых фенотипических признаков активации Т-клеток является появление мембранного рецептора - CD69, экспрессия которого опосредует увеличение концентрации внутриклеточного Ca⁺⁺ и синтез различных цитокинов и их рецепторов, включая IL-2 и IL-2R α (CD25) (González-Amaro R. et al., 2013; Литвинова Л.С. и др., 2014; De la Fuente H. et al., 2014). В гомеостатической модели *in vitro*, добавление rIL-2 в CD45RA⁺ Т-культуры приводило к значительному повышению

числа CD69⁺ (через 24 ч) и CD25⁺ (через 48ч) Т-клеток (рисунок 5). Следует отметить, что эффекты, оказываемые rIL-2 на CD45RA⁺ Т-клетки имели четкую зависимость от концентрации цитокина ($r^2=0,87$, $p<0,05$, в отношении CD69⁺ Т-клеток; $r=0,72$, $p<0,05$, в отношении CD25⁺ Т-клеток, соответственно) и равномерно затрагивали CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки. Следующим этапом эффективной активации Т-лимфоцита является появление на его мембране рецептора к трансферину (CD71/TfR1), который, как правило, экспрессируется пролиферирующими клетками (Marsee D.K. et al., 2010; Литвинова Л.С. и др., 2014). Инкубация CD45RA⁺ Т-клеток с rIL-2 приводила к увеличению числа CD71-позитивных Т-лимфоцитов. В отличие от CD45RA⁺CD8⁺ Т-клеток, CD45RA⁺CD4⁺ Т-лимфоциты были чувствительны только к максимальной концентрации rIL-2 (1,0 нг/мл). Данные литературы свидетельствуют, что действие высоких концентраций IL-2 (или IL-15) индуцирует *in vivo* и *in vitro* наивные CD8⁺ Т-клетки, несущие димерный IL-2R-комплекс, опосредуя их интенсивную пролиферацию и дифференцировку (Cho J. H. et al., 2007; Bayer A.L. et al., 2013). В тоже время, низкая чувствительность CD4⁺ Т-клеток к действию rIL-2 может быть обусловлена как низкой экспрессией IL-2R α и IL-2/15R β , так и наличием механизмов, сдерживающих их гомеостатическую пролиферацию *in vivo* и *in vitro* (Geginat J. et al., 2001; Foulds K.E. et al., 2002; Moses C.T. et al., 2003).

Добавление rIL-15 приводило к увеличению числа CD45RA⁺CD4⁺/CD8⁺CD69⁺ Т-клеток только при использовании максимальной концентрации. Рост числа CD45RA⁺CD4⁺/CD8⁺CD25⁺ Т-клеток регистрировался при инкубации Т-клеток с rIL-15 во всем спектре действующих концентраций (рисунок 5). CD4⁺ Т-лимфоциты оказались нечувствительны к пролиферативному действию rIL-15, что может быть связано с низким уровнем экспрессии IL-2/IL-15R β этими клетками (Geginat J. et al., 2001), тогда как CD45RA⁺CD8⁺ Т-лимфоциты отвечали на весь спектр концентраций rIL-15 (рисунок 5). Как уже упоминалось, IL-15 может индуцировать *in vitro* многие реакции, опосредованные IL-2 (Cooper M.A. et al., 2002; Waldmann T.A., 2006; Croce M. et al., 2012). На наивных Т-клетках регистрируются крайне низкие уровни экспрессии IL-15R α и цепи IL-2/15R β , которые индуцируются при активации Т-клеток, в том числе, добавлением экзогенного IL-15, что повышает чувствительность наивных клеток к этому цитокину (Alves N.L. et al., 2003). rIL-7 дозозависимым образом увеличивал число CD69⁺ ($r^2=0,65$, $p<0,05$) и CD25⁺ ($r^2=0,72$, $p<0,05$) в CD4⁺ популяции Т-клеток, не влияя при этом, на экспрессию этими клетками молекулы пролиферации CD71. В популяции CD45RA⁺CD8⁺ Т-клеток, добавление rIL-7 также способствовало увеличению числа CD69⁺ Т-лимфоцитов ($r^2=0,80$, $p<0,05$). Повышение числа CD8⁺CD25⁺ и CD8⁺CD71⁺ Т-клеток происходило только под действием максимальной концентрации rIL-7 (рисунок 5).

CD45RA ⁺	rIL-2	rIL-7	rIL-15	rIL-2/Exp	rIL-7/Exp	rIL-15/Exp
	↑ ↑ ↑ (0,1-1,0)	↑ (1,0) ↑ (1,0) ↑ (1,0)	↑ (1,0) ↑ (0,1-1,0) ↑ (0,1-1,0)	↑ ↑ (0,1-1,0) ↑ (0,1-1,0)	↕ ↑ (1,0) ↑ (1,0)	↑ (0,5-1,0) ↑ (0,5-1,0) ↑ (0,5-1,0)
	↑ ↑ ↑ (1,0)	↑ ↕ ↕	↑ (1,0) ↑ (0,1-1,0) ↕	↑ (1,0) ↑ (1,0) ↕	↕ ↑ (1,0) ↑ (1,0)	↕ ↕ ↕

Рисунок 5 - Влияние γ -цитокинов (rIL-2, rIL-7 и rIL-15) на активацию и пролиферацию CD4⁺/CD8⁺ Т-клеток в популяции CD45RA⁺ Т-лимфоцитов в гомеостатической и активационной моделях культивирования *in vitro*

Примечание: здесь и в рисунках 6 и 7: 0,1-0,5-1,0 – концентрации цитокинов в нг/мл

↕ дозозависимые эффекты цитокинов; ↕ отсутствие изменений изучаемых показателей;

↑↕ изменение значений показателей во всем спектре действующих концентраций цитокинов

Выявленное нами в эксперименте повышение числа $CD4^+/CD8^+CD25^+$ и $CD71^+$ Т-клеток, может быть обусловлено способностью ИЛ-7 выступать в качестве кофактора при субпороговой ТCR-стимуляции Т-лимфоцитов, обеспечивая их гомеостатическую пролиферацию (Tan J.T. et al., 2001; Bradley L.M. et al., 2005; Fry T.J., Mackall C.L., 2005). В тоже время, данные научной периодики свидетельствуют, что ИЛ-7 обладает способностью повышать экспрессию рецептора к α -цепи (CD25) на поверхности Т-лимфоцитов, что, в свою очередь, усиливает восприимчивость клеток к активационным сигналам (Бойчук С.В., Дунаев П.Д., 2008; Dooms H., Abbas A.K., 2010; Kameyama K. et al., 2010).

Добавление ТCR-активатора в среду культивирования $CD45RA^+$ Т-клеток сопровождалось достоверным ростом числа $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов, несущих мембранные молекулы активации (CD69, CD25) и пролиферации (CD71). $CD45RA^+CD4^+$ Т-клетки были чувствительны только к максимальным дозам rIL-2: содержание $CD4^+CD69^+$ и $CD4^+CD25^+$ Т-клеток в $CD45RA^+$ Т-культурах возрастало (в сравнении с добавлением только активатора), а число $CD71^+$ Т-клеток – не изменялось (рисунок 5). Эффекты ИЛ-2 на $CD45RA^+CD8^+$ Т-клетки, в целом, носили стимулирующий характер (рисунок 5). Добавление максимальных концентраций ИЛ-7 в культуры ТCR-активированных $CD45RA^+$ Т-клеток приводило к достоверному увеличению числа $CD4^+/CD8^+CD25^+$ и $CD4^+/CD8^+CD71^+$ Т-клеток и не влияло на экспрессию молекулы ранней активации - CD69 (рисунок 5). Инкубация ТCR-активированных $CD45RA^+$ Т-клеток с rIL-15 (0,5-1,0нг/мл), приводила к повышению числа $CD8^+$ Т-лимфоцитов, экспрессирующих молекулы активации и пролиферации по сравнению с пробами только с добавлением активатора. $CD4^+$ Т-клетки в активационной модели культивирования *in vitro* оказались нечувствительны к цитокину (рисунок 5).

Выявленное нами повышение количества $CD45RO^+CD4^+/CD8^+CD69^+$ -клеток (через 24 ч) и $CD45RO^+CD4^+/CD8^+CD25^+$ (через 48 ч), индуцированное добавлением rIL-2, обусловлено его биологическими свойствами (Benczik M., Gaffen S.L., 2004; Northrop J.K. et al., 2006; Spierings D.C. et al., 2006; Литвинова Л.С. и др., 2013). Действие rIL-2 на $CD4^+$ и $CD8^+$ субпопуляции $CD45RO$ -клеток имело четко выраженный дозозависимый характер ($r^2 = 0,76$ и $r^2=0,82$, $p<0,05$, соответственно в случае $CD4^+$ Т-клеток и $r^2 = 0,56$ и $r^2=0,82$, $p<0,05$, соответственно в случае $CD8^+$ Т-клеток).

rIL-7 оказывал влияние на активацию и пролиферацию $CD45RO^+CD8^+$ Т-клеток, значимо увеличивая количество лимфоцитов с фенотипом $CD8^+CD25^+$ и $CD8^+CD71^+$; не затрагивая, при этом экспрессию маркера ранней активации – CD69. Инкубация $CD4^+$ клеток с rIL-7 (1,0 нг/мл) сопровождалась ростом количества $CD25^+$ позитивных лимфоцитов, и не влияла на экспрессию молекул CD69 и CD71 (рисунок 6). $CD45RO^+CD4^+$ Т-клетки оказались менее чувствительны к пролиферативному эффекту ИЛ-7. Согласно данным литературы, $CD4^+$ Т-клетки памяти, в сравнении с цитотоксическими, более чувствительны именно к антигенному воздействию, их функциональная активность менее зависима от цитокиновой и мембранной костимуляции (Williams M.A., Bevan M.J., 2004; Селедцов В.И. и др., 2010).

Добавление максимальной концентрации rIL-15 (1,0 нг/мл) приводило к росту количества $CD69^+$ клеток, преимущественно, за счет $CD45RO^+CD8^+$ лимфоцитов и не оказывало значимого действия на экспрессию молекулы активации CD25. Выявлен дозозависимый эффект rIL-15 на экспрессию $CD8^+$ клетками маркера пролиферации – CD71 ($r^2=0,70$, $p<0,05$) (рисунок 6). Эффекты rIL-15 не затрагивали субпопуляцию $CD4^+$ клеток (рисунок 6). Согласно данным литературы, $CD8^+$ Т-клетки памяти проявляют большую чувствительность к ИЛ-15-индуцированной пролиферации, нежели наивные $CD8^+$ лимфоциты, а также $CD4^+$ клетки разной степени дифференцировки, что обусловлено высокой экспрессией ИЛ-15R (Kennedy M.K. et al., 2000; Schluns K.S., Lefrançois L., 2003; Moniuszko M. et al., 2004; Ramanathan S. et al., 2009).

TCR-активация $CD45RO^+$ Т-клеток, приводила к росту числа $CD69^+$ (через 24 ч), $CD25^+$ и $CD71^+$ (через 48 ч) Т-лимфоцитов; изменения, индуцированные активатором, равномерно затрагивали $CD4^+$ и $CD8^+$ субпопуляции. Инкубация ТCR-

активированных CD45RO⁺ Т-клеток с rIL-2 (1,0 нг/мл) сопровождалась повышением числа CD69⁺ Т-клеток за счет CD4⁺ субпопуляции (p<0,05) и не затрагивала CD8⁺ Т-клетки (p>0,05). В то же время rIL-2 (1,0 нг/мл) достоверно повышал содержание CD45RO⁺CD4⁺/CD8⁺CD25⁺ Т-клеток по сравнению с пробой только с добавлением активатора (p<0,05). К пролиферативному действию rIL-2 (1,0нг/мл) были чувствительны только активированные CD45RO⁺CD4⁺ Т-лимфоциты.

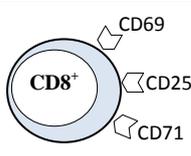
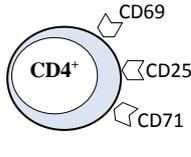
CD45RO ⁺	rIL-2	rIL-7	rIL-15	rIL-2/Exp	rIL-7/Exp	rIL-15/Exp
	<p>↑</p> <p>↑</p> <p>↑_(0,1-1,0)</p>	<p>↕</p> <p>↑_(0,1-1,0)</p> <p>↑_(1,0)</p>	<p>↑_(1,0)</p> <p>↕</p> <p>↑</p>	<p>↕</p> <p>↑_(0,5-1,0)</p> <p>↕</p>	<p>↕</p> <p>↑_(1,0)</p> <p>↕</p>	<p>↑_(0,5)</p> <p>↓_(0,5-1,0)</p> <p>↕</p>
	<p>↑</p> <p>↑</p> <p>↑_(0,1-1,0)</p>	<p>↕</p> <p>↑_(1,0)</p> <p>↕</p>	<p>↕</p> <p>↕</p> <p>↕</p>	<p>↑_(1,0)</p> <p>↑_(0,5-1,0)</p> <p>↑_(1,0)</p>	<p>↕</p> <p>↑_(1,0)</p> <p>↑_(1,0)</p>	<p>↓_(0,5)</p> <p>↕</p> <p>↑_(0,5-1,0)</p>

Рисунок 6 - Влияние цитокинов (rIL-2, rIL-7 и rIL-15) на активацию и пролиферацию CD4⁺/CD8⁺ Т-клеток в популяции CD45RO⁺ Т-лимфоцитов в гомеостатической и активационной моделях культивирования *in vitro*

Добавление в среду культивации rIL-15 (0,5 нг/мл) было ассоциировано со снижением количества CD69-позитивных Т-клеток в TCR-активированной CD45RO⁺CD4⁺ субпопуляции, и, напротив увеличением числа CD45RO⁺CD8⁺CD69⁺ Т-клеток (p < 0,05). На фоне TCR-активации *in vitro*, rIL-15 (0,5 - 1,0 нг/мл) обладал угнетающим действием на цитотоксические Т-клетки памяти, достоверно снижая число CD8⁺CD25⁺ Т-лимфоцитов (по отношению к пробе с активатором) (p<0,05). CD45RO⁺CD4⁺ клетки оказались менее чувствительны к эффектам rIL-15. Тем не менее, rIL-15 (1,0 нг/мл) способствовал увеличению числа CD4⁺CD71⁺ Т-клеток (p<0,05) и не влиял на CD45RO⁺CD8⁺-клетки (рисунок 6). rIL-7 (1,0 нг/мл) на фоне TCR-активации, приводил к повышению содержания CD4⁺/CD8⁺CD25⁺ и CD4⁺CD71⁺ Т-клеток по сравнению с пробой только с добавлением Ac/Exp (p<0,05). Выявленная нами *in vitro* относительная резистентность процесса активации и пролиферации TCR-стимулированных цитотоксических Т-клеток памяти к эффектам γс-цитокинов (rIL-2, rIL-7 и rIL-15), наряду с дифференцировкой в эффекторные клетки, может обеспечивать их устойчивость к активационному апоптозу, а также создавать необходимые предпосылки для эффективной реализации их цитотоксического потенциала в процессе развития вторичного иммунного ответа.

Оценка эффектов γс-цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на позднюю активацию и апоптоз CD4 и CD8 Т-клеток в CD45RA и CD45RO культурах, в условиях гомеостатической и активационной моделей культивирования *in vitro*

Число CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-клеток в контрольных пробах, несущих на своей поверхности молекулу CD95, составило 12,18 (10,02 – 15,51) и 20,84 (16,22-25,60)%, соответственно. В популяциях CD45RA⁺ Т-клеток, число жизнеспособных Т-клеток, оцениваемых в тесте «GuavaViacount», было равным, в среднем - 75,45 (71,98-78,23)%, а в популяции CD45RO⁺ Т-клеток - 87,56 (83,23-90,10)%, соответственно. Интересным оказалось распределение числа CD95⁺ Т-клеток в CD4⁺ и CD8⁺ субпопуляциях CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-лимфоцитов. В CD45RA⁺ культурах преобладали CD8⁺CD95⁺ Т-клетки, тогда как в CD45RO⁺ - популяции, содержание CD4⁺CD95⁺ Т-клеток было выше, чем CD8⁺CD95⁺ лимфоцитов. Кроме того, мы предприняли попытку оценить распределение маркера CD95 в негативных и позитивных по экспрессии CD62L – популяциях CD4 - и CD8 - Т-клеток: число CD95⁺ клеток в популяции

CD45RA⁺CD8⁺CD62L⁺ - было менее 5,6%; тогда как почти 89% CD8⁺CD62L⁻ Т-клеток (T_{EMRA}) экспрессировали молекулу CD95. В CD45RO-культурах, число CD95-позитивных лимфоцитов в популяциях - CD8⁺CD62L⁺ и CD8⁺CD62L⁻ было равным, в среднем, 70 и 85% (рисунок 7).

В хелперных CD45RA⁺CD62L⁺ и CD45RA⁺CD62L⁻ популяциях, число CD95⁺ Т-клеток не превышало - 2,3 и 10,98%, соответственно. В то же время соотношение центральных (T_{CM}) и эффекторных (T_{EM}) клеток, экспрессирующих молекулу CD95, в CD45RO⁺CD4⁺ популяциях составляло, в среднем, 25 и 79% (рисунок 7). *Вышесказанное позволяет предположить конститутивную экспрессию молекулы CD95 – CD4⁺ и CD8⁺ клетками - эффекторами, а также CD8⁺ Т-клетками центральной памяти.* Согласно данным научной периодики, конститутивная экспрессия молекулы CD95 на эффекторных лимфоцитах и Т-клетках памяти, является не только признаком, определяющим их готовность к запуску активационного апоптоза, но и *маркером их созревания и дифференцировки* (Хайдуков С.В., 2003; Gupta S., Gollapudi S., 2008; Селедцов В.И. и др., 2010; Banerjee H. et al., 2012; Prabhu S.V. et al., 2013; Литвинова Л.С. и др., 2014). Некоторые авторы свидетельствуют, что экспрессия молекулы CD95 сама не является мерой чувствительности Т-клеток к Fas-опосредованному апоптозу (Jaleco S. et al., 2003). *Инкубация CD45RA⁺ и CD45RO⁺ культур с rIL-2*, сопровождалась ростом содержания CD95⁺ Т-клеток. Изменения, в основном, затрагивали CD8⁺ популяцию лимфоцитов. На фоне общего снижения числа CD8⁺CD62L⁺ (наивных и центральных) Т-клеток в CD45RA - и CD45RO - культурах, содержание CD95⁺ лимфоцитов в популяциях CD8⁺CD62L⁺ - возрастало с повышением концентрации цитокина. Число CD8⁺CD62L⁻ Т-лимфоцитов, напротив, увеличивалось в CD45RA - и CD45RO - популяциях цитотоксических Т-лимфоцитов, а содержание CD95 - Т-клеток в этих популяциях эффекторных клеток, в целом, оставалось неизменным (рисунок 7). В пробах с добавлением максимальной концентрации IL-2, снижение числа CD62L⁺ Т-клеток коррелировало с ростом содержания CD95⁺ лимфоцитов (r=-0,86 и r=-0,69, p<0,05 соответственно). Инкубация CD45RA - и CD45RO - культур с rIL-2 (1,0нг/мл), также приводила к достоверному снижению числа жизнеспособных Т-клеток, в среднем, на 22% и 25%, соответственно. В нашем эксперименте, rIL-2 не влиял на изменение числа CD4⁺CD95⁺ Т-клеток в CD45RA и CD45RO - популяциях (рисунок 7).

Регистрируемое нами rIL-2-индуцированное увеличение числа мертвых клеток, а также рост содержания CD8⁺CD95⁺ лимфоцитов в культурах CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-клеток (в том числе, в CD62L⁺ - популяциях), может быть обусловлено способностью IL-2, *в отсутствие антигена*, значительно усиливать апоптоз цитотоксических Т-клеток памяти и эффекторов *in vivo* (Ku C.C. et al., 2000; Kamimura D. et al., 2004). Кроме того, выявленная нами IL-2-опосредованная *активация и пролиферация CD8⁺ Т-клеток in vitro*, может значительно повышать их чувствительность к активационному апоптозу. Установлено, что IL-2 является фактором, одновременно обеспечивающим пролиферацию и сенсibilизацию клеток к клеточной гибели, индуцированной активацией (activation-induced cell death, AICD) (Kovanen P.E. et al., 2004; McKinsty K.K. et al., 2010). Добавление IL-7 и IL-15 (1,0 нг/мл) в культуры CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-лимфоцитов приводило к изменению содержания CD95⁺ Т-клеток (в сторону увеличения) в цитотоксических CD62L-позитивных CD45RA и CD45RO – популяциях (рисунок 7) и не сопровождалось изменением соотношения живых/мертвых Т-клеток. Известно, что IL-7 и IL-15 способны усиливать в Т-клетках экспрессию антиапоптотических молекул, таких как Bcl-2 и Mcl-1 (Marsden V.S., Strasser A., 2003), через JAK/STAT и PI3K/AKT сигнальные пути (Shenoy A.R. et al., 2014), и, напротив, ингибировать проапоптозные факторы - Bax и Bad (Dooms H. et al., 2007; Cai K. et al., 2013).

TCR-активация CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-клеток, наряду с увеличением общего числа клеток (в мл) и CD71⁺ Т-лимфоцитов, приводила к снижению содержания живых клеток в обеих популяциях CD45RA⁺ (в среднем, на 38%) и CD45RO⁺ Т-клеток (в среднем, на 33%) (p₀<0,05. Увеличение содержания CD95⁺ Т-клеток в CD45RA⁺ и

CD45RO⁺ пробах с TCR-активатором, регистрировалось за счет обеих популяций Т-клеток (хелперных и цитотоксических) (рисунок 7). В TCR-активированных CD45RA и CD45RO - пробах регистрировалось значительное увеличение CD95⁺ клеток в CD62L⁺ - популяциях, тогда как в CD62L⁻ - эти цифры значимо не изменялись (рисунок 7). На наш взгляд, TCR-индуцированное повышение числа мертвых Т-клеток в обеих культурах - CD45RA⁺ и CD45RO⁺, происходит, как за счет эффекторных Т-клеток, в том числе T_{EMRA} Т-лимфоцитов, так и наивных Т-клеток, крайне чувствительных к дисбалансу иницирующих сигналов, усиленных продукцией IL-2 активированными Т-клетками (Krueger A. et al., 2003; Bouillet Ph., O'Reilly L.A., 2009).

Действие rIL-2 на жизнеспособность TCR-активированных CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-лимфоцитов носило однонаправленный характер и сопровождалось повышением числа мертвых Т-клеток по сравнению с пробой только с добавлением активатора. Рост числа CD95⁺ Т-клеток в культурах CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-лимфоцитов регистрировалось, преимущественно, за счет CD8⁺ Т-клеток (рисунок 7). Перераспределение маркера CD95 в популяциях CD8⁺ клеток было однонаправленным: число CD95⁺ Т-клеток возрастало в CD62L⁻ - популяциях наивных клеток и клеток с центральным фенотипом, тогда как в популяциях эффекторных клеток (CD62L⁺) - по-прежнему оставалось на прежнем уровне (>90%) (рисунок 7). rIL-2-индуцированное изменение числа CD95⁺ Т-клеток в популяциях CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-лимфоцитов имело четкую взаимосвязь с содержанием мертвых клеток ($r=0,60$, $r=0,78$, $p<0,05$ - для CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-лимфоцитов при действии 1,0 нг/мл rIL-2).

Многие авторы указывают на участие IL-2 в экспансии CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов *in vivo* за счет индукции их апоптотической гибели, которая должна произойти до клонального пика (Blattman J.N. et al., 2003; Schluns K.S., Lefrançois L., 2003; Dooms H. et al., 2007; Malek T.R. et al., 2010).

Добавление rIL-7 и rIL-15 в максимальной концентрации (1,0 нг/мл) в культуру активированных Т-клеток, увеличивало число живых CD45RO⁺ Т-лимфоцитов памяти (по сравнению с пробами только с добавлением активатора, в среднем, на 20%), что согласуется биологическим действием этих медиаторов (Schluns K.S. et al., 2000; Schluns K.S., Lefrançois L., 2003; Бойчук С.В., Дунаев П.Д., 2008). CD45RA⁺ Т-лимфоциты оказались чувствительными только к протективному эффекту rIL-7. Нами было выявлено индуцированное rIL-7 перераспределение содержания CD95⁺ клеток в хелперных и цитотоксических популяциях - относительное число CD4⁺CD95⁺ Т-клеток снижалось (rIL-7 - 0,5нг/мл), тогда как содержание CD8⁺CD95⁺ (rIL-7 - 0,5-1,0нг/мл), напротив, возрастало ($p<0,05$). CD45RA⁺ Т-клетки были нечувствительны к действию rIL-15. При этом число CD95⁺ Т-клеток в CD62L⁺ - популяциях CD8⁺ Т-клеток, значимо возрастало, и не изменялось в CD4⁺ (рисунок 7).

Эффекты rIL-7 (0,5-1,0нг/мл) на активированные CD45RO⁺ Т-клетки сопровождалось увеличением общего числа CD95⁺ Т-клеток, за счет CD8⁺ Т-клеток (по сравнению с активационной пробой) ($p < 0,05$). Добавление rIL-15 в активированные культуры CD45RO⁺ Т-клеток сопровождалось достоверным снижением числа CD45RO⁺CD4⁺CD95⁺ Т-лимфоцитов, и напротив, повышением содержания CD45RO⁺CD8⁺CD95⁺ Т-лимфоцитов ($p<0,05$) (рисунок 7). Перераспределение экспрессии молекулы CD95 в популяциях центральных (CD62L⁺) и эффекторных (CD62L⁻) CD45RO⁺ клеток выражалось достоверным увеличением числа CD8⁺CD95⁺CD62L⁺ Т-клеток, а в популяции хелперных лимфоцитов - не изменялось (рисунок 7).

Еще одной из поверхностных молекул, характеризующих активационный статус Т-клеток, является HLA-DR. Согласно современным представлениям, HLA-DR является маркером не только поздней, но и длительной активации Т-клеток (Bertho N. et al., 2000; Хайтов Р.М., 2009). Несмотря на то, что роль CD3⁺HLA-DR⁺ клеток, в целом, остается неясной, их появление и персистенция *in vivo* свидетельствуют, что CD3⁺HLA-DR⁺ - лимфоциты могут быть частью нормальной иммунорегуляции (Imamichi H., et.al., 2012; Arruvito L. et al., 2014).

В интактных CD45RA-культурах, содержание CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺ Т-клеток почти в 2 раза превышало количество CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺ Т-лимфоцитов и было равным 5,54 (4,05-6,22) и 3,13 (3,01-3,46) %, соответственно. Оценив распределение маркера HLA-DR⁺ в негативных и позитивных по экспрессии CD62L – популяциях CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, нами были получены следующие результаты: в популяциях наивных - CD45RA⁺ CD4⁺/CD8⁺CD62L⁺ Т-клеток маркер HLA-DR обнаружен не был; тогда как почти 18 и 32% и CD4⁺/CD8⁺CD62L⁻ Т-лимфоцитов экспрессировали HLA-DR на своей поверхности.

В культурах CD45RO⁺ Т-клеток, в отличие от CD45RA – популяций, преобладали хелперные CD3⁺HLA-DR⁺ Т-лимфоциты (рисунок 7). Как и ожидалось, число HLA-DR-позитивных лимфоцитов, в популяциях - CD8⁺/CD4⁺CD62L⁺ было равным, в среднем, 1,5 и 1,9%; в CD8⁺/CD4⁺CD62L⁻ негативных популяциях это процентное распределение составило: 15 и 8% (рисунок 7). В эффекторных популяциях (CD62L⁻) CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-клеток, более 99% CD3⁺HLA-DR⁺ - Т-клеток экспрессировали CD95. Однако не все CD95-позитивные Т-лимфоциты несли на своей поверхности маркер «поздней активации» HLA-DR⁺. Обнаруженные нами в CD45RA- и CD45RO-культурах CD3⁺HLA-DR⁺ Т-лимфоциты, представляют собой зрелые и/или незрелые эффекторные Т-клетки и T_{EMRA} Т-лимфоциты. Можно предположить, что высокая экспрессия зрелыми эффекторными Т-клетками молекулы HLA-DR, наряду с мембранной экспрессией CD95, могут являться признаками терминальной фазы дифференцировки и созревания (Wang E.C. et al., 1993; Imamichi H. et al., 2012).

Инкубация CD45RA-культур с rIL-2, rIL-7 (1,0 нг/мл) и rIL-15 (0,1-1,0 нг/мл), сопровождалась повышением содержания (в среднем в 1,5 раза) цитотоксических CD3⁺HLA-DR⁺CD95⁺ Т-лимфоцитов в популяциях зрелых и незрелых T_{EMRA} эффекторов. Полученные нами результаты могут быть обусловлены гибелью цитотоксических T_{EMRA} эффекторов, в связи с их низкой чувствительностью к антиапоптозическому влиянию этих цитокинов (Di Mitri D. et al., 2011; Imamichi H. et al., 2012). С другой стороны, цитокин-опосредованное снижение общего числа цитотоксических CD3⁺HLA-DR⁺ Т-клеток в CD45RA⁺ культурах может быть обусловлено повышением содержания эффекторных (CD3⁺CD8⁺CD62L⁻, T_{EMRA}) Т-клеток в результате дифференцировки из наивных Т-лимфоцитов или незрелых T_{EMRA} эффекторов. Выявленные нами изменения, индуцированные действием максимальных концентраций цитокинов (rIL-2 и rIL-15), имели положительную взаимосвязь между содержанием CD3⁺CD62L⁻HLA-DR⁺CD95⁺ лимфоцитов и количеством зрелых цитотоксических (CD62L⁻CD27⁻) T_{EMRA} (r=0,67, p<0,05 для IL-2; r=0,80, p<0,05 для rIL-15).

Инкубация CD45RO⁺ Т-клеток с rIL-2 (1,0 нг/мл) приводила к росту числа HLA-DR⁺ Т-клеток в CD62L⁺ и CD62L⁻ субпопуляциях CD8⁺ Т-лимфоцитов, тогда как в хелперных - число HLA-DR⁺Т-клеток возрастало только в эффекторной (CD62L⁻) популяции (рисунок 7). Следует отметить, что все CD3⁺HLA-DR⁺ клетки в эффекторных популяциях CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, экспрессировали молекулу CD95. Возможно, что rIL-2-индуцированное увеличение числа CD3⁺CD4⁺/CD8⁺HLA-DR⁺ Т-клеток в CD62L-негативной популяции CD45RO-культур, опосредовано пополнением этого пула клеток за счет прекурсоров – CD3⁺HLA-DR⁻, индуцированным rIL-2 в условиях культивирования *in vitro*. Подтверждением этому тезису явилось обнаружение взаимосвязи между снижением числа незрелых цитотоксических эффекторов (CD62L⁻CD27⁺, T_{EM}: Em1 и Em2) и увеличением CD8⁺HLA-DR⁺ (r=-0,80, p<0,05) при действии rIL-2 (1,0x10⁻⁹ г/мл). Повышение числа CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺ лимфоцитов в CD62L⁺ популяции CD45RO⁺ Т-клеток также может быть обусловлено их пролиферацией (Arruvito L. et al., 2014). rIL-7 и rIL-15 не оказывали значимого влияния на изменение числа CD3⁺HLA-DR⁺ Т-лимфоцитов в CD45RO – культурах, однако в максимальных концентрациях, способствовали значимому росту числа CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺CD95⁺ в CD62L⁻ популяциях (рисунок 7).

Добавление активатора сопровождалось достоверным ростом числа CD3⁺HLA-DR⁺CD95⁺ Т-клеток в CD62L-негативных популяциях CD45RO и CD45RA – культурах,

что может свидетельствовать о процессах терминальной дифференцировки и созревания эффекторных клеток. Данный тезис подтверждается фактами позитивной корреляции между содержанием $CD3^+CD8^+CD62L^-HLA-DR^+CD95^+$ клеток и числом зрелых ($CD62L^-CD27^+$) T_{EMRA} эффекторов ($r=0,67$, $p<0,05$ – для $CD45RA^+$ культур); и $CD3^+CD8^+CD62L^-HLA-DR^+CD95^+$ клеток и числом зрелых ($CD62L^-CD27^+$) эффекторов ($r=0,70$, $p<0,05$ – для $CD45RO^+$ культур).

Действие $IL-2$ (0,5-1,0 нг/мл) и $IL-15$ (0,1-1,0 нг/мл) на фоне TCR-активации было направлено на снижение числа $HLA-DR^+$ Т-клеток в $CD62L^-$ негативных $CD45RA^-$ популяциях Т-клеток, тогда как процентное содержание $CD3^+CD8^+CD62L^-HLA-DR^+CD95^+$ возросло (рисунок 7). В культурах $CD45RO^+$ Т-клеток также регистрировалось перераспределение маркера $HLA-DR$ в негативных и позитивных по экспрессии $CD62L^-$ популяциях в сторону его уменьшения; тогда как относительное содержание $CD3^+CD8^+CD62L^-HLA-DR^+CD95^+$ Т-клеток в $CD45RO^+$ культурах, возросло (рисунок 7). Одним из механизмов снижения числа $CD45RA^+HLA-DR^+$ и $CD45RO^+HLA-DR^+$ Т-клеток в $CD62L^-$ негативных популяциях, опосредованных сочетанным действием цитокинов и Т-клеточного активатора, как уже упоминалось ранее, может быть их повышенная гибель, обусловленная низкой экспрессией белков семейства Bcl-2 (Jiang O. et al., 2004; Imamichi H. et al., 2012), а также увеличение содержания фракции $CD62L^-$ Т-лимфоцитов, вследствие цитокинопосредованной пролиферации и дифференцировки TCR-активированных Т-клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя вышесказанное, можно выделить ряд закономерностей цитокинопосредованной регуляции функциональной активности Т-клеток, ассоциированных с изменением репертуара поверхностных молекул, отражающих проходящие процессы активации, пролиферации, дифференцировки и апоптоз, в разных условиях культивирования *in vitro* (рисунок 7).

Наше исследование позволило выявить, что в гомеостатической и активационной моделях культивирования *in vitro*, $\gamma\delta$ -цитокины ($IL-2$, $IL-7$ и $IL-15$), в разной степени, способствуют дифференцировке $CD4^+$ и $CD8^+$ наивных клеток (T_N) и $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток с фенотипом центральной памяти (T_{CM}) в эффекторные клетки разной степени зрелости (рисунок 7). Установлено, что влияние цитокинов ($IL-2$, $IL-7$ и $IL-15$) на процессы активации $CD4^+/CD8^+$ $CD45RA^+$ Т-клеток, в разных моделях культивирования *in vitro*, носят однонаправленный характер, но имеют разную степень выраженности. Продемонстрирована меньшая чувствительность $CD45RA^+CD4^+$ Т-лимфоцитов к пролиферативному действию $\gamma\delta$ -цитокинов, в сравнении с $CD45RA^+CD8^+$ Т-клетками (рисунок 7), что может быть связано с механизмами, сдерживающими их гомеостатическую пролиферацию *in vivo* и *in vitro*. Показано, что в гомеостатической модели культивирования *in vitro*, хелперные популяции $CD45RO^+$ Т-лимфоцитов обладают относительной резистентностью к активационному и пролиферативному действию $\gamma\delta$ -цитокинов, в сравнении с цитотоксическими $CD45RO^+$ Т-клетками. Напротив, цитотоксические $CD45RO^+$ Т-клетки в активационной модели *in vitro*, менее чувствительны к активирующим и пролиферативным эффектам $\gamma\delta$ -цитокинов, в сравнении с хелперными $CD45RO^+$ Т-лимфоцитами (рисунок 7). Установлено, что эффекты $IL-2$ в разных моделях *in vitro*, на жизнеспособность $CD45RA^+$ и $CD45RO^+$ Т-лимфоцитов, носят однонаправленный характер и сопровождаются увеличением числа $CD95^+$ Т-лимфоцитов (в основном, в $CD62L^-$ позитивной популяции), на фоне снижения содержания жизнеспособных Т-клеток. Изменения, индуцированные $IL-2$, затрагивают, в основном, $CD8^+$ Т-клетки. $IL-7$ и $IL-15$, в гомеостатической модели культивирования не оказывают влияния на Т-клетки, тогда как в активационной модели *in vitro*, увеличивают число живых Т-лимфоцитов в $CD45RO^-$ культурах (по сравнению с пробами только с добавлением активатора) и не влияют на $CD45RA^+$ Т-клетки.

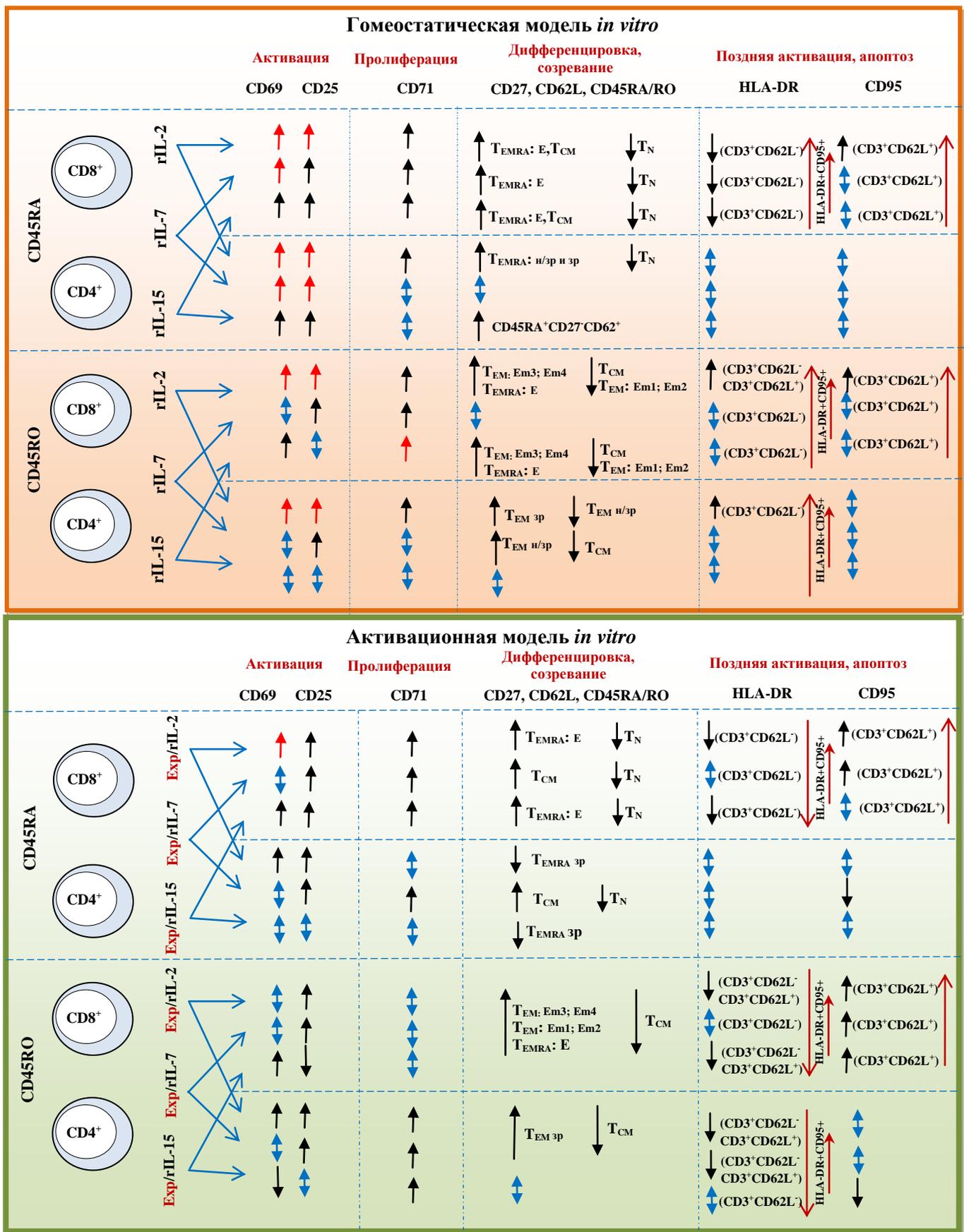


Рисунок 7 - Влияние цитокинов на функциональную активность Т-клеток (по результатам собственных исследований)

Показано, что влияние γ -цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на экспрессию молекулы CD95 (Fas/APO-1) CD4⁺ и CD8⁺ популяциями CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-клеток имеет разную направленность и разную степень выраженности. γ -цитокины (IL-2, IL-7 и IL-15), в разных моделях *in vitro*, способствуют росту числа CD3⁺CD95⁺ Т-клеток в CD8⁺ популяциях наивных лимфоцитов (T_N) и Т-клеток с фенотипом центральной памяти (T_{CM}). Тогда как экспрессия CD95 эффекторными CD8⁺ Т-клетками, а также CD4⁺ Т-клетками разной степени зрелости, не изменяется (рисунк 7).

Установлено, что в CD4⁺ и CD8⁺ популяциях эффекторных (CD62L⁻) CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-клеток более 99% CD3⁺HLA-DR⁺ Т-клеток экспрессируют маркер CD95. Однако не все CD95-позитивные Т-лимфоциты несут на своей поверхности маркер «поздней активации» HLA-DR⁺. Продемонстрировано, что γ -цитокины (rIL-2, rIL-7 и rIL-15) в разных моделях *in vitro*, обладают разнонаправленным действием на изменение содержания CD3⁺HLA-DR⁺ Т-клеток в CD45RA- и CD45RO-культурах. Выявлена способность γ -цитокинов повышать содержание CD3⁺HLA-DR⁺CD95⁺ Т-клеток в эффекторных CD4⁺ и CD8⁺ популяциях лимфоцитов (CD62L-негативных), что может свидетельствовать о процессах терминальной дифференцировки и созревания клеток (рисунк 7).

Подводя итог вышесказанному, изучение физиологических аспектов регуляции функциональной активности Т-клеток, опосредованных биомолекулами, может быть основополагающим компонентом для дальнейшего, более детального исследования клеточных и молекулярных механизмов, лежащих в основе адаптивного иммунитета.

ВЫВОДЫ

1. Эффекты цитокинов, имеющих общую γ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7 и IL-15), на функциональную активность CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, фенотипически проявляющуюся мембранной экспрессией молекул активации (CD69, CD25), пролиферации (CD71), созревания (CD27, CD62L, HLA-DR) и апоптоза (CD95), определяются степенью зрелости Т-лимфоцитов (наивные, Т-клетки памяти, эффекторные клетки) и условиями культивирования *in vitro* (гомеостатическая и активационная модели).

2. В гомеостатической и активационной моделях культивирования *in vitro*, γ -цитокины (IL-2, IL-7 и IL-15) в CD45RA-культурах Т-клеток, в разной степени, способствуют образованию зрелых и незрелых эффекторных CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов (T_{EMRA} и T_{EM}), а также Т-клеток с фенотипом центральной памяти (T_{CM}) за счет снижения содержания наивных CD4⁺ и CD8⁺ клеток (T_N).

3. В культурах CD45RO⁺ Т-клеток цитокины (rIL-2, rIL-7 и rIL-15), в разных условиях культивирования *in vitro*, способствуют дифференцировке CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов с фенотипом центральной памяти (T_{CM}) в эффекторные Т-клетки (T_{EM} и T_{EMRA}).

4. Влияние γ -цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на процессы активации CD45RA⁺CD4⁺ и CD45RA⁺CD8⁺ Т-клеток, ассоциированные с экспрессией молекул - CD69 и CD25, в гомеостатической модели культивирования и на фоне TCR-стимуляции *in vitro*, имеет однонаправленный характер, но разную степень выраженности. CD45RA⁺CD4⁺ Т-лимфоциты, в отличие от CD45RA⁺CD8⁺ Т-клеток, менее чувствительны к пролиферативному действию γ -цитокинов.

5. В гомеостатической модели культивирования *in vitro*, CD45RO⁺CD4⁺ Т-лимфоциты обладают относительной резистентностью к активационному и пролиферативному действию γ -цитокинов по сравнению с CD45RO⁺CD8⁺ Т-клетками. На фоне TCR-активации *in vitro*, CD45RO⁺CD8⁺ Т-клетки менее чувствительны, по сравнению с CD45RO⁺CD4⁺ Т-лимфоцитами, к активирующим и пролиферативным сигналам цитокинов, имеющих общую γ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7 и IL-15).

6. В разных условиях культивирования *in vitro*, γ -цитокины (IL-2, IL-7 и IL-15) инициируют экспрессию молекулы CD95(Fas/APO-1), преимущественно, CD8⁺ популяциями CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-лимфоцитов. Цитокины, в гомеостатической и активационной моделях культивирования *in vitro*, способствуют росту числа CD3⁺CD8⁺CD95⁺ Т-клеток в популяциях наивных лимфоцитов (T_N) и Т-клеток с фенотипом центральной памяти (T_{CM}); экспрессия CD95 эффекторными CD8⁺ Т-клетками (CD62L⁻) а также CD4⁺ Т-клетками разной степени зрелости, не изменяется.

7. Рост числа CD3⁺HLA-DR⁺CD95⁺ клеток в CD4⁺ и CD8⁺ эффекторных (CD62L⁻ негативных) популяциях CD45RA⁻ и CD45RO⁻ Т-лимфоцитов в разных условиях культивирования *in vitro* свидетельствует о процессах терминальной дифференцировки и созревания клеток под действием γ -цитокинов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Литвинова Л.С., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Кофанова К.А. Эффекты иммунорегуляторных цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на процессы активации, пролиферации и апоптотической гибели Т-клеток иммунной памяти *in vitro* // **Цитология**. – 2013. – Том 55, №8. – С.566-571 (IF-0,340).
2. Литвинова Л. С., Мазунин И. О., Гуцол А. А., Сохоневич Н.А., Хазиахматова О. Г., Кофанова К. А. Дозозависимые эффекты стероидных гормонов на экспрессию генов Gfi1 и U2af114 в Т-лимфоцитах разной степени дифференцировки // **Молекулярная биология**. - 2013. - Т. 47, № 4. - С. 656–667 (IF 0.740).
3. Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Селедцов В.И., Литвинова Л.С. Влияние дексаметазона на активацию и пролиферацию Т-клеток иммунной памяти // **Бюллетень экспериментальной медицины**. – 2013. – Т. 155. № 4 – С.468-471(IF-0,565).
4. Yurova K. A., Sokhonevich N. A., Khaziakhmatova O. G., Litvinova L. S. Cytokine-mediated regulation of expression of Gfi1 and U2af114 genes by activated T-cells with various differentiation status *in vitro* // **Biochemistry (Moscow) Supplement series B: Biomedical Chemistry**. – 2015. – №2. – С. 145-149 (IF-0,365).
5. Литвинова Л.С., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Шуплецова В.В., Кофанова К.А., Хазиахматова О.Г., Кайгородова Е.В., Гончаров А.Г. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов // **Медицинская иммунология**. – 2014. - Т. 6, № 1. - С. 7-26 (IF-0,359).
6. Сохоневич Н.А., Юрова К.А., Гуцол А.А., Хазиахматова О.Г., Мазунин И.О., Литвинова Л.С. Эффекты иммунорегуляторных цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на экспрессию генов Gfi1 и U2af114 в Т-лимфоцитах разной степени дифференцировки // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2015. - Т.159 (№ 2). - С. 196-200 (IF-0,565).
7. Сохоневич Н.А., Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Шуплецова В.В., Литвинова Л.С. Фенотипическая характеристика и функциональные особенности Т- и В-клеток иммунной памяти // **Цитология**. – 2015. – Т.57, №5. – С. 311-318. (IF-0,340).
8. Сохоневич Н.А., Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Литвинова Л.С. Цитокин-индуцированная активация и пролиферации TCR-активированных Т-лимфоцитов памяти // **Российский иммунологический журнал**. – 2015. - № 5. – С. 25-29 (IF 0,286).
9. Sokhonevich N.A., Kofanova K.A., Khaziakhmatova O.G., Litvinova L.S. Influence of cytokine IL-2 on naïve T-cells differentiation *in vitro* // **Fundamental and applied research in biology 3rd international scientific conference, Donetsk national university, 2014, February 24-27.** – С. 231.
10. Кофанова К.А., Сохоневич Н.А., Хазиахматова О.Г., Мазунин И.О., Литвинова Л.С. Оценка влияния IL-7 и IL-15 на пролиферацию и транскрипцию мРНК гена hTERT Т-клетками памяти (CD45RO⁺) с разным функциональным статусом // **Сборник статей по материалам XX международной заочной научно-практической конференции «Научная дискуссия: вопросы медицины».** — М.: «Международный центр науки и образования», 2013. — С. 72-79.
11. Кофанова К.А., Сохоневич Н.А., Хазиахматова О.Г., Мазунин И.О., Литвинова Л.С. Влияние IL-2 на пролиферативную активность и транскрипцию мРНК гена hTERT в Т-лимфоцитах разной степени дифференцировки // **Международная научно-практическая конференция «Перспективы развития науки и образования».** Москва. – 2013. – Т.1. – С. 44-49.
12. Литвинова Л.С., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Шуплецова В.В., Гончаров А.Г., Селедцов В.И. Влияние интерлейкина-2 на апоптоз и пролиферацию Т-клеток иммунной памяти //

Материалы докладов XVII-ой Межгородской научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии». - Санкт-Петербург, 20-21 апреля. - 2011. – С. 44-45.

13. Сохоневич Н.А., Гуцол А.А., Кофанова К.А., Литвинова Л.С. Влияние иммунорегуляторных цитокинов на экспрессию молекулы ранней активации CD69 в популяции Т-клеток иммунной памяти // Сборник тезисов докладов XVIII-ой межгородской научной конференции молодых учёных «Актуальные проблемы патофизиологии - 2013», г. Санкт-Петербург, 10-11 апреля. – 2013. – С.110-112.
14. Сохоневич Н.А., Гуцол А.А., Литвинова Л.С. Влияние иммунорегуляторных цитокинов на дифференцировку наивных Т-клеток // Материалы докладов XVIII-ой Межгородской научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии». - Санкт-Петербург, 20-21 апреля. - 2012. — С. 119-121.
15. Сохоневич Н.А., Литвинова Л.С. Эффекты цитокинов, имеющих общую γ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7 и IL-15), на содержание CD3⁺CD4⁺/CD8⁺HLA-DR⁺ Т-клеток в CD45RA- и CD45RO - культурах *in vitro* // Сборник статей по материалам международной конференции "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация". – М.: МАИК «Наука», 2015 г. – С. 31-34.
16. Сохоневич Н.А., Юрова К.А. Хазиахматова О.Г., Литвинова Л.С. Влияние цитокинов, имеющих общую γ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7 и IL-15) на дифференцировку цитотоксических - CD8⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов памяти *in vitro* // Медицинская иммунология. – 2015. №6. – С. 16.
17. Сохоневич Н.А., Юрова К.А. Хазиахматова О.Г., Литвинова Л.С. Эффекты цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на процессы активации и пролиферации наивных Т-клеток *in vitro* // Международный научно-исследовательский журнал. – 2015. – №4(35). – С. 21-25.
18. Сохоневич Н.А., Юрова К.А., Литвинова Л.С. Влияние IL-7 и IL-15 на созревание и дифференцировку наивных Т-лимфоцитов *in vitro* // Сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции «Перспективы развития науки и образования», 28 февраля 2015, г. Москва. – Мин-во обр. и науки. – М.: «Ар-консалт», 2015. – С. 12-13.
19. Сохоневич Н.А., Юрова К.А., Литвинова Л.С. Влияние цитокинов, имеющих общую γ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7 и IL-15), на изменение содержания числа CD3⁺CD8⁺/CD4⁺CD56⁺CD62L⁺CD95⁺ в популяциях Т-лимфоцитов // Сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции Часть 1. М.: «Ар-Консалт». - 2015 г. – С. 25-27.
20. Юрова К.А., Сохоневич Н.А., Хазиахматова О.Г., Литвинова Л.С. Влияние иммунорегуляторных цитокинов, имеющих общую γ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15) на взаимосвязь между транскрипцией мРНК гена *hnRNPLL* и мембранной экспрессией костимуляторной молекулы - CD28 в механизмах дифференцировки Т-клеток *in vitro* // Сборник статей по материалам XXXV международной заочной научно-практической конференции «Научная дискуссия: вопросы медицины». — М.: Изд. «Международный центр науки и образования», 2015. – С.27-31.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

CD45 - общелейкоцитарный рецептор	T _{SCM} – стволовые Т-клетки памяти
CD45RA - Т-лимфоциты, несущие высокомолекулярную изоформу рецептора CD45	T _{CM} – центральные Т-клетки памяти
CD45RO – Т-клетки памяти	T _{TE} (T _{TE/MRA}) – терминально дифференцированные Т-клетки
CD4 – популяция хелперных Т-клеток	T _{EM} – эффекторные Т-клетки
CD8 – популяция цитотоксических Т-клеток	Vcl – антиапоптотический фактор
CD62L - молекула, отвечающая за поступление Т-клеток из кровяного русла во вторичные лимфоидные органы.	CD – кластер дифференцировки (<i>cluster of differentiation</i>)
CD27, CD28 - молекулы костимуляции.	Fas – апоптотический антиген
TCR – Т-клеточный рецептор (<i>T-cell receptor</i>)	IL - интерлейкин
T _N – наивные Т-клетки	MHC – главный комплекс гистосовместимости (<i>major histocompatibility complex</i>)

Подписано в печать _____.2015
формат 60X90 1/16. Усл. печ. листов 1,5. Тираж 100 экз. Заказ №
Отпечатано типографией
Издательства Балтийского федерального университета им. И. Канта
236041, г. Калининград, ул. Гайдара, 6